



HAL
open science

Étude des dommages oxydatifs chez *Unio tumidus* pour le biomonitoring des eaux douces et des relations entre la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine et le malondialdéhyde

Anne-Marie Noci-Charissou

► **To cite this version:**

Anne-Marie Noci-Charissou. Étude des dommages oxydatifs chez *Unio tumidus* pour le biomonitoring des eaux douces et des relations entre la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine et le malondialdéhyde. Toxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 2002. Français. NNT : 2002METZ031S . tel-01775875

HAL Id: tel-01775875

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775875>

Submitted on 24 Apr 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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE METZ
Ecotoxicité, Biodiversité, Santé Environnementale

THESE

soutenue le 5 juillet 2002

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

mention Toxicologie de l'Environnement

BIBLIOTHEQUE UNIVERSTITAIRE - METZ	
N° inv.	20020985
Cote	S/MZ 02/31
oc	

**Etude des dommages oxydatifs chez *Unio tumidus*
pour le *biomonitoring* des eaux douces et des relations
entre la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine et le
malondialdéhyde**

Anne-Marie NOCI-CHARISSOU

Membres du jury :

J.C. AMIARD, Directeur de Recherche, Université de Nantes, rapporteur

T. CAQUET, Chargé de recherche, INRA de Rennes, rapporteur

H. BESSI-LAHRACH, Professeur habilité, Université de Mohammedia (Maroc)

C. COSSU-LEGUILLE, Maître de conférences, Université de Metz, co-directeur de thèse

P. VASSEUR, Professeur, Université de Metz, Directeur de thèse

UNIVERSITE DE METZ
Ecotoxicité, Biodiversité, Santé Environnementale

THESE

soutenue le 5 juillet 2002

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

mention Toxicologie de l'Environnement

**Etude des dommages oxydatifs chez *Unio tumidus*
pour le *biomonitoring* des eaux douces et des relations
entre la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine et le
malondialdéhyde**

Anne-Marie NOCI-CHARISSOU

Membres du jury :

J.C. AMIARD, Directeur de Recherche, Université de Nantes, rapporteur

T. CAQUET, Chargé de recherche, INRA de Rennes, rapporteur

H. BESSI-LAHRACH, Professeur habilité, Université de Mohammedia (Maroc)

C. COSSU-LEGUILLE, Maître de conférences, Université de Metz, co-directeur de thèse

P. VASSEUR, Professeur, Université de Metz, Directeur de thèse

A Dominique et Orlando, mes parents,

Ce travail est le vôtre.

Je tiens à exprimer toute ma profonde gratitude à Mademoiselle **Paule VASSEUR**, Professeur et Directeur du laboratoire d'Ecotoxicologie (EBSE) de l'Université de Metz. Votre bienveillance à mon égard, et surtout votre soutien et la confiance que vous m'avez accordé resteront pour toujours gravés dans ma mémoire. Grâce à vous, j'ai appris beaucoup et je vous remercie de m'avoir fait partager vos connaissances. Veuillez trouver ici l'expression de mon admiration et de mon respect.

Je suis reconnaissante à Mme **C. COSSU-LEGUILLE**, Maître de conférences et co-responsable de ma thèse, pour l'intérêt qu'elle a toujours porté à mon travail. Sa disponibilité et ses conseils m'ont été d'une aide précieuse.

Je tiens à remercier sincèrement Mr **T. CAQUET**, Chargé de recherche à l'INRA de Rennes, et Mr **J. C. AMIARD**, Professeur à l'Université de Nantes, d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Mes remerciements s'adressent à Mme **H. BESSI-LAHRACH**, Professeur habilité à l'Université de Mohammedia au Maroc, qui a bien voulu accepter de faire partie de ce jury.

Je remercie toute l'équipe de l'EBSE pour les agréables moments passés ensemble et pour la bonne ambiance qui règne au sein du laboratoire. Et plus particulièrement Claudine et Anne-Marie pour leurs précieux conseils.

J'en profite également pour remercier l'ensemble des thésards (Sylvie, Marie-Aline, Stéphanie, Sophie et Sébastien) de leur soutien et de leur bonne humeur, tout au long de ma thèse.

Je tiens sincèrement à exprimer ma gratitude à Maryline et à Rosy pour leur sympathie et leur contribution aux tâches les plus variées.

Je tiens enfin à remercier mes parents et ma famille pour leur soutien et leur réconfort tout au long de l'aboutissement de ce travail. Merci à toi Alan pour tous les efforts et toute la compréhension dont tu as fait preuve pendant les moments difficiles.

Liste des figures

Figure 1: Représentation des méthodologies faisant appel à l'utilisation des biomarqueurs dans l'évaluation des risques écotoxicologiques

Figure 2 : Réductions de la molécule de dioxygène et actions conjointes des différentes enzymes antioxydantes

Figure 3 : Les sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène

Figure 4 : Mécanisme de la lipoperoxydation

Figure 5 : Produits formés lors de la lipoperoxydation

Figure 6 : Sites potentiels de formation des adduits à l'ADN

Figure 7 : Principaux produits d'oxydation de la 2'-déoxyguanosine par l'oxygène singulet, incluant la 7,8-dihydro-8-oxo-2'-désoxyguanosine et le diastéréoisomère de la 7,8-dihydro-4-hydroxy-8-oxo-2'-désoxyguanosine

Figure 8 : Exemple de produits d'hydroxylation de la thymine et de la guanine formés après attaque de l'ADN par le radical hydroxyle

Figure 9 : Anatomie d'un bivalve lamellibranche

Figure 10 : Etang de Manom

Figure 11 : Exemple de cage utilisée lors des études de transfert de bivalves

Figure 12 : Profil chromatographique du MDA obtenu après injection (20 μ L) d'un homogénat de **glande digestive** déprotéinisé et dilué au $\frac{1}{2}$

Figure 13 : Profil chromatographique du MDA obtenu après injection (20 μ L) d'un homogénat de **branchie** déprotéinisé et dilué au $\frac{1}{2}$

Figure 14 : Profil chromatographique de 8-OHdG obtenu après injection (100 μ L) d'un homogénat de **glande digestive**, la sensibilité est de 50 nA.

Figure 15 : Profil chromatographique de dG obtenu après injection (100 μ L) d'un homogénat de **branchie**, la détection s'effectue en UV à 290 nm.

Figure 16 : Carte des 5 stations étudiées sur le site atelier de la rivière Moselle

Figure 17 : Situation des 4 plans d'eau situés dans la vallée de la Moselle

Figure 18 : Concentrations moyennes de MDA mesurées dans les **glandes digestives** des bivalves exposés pendant 7 et 21 jours sur la station témoin et les 5 stations de la Moselle

Figure 19 : Concentrations moyennes de MDA mesurées dans les **branchies** des bivalves exposés pendant 7 et 21 jours sur la station témoin et les 5 stations de la Moselle

Figure 20 : Représentation graphique des droites de corrélation et calcul du coefficient de régression des branchies en fonction des glandes digestives concernant les deux temps d'exposition des organismes

Figure 21 : Taux moyens de 8-OHdG mesurés dans les homogénats tissulaires des **glandes digestives** des bivalves exposés pendant 7 et 21 jours sur la station témoin et les 5 stations de la Moselle

Figure 22 : Taux moyens de 8-OHdG mesurés dans les homogénats tissulaires des **branchies** des bivalves exposés pendant 7 et 21 jours sur la station témoin et les 5 stations de la Moselle

Figure 23 : Cercles des corrélations réalisés sur les données centrées réduites incluant les mesures du MDA, de la 8-OHdG et des analyses physico-chimiques dans les **glandes digestives** après 7 et 21 jours d'exposition

Figure 24 : Cercles des corrélations réalisés sur les données centrées réduites incluant les mesures du MDA, de la 8-OHdG et des analyses physico-chimiques dans les **branchies** après 7 et 21 jours d'exposition

Figure 25 : Cercles des corrélations réalisés sur les données centrées réduites incluant les mesures du MDA, de la 8-OHdG et des analyses physico-chimiques dans les **glandes digestives** après 7 et 21 jours d'exposition (autres composantes) des stations de la Moselle lors de la campagne du PNETOX

Figure 26 : Cercles des corrélations réalisés sur les données centrées réduites incluant les mesures du MDA, de la 8-OHdG et des analyses physico-chimiques dans les **branchies** après 7 et 21 jours d'exposition (autres composantes) des stations de la Moselle lors de la campagne du PNETOX

Figure 27 : Concentrations moyennes de MDA mesurées dans les homogénats tissulaires des **glandes digestives** des bivalves exposés pendant 7 et 21 jours sur les 2 plans d'eau issus de gravières au cours de la campagne d'automne 1999

Figure 28 : Concentrations moyennes de MDA mesurées dans les homogénats tissulaires des **branchies** des bivalves exposés pendant 7 et 21 jours sur les 2 plans d'eau issus de gravières au cours de la campagne d'automne 1999

Figure 29 : Concentrations moyennes de MDA mesurées dans les homogénats tissulaires des **glandes digestives** des bivalves exposés pendant 7 et 21 jours sur les 3 plans d'eau issus de gravières au cours de la campagne de printemps 2000

Figure 30 : Concentrations moyennes de MDA mesurées dans les homogénats tissulaires des **branchies** des bivalves exposés pendant 7 et 21 jours sur les 3 plans d'eau issus de gravières au cours de la campagne de printemps 2000

Figure 31 : Taux moyens de MDA et de 8-OHdG mesurés dans les homogénats tissulaires des **glandes digestives** des bivalves exposés pendant 7 et 21 jours sur les 4 plans d'eau issus de gravières au cours de la campagne d'automne 2000

Figure 32 : Taux moyens de MDA et de 8-OHdG mesurés dans les homogénats tissulaires des **branchies** des bivalves exposés pendant 7 et 21 jours sur les 4 plans d'eau issus de gravières au cours de la campagne d'automne 2000

Figure 33 : Cercle des corrélations réalisé sur les données centrées réduites sur l'ensemble des paramètres biologiques (sans la 8-OHdG) pour l'étude des gravières, toutes campagnes et tous tissus confondus

Figure 34 : Cercles des corrélations sur les données centrées réduites incluant les mesures du MDA, de la 8-OHdG et des paramètres antioxydants dans les **glandes digestives** après 7 et 21 jours d'exposition pour les sites des gravières lors de la campagne d'automne 2000

Figure 35 : Cercles des corrélations sur les données centrées réduites incluant les mesures du MDA, de la 8-OHdG et des paramètres antioxydants dans les **branchies** après 7 et 21 jours d'exposition pour les sites des gravières lors de la campagne d'automne 2000

Figure 36 : Taux de MDA et de 8-OHdG mesurés dans les homogénats tissulaires des **glandes digestives** des bivalves exposés en laboratoire au fer ferrique et au Benzo(a)Pyrène lors d'une étude préliminaire

Figure 37 : Taux de MDA et de 8-OHdG mesurés dans les homogénats tissulaires des **branchies** des bivalves exposés en laboratoire au fer ferrique et au Benzo(a)Pyrène lors d'une étude préliminaire

Figure 38 : Taux de MDA et de 8-OHdG mesurés dans les homogénats tissulaires des **glandes digestives** des bivalves exposés en laboratoire au fer ferrique et au Benzo(a)Pyrène seuls ou en mélange

Figure 39 : Taux de MDA et de 8-OHdG mesurés dans les homogénats tissulaires des **branchies** des bivalves exposés en laboratoire au fer ferrique et au Benzo(a)Pyrène seuls ou en mélange

Figure 40 : Variabilité interindividuelle des taux de 8-OHdG dans les glandes digestives et les branchies des bivalves intoxiqués pendant 6 jours par le fer et le B(a)P seuls ou en mélange

Figure 41 : Distribution des taux de 8-OHdG en fonction des taux de MDA dans les glandes digestives et les branchies des bivalves exposés lors des campagnes *in situ*

Figure 42 : Cercle des corrélations réalisé sur les données centrées réduites des stations de Roville devant Bayon et de Vandières incluant les mesures du MDA, de la 8-OHdG et des analyses physico-chimiques des deux tissus étudiés

Liste des tableaux

Tableau I : Exemples de métaux impliqués dans la génération des radicaux de l'oxygène

Tableau II : Antioxydants non enzymatiques

Tableau III : Méthodes utilisées pour la détection et la mesure de la peroxydation lipidique au niveau biologique

Tableau IV : Principales méthodes analytiques de détection du 4-hydroxynonéal

Tableau V : Principales méthodes analytiques de détection du malondialdéhyde

Tableau VI : Principales méthodes de mesure de la 8-OHdG

Tableau VII : Etudes rapportées dans la littérature portant sur la mesure de la lipoperoxydation et de la 8-OHdG chez les mammifères

Tableau VIII : Etudes rapportées dans la littérature portant sur l'exposition de vertébrés ou invertébrés aquatiques à des métaux

Tableau IX : Etudes rapportées dans la littérature portant sur l'exposition de vertébrés ou invertébrés aquatiques à des polluants organiques seuls ou en mélange *in vitro*

Tableau X : Etudes reportées dans la littérature portant sur l'exposition *in situ* ou en laboratoire de vertébrés ou d'invertébrés aquatiques à des sédiments contaminés

Tableau XI : Etudes rapportées dans la littérature portant sur la mesure de la 8-OHdG après exposition en laboratoire ou *in situ* de vertébrés ou invertébrés aquatiques à des xénobiotiques

Tableau XII : Les genres d'Unionidés

Tableau XIII : Concentrations moyennes de malondialdéhyde (MDA) mesurées par HPLC dans les glandes digestives et les branchies des bivalves contrôles prélevés dans les étangs de Manom et la Maxe, et moyennes sur l'ensemble des 2 sites toute saison confondue

Tableau XIV : Concentrations moyennes de 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OHdG) mesurées par HPLC dans les glandes digestives et les branchies des bivalves contrôles prélevés dans les étangs de Manom et la Maxe, et moyennes sur l'ensemble des 2 sites, toute saison confondue

Tableau XV : Tableau récapitulatif des dates de mise sur sites et de récupération des organismes lors de la campagne du PNETOX

Tableau XVI : Classification des stations selon leurs concentrations en micropolluants organiques et minéraux dans les sédiments, selon les seuils de qualité des sédiments

Tableau XVII : Récapitulatif des tendances des paramètres antioxydants chez les bivalves transférés sur les 5 sites le long de la Moselle

Tableau XVIII : Analyses physico-chimiques des eaux intersticielles des 4 plans d'eau étudiés

Tableau XIX : Modifications des paramètres antioxydants observées dans les tissus des bivalves transférés sur les 2 plans d'eau de la vallée de la Moselle durant l'automne 1999 après 21 jours d'exposition

Tableau XX : Modifications des paramètres antioxydants observées dans les tissus des bivalves transférés sur les 3 plans d'eau de la vallée de la Moselle durant le printemps 2000 après 7 et 21 jours d'exposition

Tableau XXI : Modifications des paramètres antioxydants et du test des comètes observées dans les tissus des bivalves transférés sur les 4 plans d'eau de la vallée de la Moselle durant l'automne 2000 après 7 et 21 jours d'exposition

Tableau XXII : Récapitulatif des résultats du test des comètes après 6 jours d'exposition des organismes au fer et/ou BaP lors de l'essai définitif

Tableau XXIII : Modifications observées des taux de MDA et de 8-OHdG chez les bivalves transférés au niveau des sites contaminés par rapport aux organismes engagés dans le site de référence

Tableau XXIV : Modifications des paramètres antioxydants enregistrées dans les glandes digestives et les branchies chez les bivalves transférés au sein des divers sites contaminés

Liste des abréviations

AAS	2-amino-adipic semialdéhyde
ADN	acide désoxyribonucléique
B(a)P	benzo(a)pyrène
BSO	sulfoximine buthionine
CAT	catalase
CG	chromatographie gazeuse
CHD	1,3-cyclohexanedione
CoQ ₁₀	co-enzyme Q ₁₀
DHA	acide docosahexaénoïque
DMSO	diméthyl sulfoxyde
DNHP	2,4-dinitrophénylhydrazine
DNSH	dansylhydrazine (5-(diméthylamino)naphtalène-1-sulphonehydrazine)
DTD	DT-diaphorase
ELISA	enzyme-labeled immunosorbent assay
EPA	acide eicosapentaénoïque
EROD	éthoxyrésorufine O-dééthylase
Fpg	formamidopyrimidine-ADN glycosylase
GGS	γ -glutamyl semialdéhyde
GSH	glutathion réduit
GSSG	glutathion oxydé
G6PD	glutathion-6-phosphate déshydrogénase
GPX Se-ind	glutathion-peroxydase sélénium indépendant
GRd	glutathion réductase
HAP	hydrocarbures aromatiques polycycliques
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
4-HNE	4-hydroxynonéal
HOCI	hypochlorite
HPLC	chromatographie liquide haute performance
i.p.	intra-péritonéal
LDL	lipoprotéine de basse densité
MDA	malondialdéhyde
M1G	3-(2'-déoxy-béta-D-erythro-pentofuranosyl)-pyrimido[1,2-a]purin-10(3H)-one
MPO	myéloperoxydase
MROD	méthoxyrésorufine O-dééthylase
O ₂	oxygène moléculaire
¹ O ₂	oxygène singulet
O ₂ ⁻	anion superoxyde
OH [•]	radical hydroxyle
8-OHdG	8-hydroxy-2'-déoxyguanosine
ONOO ⁻	anion peroxydinitrite
ONOOH	nitrosyle
PCB	poly-chloro-biphényl
Ppb	partie par billion
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RPE	résonance paramagnétique électronique
SAB	sérum albumine-bovine
Se GPx	sélénium-dépendant glutathion-peroxydase
SM	spectrométrie de masse
SIM	selected ion monitoring
SOD	superoxydedismutase
TEMPO	2,2,6,6-tetraméthylpiperidine-N-oxyl
TBARS	substances réactives à l'acide thiobarbiturique
α -TOH	α -tocophérol
TOSC	capacité totale de piégeage des oxydants
XO	xanthine oxydase

Liste des annexes

Annexe 1 : Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Annexe 2 : Récapitulatif des tampons utilisés pour le dosage de la 8-OHdG

Annexe 3 : Calcul de la quantité et de la pureté de l'ADN

Annexe 4 : Composition de l'eau reconstituée utilisée lors des essais en laboratoire

Annexe 5 : Protocole des intoxications de bivalves au Benzo(a)Pyrène et au fer en conditions contrôlées au laboratoire

Annexe 6 : Composition des eaux interstitielles des stations le long de la Moselle (PNETOX)

Annexe 7 : Taux de MDA dans les glandes digestives et les branchies des bivalves transférés pendant 7 et 21 jours sur les 5 sites le long de la Moselle

Annexe 8 : Taux de 8-OHdG dans les glandes digestives et les branchies des bivalves transférés pendant 7 et 21 jours sur les 5 sites le long de la Moselle

Annexe 9 : Distribution des individus issus de la campagne de PNETOX dans le plan factoriel issu de l'ACP des données centrées réduites des glandes digestives

Annexe 10 : Distribution des individus issus de la campagne de PNETOX dans le plan factoriel issu de l'ACP des données centrées réduites des branchies

Annexe 11 : Analyses physico-chimiques des sédiments du site de référence de la Maxe

Annexe 12 : Taux de MDA et de 8-OHdG dans les glandes digestives et les branchies lors des campagnes des gravières

Annexe 13 : Taux de MDA et de 8-OHdG dans les glandes digestives et les branchies des bivalves exposés au fer et au B(a)P lors des intoxications en conditions contrôlées au laboratoire

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1/ BIOMARQUEURS EN ECOTOXICOLOGIE	3
2/ SOURCES DE PRODUCTION ET EFFETS DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE	5
A/ L'oxygène singulet	5
B/ L'anion superoxyde	5
C/ Le peroxyde d'hydrogène	6
D/ Le radical hydroxyle	7
E/ Rôle des métaux de transition	8
3/ LES SYSTEMES ANTIOXYDANTS	10
A/ Les enzymes de protection	10
a/ Les superoxydes dismutases	10
b/ La catalase et les glutathion peroxydases	11
c/ La glutathion réductase	12
B/ Les antioxydants non enzymatiques	12
a/ Les antioxydants liposolubles	12
b/ Les antioxydants hydrosolubles	13
C/ Les protéines de fixation des métaux	14
4/ CONSEQUENCES DES REACTIONS RADICALAIRES	15
A/ La peroxydation lipidique	15
B/ Les lésions aux protéines	16
C/ Les lésions à l'ADN	17
D/ Mécanismes de réparations des lésions initiées par les oxyradicaux	18
5/ DETECTION DES LESIONS INITIEES PAR LES ESPECES REACTIVES	20
A/ Méthodes usuelles d'évaluation de la lipoperoxydation	20
B/ Mesure du malondialdéhyde	21
C/ Mesure de la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine	23
a/ Méthodes chromatographiques	23
b/ Les autres méthodes de détection de la 8-OHdG	24
6/ INDUCTION DE LA LIPOPEROXYDATION ET FORMATION DE LA 8-OHdG CHEZ LES MAMMIFERES	26
7/ REPONSES DES ANIMAUX AQUATIQUES AU STRESS OXYDANT DÛ AUX CONTAMINANTS DE L'ENVIRONNEMENT	27
A/ Activités antioxydantes endogènes chez les organismes aquatiques	27
B/ Biomarqueurs du stress oxydant chez les organismes aquatiques	28
a/ Niveaux endogènes de la lipoperoxydation	29
b/ Induction de la lipoperoxydation par l'exposition à des xénobiotiques	29
C/ Induction de la 8-OHdG chez les organismes aquatiques	33
MATERIEL ET METHODES	
1/ MATERIEL BIOLOGIQUE	35
A/ Généralités	35
a/ Systématique	35
b/ Morphologie	35
B/ Classe des bivalves	36
2/ ECHANTILLONNAGE, CONSERVATION ET PREPARATION DES TISSUS	39

A/ Echantillonnage et conservation des tissus	39
B/ Préparation des échantillons pour le dosage du MDA	40
a/ Préparation des homogénats de glandes digestives et de branchies	40
b/ Protocole expérimental en vue du dosage du MDA	40
c/ Dosage des protéines	41
C/ Préparation des échantillons pour le dosage de la 8-OHdG	41
a/ Isolement et hydrolyse de l'ADN des échantillons	42
b/ Utilisation d'une méthode en kit pour isoler l'ADN	43
D/ Analyse statistique des résultats	44
a/ Calcul de la moyenne et des écart-types	44
b/ L'analyse en composantes principales	45
3/ LES ETUDES DE TERRAIN	46
A/ Programme de recherche pour la validation d'indicateurs biologiques sur divers sites de la Moselle	46
B/ Suivi de la qualité de plans d'eau en Lorraine	48
4/ EXPERIMENTATIONS EN LABORATOIRE	50
A/ Choix des toxiques testés	50
B/ Conditions d'expérimentation	50
RESULTATS	52
1/ NIVEAUX DE BASE DU MDA ET DE LA 8-OHDG	53
A/ Niveaux de base du malondialdéhyde	53
B/ Niveaux de base de la 8-OHdG	54
2/ ETUDES DE TERRAIN : REPONSES DES PARAMETRES BIOLOGIQUES	56
A/ Etudes en rivière des réponses biologiques des populations d'invertébrés benthiques	56
a/ Teneurs en micropolluants des sites étudiés	56
b/ Biomarqueurs de cytotoxicité : la lipoperoxydation et les systèmes antioxydants	58
c/ Biomarqueur de génotoxicité : mesure des taux de 8-OHdG	59
d/ Analyse en composantes principales (ACP)	60
B/ Suivi de la qualité biologique de plans d'eau de la vallée de la Moselle	62
a/ Campagne d'automne 1999	63
b/ Campagne de printemps 2000	64
c/ Campagne d'automne 2000	65
d/ Analyse en composantes principales (ACP)	66
3/ INTOXICATIONS EN LABORATOIRE	68
A/ Résultats	68
DISCUSSION	71
CONCLUSION	80
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	82
ANNEXES	107

Publication

Charissou A.M., Cossu-Leguille C. et Vasseur P., 2002, Biologic biomarkers in freshwater bivalve as early indicators of disturbances of the aquatic environment, *soumis dans Biomarkers*.

Rapports d'études

Cossu-Leguille C., Noci-Charissou A.M., Vasseur P., 2000, Qualité biologique des plans d'eau de la vallée de la Moselle : Etude de biomarqueurs comme indicateurs de l'état biologique des populations, Université de Metz, 12p.

Vasseur P., Garric J., Pihan J.C., Exinger A., Slomianny C. et leurs collaborateurs, 2000, Validation d'indicateurs biologiques de la contamination des écosystèmes hydriques dulçaquicoles et de ses effets toxiques, Programme PNETOX, 32p.

Communication affichée

Charissou A.M., Cossu-Leguille C. et Vasseur P., 2002, *Biomarqueurs de toxicité des populations de bivalves benthiques*, Séminaire de l'école doctorale RP2E, Nancy.

INTRODUCTION

Cette recherche s'inscrit dans le cadre de l'étude de biomarqueurs de toxicité, et plus particulièrement du stress oxydant, pour l'évaluation de l'état des populations vivant au sein des hydrosystèmes dulçaquicoles.

La détection des effets des contaminants est nécessaire pour la gestion de la qualité des milieux et pour limiter l'altération des populations aquatiques exposées. La contamination chimique peut être à l'origine directement ou indirectement d'un stress oxydant avec des répercussions possibles parfois au niveau génomique. L'utilisation de marqueurs biologiques est intéressante afin de traduire les effets des contaminants sur les biocénoses. L'utilisation des biomarqueurs pour détecter très tôt des modifications physiologiques, biochimiques, génomiques et immunologiques des individus issus de populations autochtones des milieux naturels a déjà été envisagée pour la surveillance de la qualité de l'environnement.

Nous nous sommes intéressés aux marqueurs de stress oxydant en étudiant, d'une part, les taux de malondialdéhyde qui traduit la peroxydation des lipides membranaires et la toxicité cellulaire, et d'autre part, les niveaux de 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine, indicateurs de l'oxydation des bases de l'ADN. Les mesures de ces deux paramètres ont été associées aux mesures des activités antioxydantes et du glutathion, sous ses formes oxydées et réduites, et des cassures de l'ADN (test des Comètes), réalisées simultanément par deux autres chercheurs afin d'étudier la réponse des organismes exposés à divers profils de contamination.

La finalité de cette recherche est de déterminer (1) si l'exposition à des polluants induisant une peroxydation lipidique consécutive à un stress oxydant pouvait entraîner des lésions oxydatives à l'ADN, (2) si la guanine oxydée choisie comme marqueur de génotoxicité était représentative d'autres lésions structurales et fonctionnelles de l'ADN et (3) si le développement du processus délétère de la lipoperoxydation et de ses effets sur l'ADN sont liés à la saturation de la défense antioxydante.

L'existence d'espèces chimiques sous forme de radicaux libres dans l'organisme est une découverte qui a bouleversé notre compréhension des mécanismes conduisant à la mise en place de nombreuses pathologies dont le cancer. Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques et, ont pour rôle, par exemple, d'exercer un pouvoir bactéricide contre les foyers infectieux, mais la production peut devenir excessive ou entraîner des phénomènes toxiques dont l'organisme doit se protéger par différents systèmes antioxydants. Le déséquilibre entre la production et la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène constitue le stress oxydant. La production de radicaux libres peut être responsable de lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides), mais aussi de lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des produits libérés, notamment lors de la peroxydation des lipides.

La peroxydation des phospholipides membranaires induit des dysfonctionnements des membranes susceptibles de provoquer la lyse des organites intracellulaires et celle des biomolécules hydrolysées par les enzymes lysosomiales libérées. La cytotoxicité résultant de la lipoperoxydation est liée à la présence d'aldéhydes issus de la décomposition des hydroperoxydes lipidiques.

Ces aldéhydes très réactifs sont de puissants agents alkylants capables d'altérer les biomolécules dont l'ARN et l'ADN, et d'inhiber les systèmes de réparation de l'ADN.

Le malondialdéhyde (MDA) est le plus abondant des aldéhydes résultant de la lipoperoxydation et le plus utilisé comme marqueur de la peroxydation lipidique. La molécule d'ADN constitue une cible cellulaire importante pour les attaques radicalaires. Parmi les lésions oxydatives de l'ADN, la 8-hydroxylation de la guanine (8-OHdG) constitue la lésion prédominante. Cette base oxydée, en raison de sa détection aisée et de son potentiel mutagène reconnu, représente un paramètre de choix pour l'évaluation des dommages oxydatifs à l'ADN.

Peu d'études concernent la mesure de la lipoperoxydation et des dommages oxydatifs à l'ADN chez les invertébrés d'eau douce. La plupart des travaux ont été conduits sur les poissons et les invertébrés marins. Ces travaux ont surtout été réalisés en laboratoire et les études *in situ* utilisant les bivalves restent encore en nombre limité.

Nous avons choisi de conduire nos recherches sur les bivalves dulçaquicoles, qui constituent des organismes sentinelles des écosystèmes hydriques par leur capacité de filtration et d'accumulation des polluants. Leur mobilité réduite rend par ailleurs ces organismes intéressants dans les études d'impact des polluants présents dans le compartiment sédimentaire et dans les eaux interstitielles. L'étude de la lipoperoxydation et des dommages oxydatifs à l'ADN a été réalisée sur les glandes digestives et les branchies de la moule d'eau douce, *Unio tumidus*, qui est une espèce autochtone.

Dans la perspective d'étudier les relations entre l'induction de la lipoperoxydation et la formation de la 8-OHdG chez les invertébrés d'eau douce, nous avons,

- (1) validé le suivi du MDA sur 5 sites le long de la Moselle selon un gradient de contamination anthropique de l'amont vers l'aval. L'étude de la 8-OHdG a montré les répercussions possibles au niveau génomique d'une contamination à l'origine d'un stress oxydant.
- (2) estimé les relations possibles entre la mesure des taux de 8-OHdG, les cassures à l'ADN et les taux de MDA chez des bivalves soumis à un stress chimique, lors d'une intoxication en laboratoire.
- (3) entrepris le suivi du MDA et de la 8-OHdG au cours d'études de terrain dans le but d'étudier la qualité de milieux aquatiques lorrains et l'état biologique des populations autochtones sur une période de deux années. Les effets enregistrés lors de nos campagnes ont permis le diagnostic de l'altération du milieu et son impact sur les organismes exposés.

**SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**

1/ BIOMARQUEURS EN ECOTOXICOLOGIE

Le concept de biosurveillance (*biomonitoring*) repose sur l'utilisation de marqueurs biologiques de pollution, communément appelés biomarqueurs, qui révèlent l'exposition d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant. Selon l'une des premières définitions, un biomarqueur est une variation, induite par les xénobiotiques, de composants ou processus, structures, ou fonctions cellulaires ou biochimiques, qui peut être mesurée dans un échantillon ou un système biologique (National Research Council, 1987). Malheureusement, cette définition demeure suffisamment vague pour que soit dénommée biomarqueur toute perturbation, éventuellement causée par un xénobiotique, et observée sans toujours pouvoir être quantifiée, à n'importe quel niveau d'organisation biologique, de la molécule à la communauté ; certains auteurs vont même jusqu'à considérer le xénobiotique lui-même et/ou ses métabolites comme biomarqueurs lorsqu'il est possible de les mesurer au niveau des tissus (Timbrell *et al.*, 1994 ; Van Gestel et Van Brummelen, 1996).

Il est possible de distinguer trois types de biomarqueurs en écotoxicologie (National Academy of Sciences, 1989) : les biomarqueurs d'exposition à un xénobiotique, les biomarqueurs d'effets de l'exposition et les biomarqueurs de sensibilité aux effets provoqués par l'exposition.

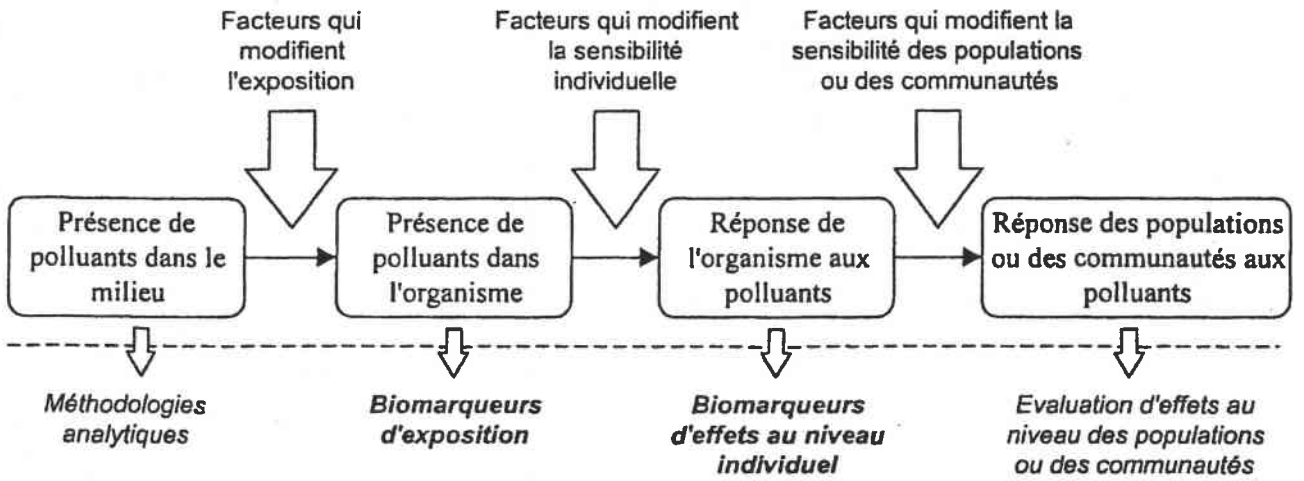
Les biomarqueurs d'exposition indiquent que le polluant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme. Généralement, les biomarqueurs d'exposition sont le résultat de l'interaction du polluant avec des molécules biologiques dans des tissus et/ou dans des liquides corporels. Par exemple, la formation d'adduits à l'ADN est couramment utilisée chez l'homme (Timbrell *et al.*, 1994) ou chez l'animal (Varanasi *et al.*, 1989 ; Van der Oost *et al.*, 1994) comme biomarqueur d'exposition à des molécules cancérogènes ou génotoxiques. Livingstone (1993) a suggéré que la formation d'adduits pourrait jouer un rôle similaire chez les invertébrés aquatiques exposés aux polluants organiques. Les biomarqueurs d'exposition vont réagir avec différentes classes de polluants : l'induction d'activité des cytochromes P450 1A est souvent considérée comme biomarqueur d'exposition aux HAPs et aux organochlorés de type polychlorobiphényles, PCDD ou carbamates (Lagadic *et al.*, 1997).

L'utilisation **des biomarqueurs d'effet** permet de montrer que le xénobiotique est entré dans l'organisme et qu'après avoir été distribué entre les différents tissus, il a exercé un effet, toxique ou non, sur une cible critique. Certains biomarqueurs peuvent être spécifiques d'un groupe taxonomique particulier ; d'autres peuvent concerner tous les organismes (protéines de stress par exemple). La spécificité des biomarqueurs dépend aussi de leur distribution tissulaire dans l'organisme et de la nature et des propriétés des composés toxiques en question. Les biomarqueurs plus spécifiques sont les réponses de l'organisme entier ou de tissus qui peuvent être associés à une classe particulière de xénobiotiques. Ces indices, spécifiques de xénobiotiques ou de tissus, regroupent des paramètres biochimiques, des altérations histopathologiques et cellulaires, et des réponses immunologiques (McCarthy et Shugart, 1990 ; Peakall, 1992 ; Peakall et Shugart, 1993).

La variation d'origine génétique de la réponse à la contamination par les polluants qui se traduit par une variation de la **sensibilité** (Depledge *et al.*, 1993 ; Forbes *et al.*, 1995) a suscité un grand intérêt lors des études portant sur l'exposition à des composés toxiques chez l'homme (Timbrell *et al.*, 1994). Par exemple, la résistance est définie comme une diminution de sensibilité d'origine génétique en réponse à la sélection par des molécules toxiques (Lagadic *et al.*, 1997).

Au regard des connaissances acquises dans ce sujet, la notion de biomarqueur a connu des modifications.

Evènements écotoxicologiques



Méthodologies d'évaluation des effets écotoxicologiques

Figure 1 : Représentation des méthodologies faisant appel à l'utilisation des biomarqueurs dans l'évaluation des risques écotoxicologiques (Lagadic *et al.*, 1997)

Selon l'une des premières définitions, un biomarqueur est une variation, inductible par les xénobiotiques, de composants ou processus, structures, ou fonctions cellulaires ou biochimiques, qui peut être mesurée dans un échantillon ou un système biologique (National Research Council, 1987). La définition qui sera retenue dans le cadre de ce travail est la suivante :

un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic *et al.*, 1997).

Ces bases ont permis d'envisager l'utilisation des biomarqueurs dans le milieu naturel, notamment dans le cadre des programmes de surveillance de la qualité de l'environnement (Peakall, 1992 ; Peakall et Shugart, 1993). Les biomarqueurs vont fournir des informations sur l'état de santé des individus (Figure 1).

Il est apparu nécessaire de développer des marqueurs de stress oxydant qui permettent d'exprimer un état précaire et d'évaluer le degré d'altération des organismes exposés aux espèces réactives. Pour ces raisons, les biomarqueurs des dommages oxydants sont nécessaires afin de suivre l'implication des espèces réactives dans la genèse des pathologies ou dans la toxicité des xénobiotiques.

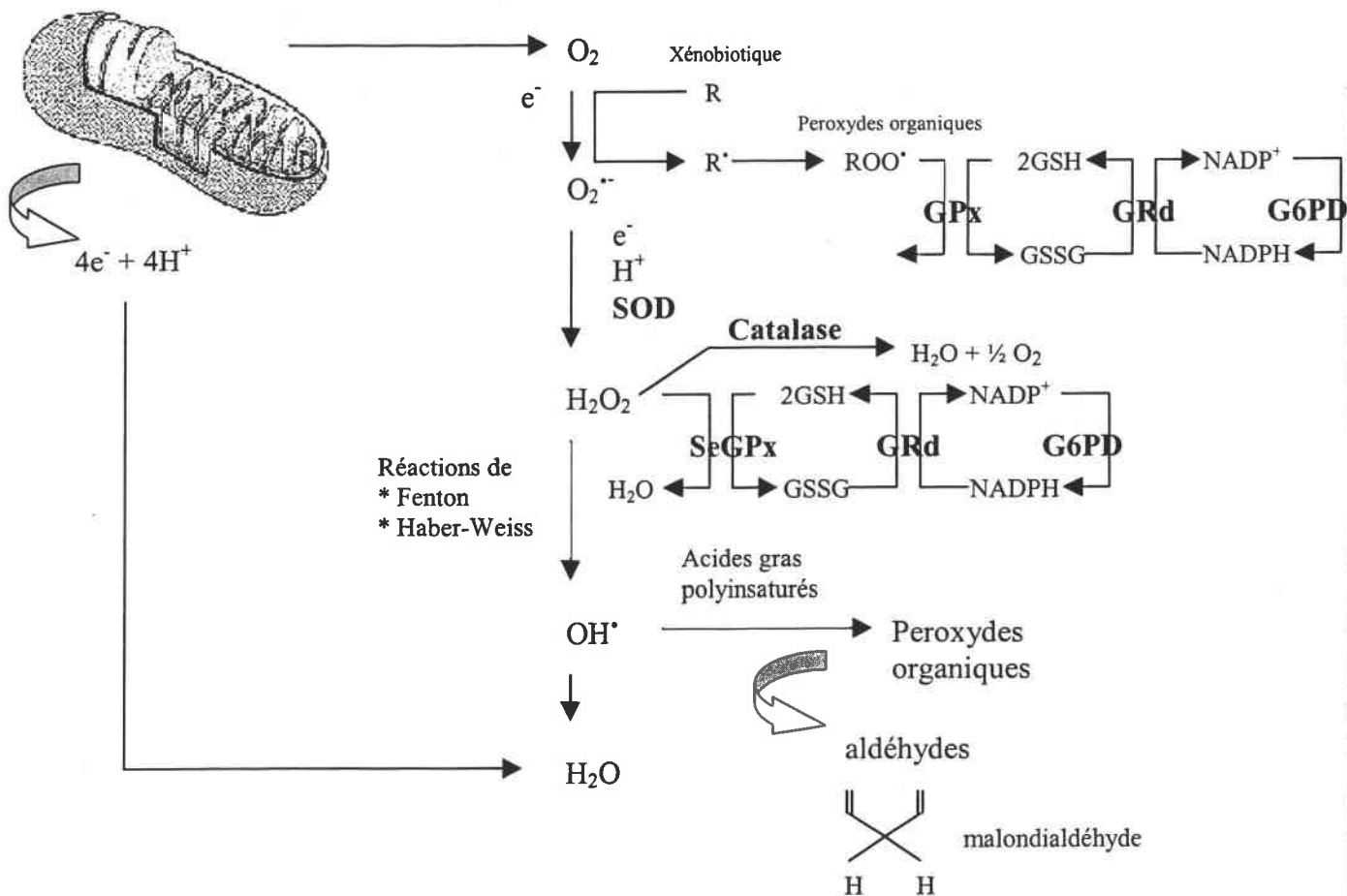


Figure 2 : Réductions de la molécule de dioxygène et actions conjointes des différentes enzymes antioxydantes

SOD : superoxyde dismutase, GRd : glutathion réductase, GPx : glutathion peroxydase, SeGPx : glutathion peroxydase sélénium-dépendante, G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase

2/ SOURCES DE PRODUCTION ET EFFETS DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE

L'oxygène moléculaire (O_2) est une molécule formée de deux atomes d'oxygène. A l'état fondamental, il est relativement peu réactif car il réagit seulement avec les molécules ayant comme lui deux électrons célibataires à spins parallèles. L'oxygène moléculaire doit être activé pour manifester sa toxicité soit par une activation photodynamique qui aboutit à l'oxygène singulet (1O_2), soit par une activation réductrice avec formation séquentielle de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du radical hydroxyle (OH^{\bullet}) (Figure 2) (Cossu *et al.*, 1997a). La formation de radicaux de l'oxygène s'effectue au niveau intracellulaire dans les mitochondries, les peroxysomes, le noyau, ainsi que dans le cytoplasme et le réticulum endoplasmique (Figure 3). La génération de ces espèces réactives peut s'effectuer dans le milieu extracellulaire par des phénomènes d'autooxydation de l'hémoglobine, des flavines réduites, des quinones réduites et des catécholamines.

A/ L'oxygène singulet

L'absorption d'une énergie suffisante par l'oxygène moléculaire peut inverser le spin de l'un des électrons célibataires de l'orbitale la plus externe.

Cette activation conduit à deux formes particulièrement réactives (1O_2) dites **oxygène singulet**, l'une non radicalaire (delta) qui n'a pas d'électrons impairs et n'est pas un radical, l'autre radicalaire (sigma) qui se dégrade rapidement en la forme delta (Halliwell et Gutteridge, 1984).

L'oxygène singulet peut participer à des réactions impliquant le transfert simultané de deux électrons (réduction divalente) et va pouvoir modifier directement l'ADN, les protéines et les lipides, malgré un temps de demi-vie court de 0,5 μ s (Epe, 1993).

B/ L'anion superoxyde

L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) résulte de la capture d'un électron par la molécule O_2 lors de réactions endergoniques (Cossu *et al.*, 1997a). Il est formé dans plusieurs processus physiologiques, par exemple chez les animaux par des cellules phagocytaires pour la destruction des particules étrangères et des complexes immuns (Babior, 1978), et chez les plantes dans la chaîne de transport d'électrons du chloroplaste. L'anion superoxyde est formé essentiellement au niveau des membranes biologiques, du fait de la solubilité beaucoup plus élevée de l'oxygène en milieu hydrophobe qu'en milieu aqueux (Gutteridge et Halliwell, 1993). Ce n'est pas la plus réactive des formes activées de l'oxygène. Il l'est cependant suffisamment pour endommager certaines cibles cellulaires, directement ou par l'intermédiaire des autres formes radicalaires qu'il engendre. Il se dismute en donnant du peroxyde d'hydrogène ; cette réaction de dismutation est fortement accélérée en présence d'enzymes particulières, les superoxydes dismutases (Fridovich, 1975).

Très stable en milieu hydrophobe, l'anion superoxyde contribue à la destruction des phospholipides membranaires par attaque nucléophile des liaisons esters entre les acides gras et le glycérol, on parle alors de la peroxydation lipidique.

L'anion superoxyde est chimiquement incapable d'endommager l'ADN mais il peut accélérer les attaques à l'ADN en augmentant les niveaux de fer libre (Keyer et Imlay, 1996). Le fer ainsi libéré des ferritines va pouvoir participer aux réactions de peroxydation des membranes cellulaires.

Environ 2% de l'oxygène utilisé par les mitochondries est réduit par des électrons qui s'échappent des transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire, formant ainsi l'ion superoxyde (Weil, 1990).

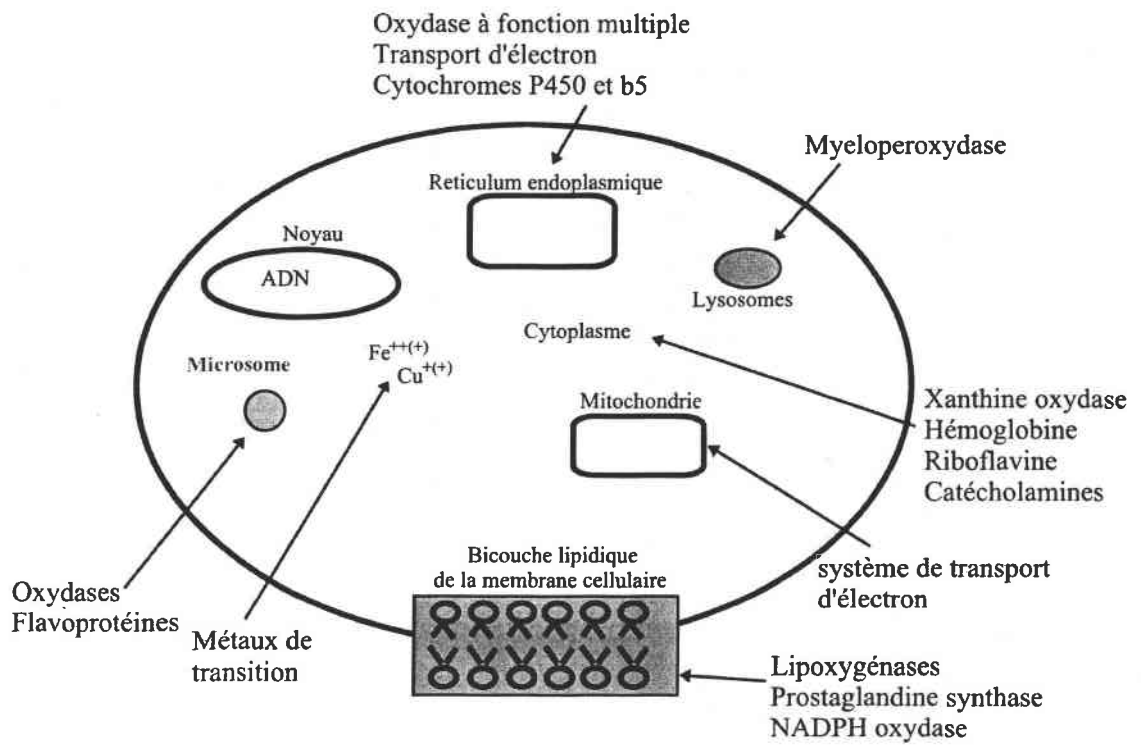
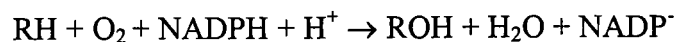


Figure 3 : Les sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène (d'après Kehrer, 1993)

Si cette production de radicaux superoxydes est faible et ne concerne qu'une petite partie de l'oxygène utilisé par la respiration, elle peut s'amplifier lorsque la respiration devient plus intense (effort physique) ou lorsque interviennent des désordres mitochondriaux d'origine génétique, inflammatoire ou nutritionnelle (carence en ubiquinone) (Ji, 1999). Les mitochondries restent la principale source de radicaux *via* les ubiquinones et le complexe III qui ne retiennent pas dans leur site actif les intermédiaires créés lors de la réduction de l'oxygène : ce qui aboutit au transport d' e^- et à la formation du radical superoxyde très nocif (Cardoso *et al.*, 1999).

L'inflammation est une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules du système immunitaire (Baschir *et al.*, 1993). La NADPH oxydase des phagocytes et des lymphocytes B catalyse la formation de l'anion superoxyde par la réduction d'un électron de l'oxygène et en présence de NADPH issu de la glycolyse par la voie des pentoses (Chanock *et al.*, 1992). Les neutrophiles sécrètent l'enzyme myéloperoxydase (MPO) qui catalyse la formation de chlore (Cl_2), l'anion superoxyde réagit avec le chlore pour donner l'hypochlorite (Merry *et al.*, 1989). L'anion superoxyde et les produits qui en dérivent (H_2O_2 et hypochlorite) jouent un rôle clef dans la bactériolyse puisque les sujets incapables de réduire l'oxygène moléculaire en anion superoxyde présentent des infections répétées (Belleville-Nabet, 1995).

L'activation de l'oxygène par les systèmes microsomaux à cytochromes P450 pour assurer les biotransformations produit parallèlement l'anion superoxyde. Ces systèmes assurent, en présence d'oxygène et d'une mono-oxygénase, l'hydroxylation de molécules saturées. Chaque mono-oxygénase dispose d'un système spécifique de transport d'électrons lui permettant d'assurer l'oxydation de nombreux xénobiotiques (R) en ROH (Pré, 1991) :



La fixation de l'oxygène moléculaire et du substrat (RH) sur le système cytochrome P450/ Fe^{++} conduit à la formation d'un complexe ternaire P450/ Fe^{++} /RH au sein duquel l'oxygène moléculaire en acquérant un électron du fer fait ainsi apparaître un anion superoxyde dans la structure. Cet anion superoxyde en présence de mono-oxygénase permet d'obtenir la forme hydroxylée ROH selon un mécanisme au cours duquel quelques anions superoxydes échappent à la réaction et sont libérés dans le milieu (Hildebrandt *et al.*, 1975).

Lors du processus d'inflammation, l'oxyde nitrique produit par les macrophages peut réagir avec l'anion superoxyde pour donner l'anion peroxynitrite (ONOO $^-$), un agent mutagène (induit des transversions G \rightarrow T) et qui diffuse dans les cellules (Burney *et al.*, 1999), du nitrosyle ONOOH, et le radical hydroxyle.

Le peroxynitrite est un médiateur cytotoxique majeur : l'initiation de la lipoperoxydation, l'inhibition directe de la chaîne de respiration mitochondriale, l'inactivation de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, l'inhibition de l'activité ATP-ase Na^+/K^+ membranaire, et d'autres modifications oxydatives des protéines contribuent aux effets néfastes de ce composé au niveau cellulaire (Szabo, 1996).

C/ Le peroxyde d'hydrogène

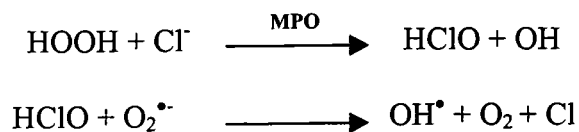
Le peroxyde d'hydrogène qui est formé par dismutation de l'anion superoxyde est modérément réactif (Cossu *et al.*, 1997a).

Il peut diffuser et franchir les barrières membranaires. Sa concentration intracellulaire est très faible, de l'ordre de 0,001 à 0,1 μM (Sies, 1981).

La réactivité connue du peroxyde d'hydrogène a été impliquée dans les phénomènes de mort cellulaire (Luo *et al.*, 1999) et ne se limite pas à sa capacité à former le radical hydroxyle très oxydant. Baeza-Squiban *et al.* (2000) ont montré qu'il induit un phénomène de stress au niveau des cellules trachéo-épithéliales de lapin *in vitro* en induisant une métaplasie squameuse associée aux tumeurs pulmonaires.

Les niveaux de peroxyde d'hydrogène dans le corps humain peuvent être contrôlés non seulement par le catabolisme mais également par l'excrétion, et il va ainsi jouer un rôle dans la régulation de la fonction rénale et comme un agent antibactérien dans les urines (Halliwell *et al.*, 2000).

Le peroxyde d'hydrogène en présence de chlorure est transformé par l'enzyme myeloperoxydase (MPO) des neutrophiles en hypochlorite (HOCl) qui sous l'influence de l'anion superoxyde, est transformé en radical hydroxyle, très réactif (Merry *et al.*, 1989).



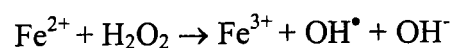
La réaction du peroxyde d'hydrogène et de l'oxyde nitrique peut produire le radical hydroxyle très cytotoxique. Les interactions entre ces deux composés représentent un mécanisme de réaction possible biologiquement qui peut expliquer les dommages induits par le radical hydroxyle dans les cellules même si des ions métalliques ne sont pas disponibles pour participer à la réaction de Fenton (Nappi et Vass, 1998).

La monoamine oxydase, à la fois intra et extracellulaire, produit au cours de la désamination oxydative du substrat, du peroxyde d'hydrogène qui peut réagir par exemple avec le fer pour donner le radical hydroxyle.

La voie de la xanthine oxydase (formation d'acide urique au dépend de l'hypoxanthine) est particulièrement importante dans l'endothélium des vaisseaux sanguins. Au cours de l'ischémie, l'activation d'une protéine kinase convertit la xanthine déhydrogénase, une enzyme qui ne produit pas d'espèces réactives de l'oxygène, en XO (xanthine oxydase). La dégradation de l'ATP cellulaire conduit à l'accumulation d'hypoxanthine (Goldhaber et Weiss, 1992) qui, en présence d'oxygène à la reperfusion, est transformée par la XO en xanthine, puis en acide urique. Cette production s'accompagne de la formation d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène (Durot *et al.*, 2000).

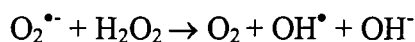
D/ Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle résulte de la fission homolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène (Cossu *et al.*, 1997a). Il est produit par des réactions thermiques, par les radiations ionisantes ou en présence de métaux de transition tels que le fer sous forme réduite selon la réaction décrite par Fenton (1894) *in vitro* (Singh et NathPathak, 1990). L'équation de la réaction avec les ions ferreux comme catalyseur est la suivante :



La mise en jeu *in vivo* de la réaction de Fenton a longtemps fait l'objet de controverses. Actuellement, la production du radical hydroxyle *in vivo* à partir d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène selon la réaction d'**Haber Weiss** catalysée par des métaux de transition (fer, cuivre) est admise. La première étape est la réduction du métal par l'anion superoxyde ; la deuxième étape fait intervenir le peroxyde d'hydrogène par la réaction de Fenton.

Le bilan est le suivant :



Cette réaction est inhibée par chélation du métal, notamment par la desferrioxamine dans le cas du fer^{III} (Gutteridge et Halliwell, 1993). Dans les systèmes biologiques, la biodisponibilité des ions ferreux limite la réaction mais, le recyclage du fer de la forme ferrique à la forme ferreuse par un agent réducteur peut maintenir en cours une réaction de Fenton provoquant la génération du radical hydroxyle.

Le radical hydroxyle réagit avec diverses molécules biologiques telles que les sucres, les acides aminés, les phospholipides, les bases de l'ADN et les acides organiques (Halliwell et Gutteridge, 1984). Il existe trois types de réaction de ce radical (Willson, 1978) :

- (i) l'abstraction d'un atome d'hydrogène (exemple du méthanol) :

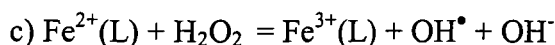
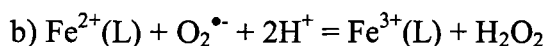
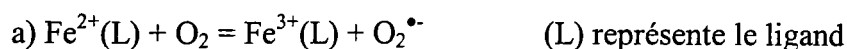
$$\text{CH}_3\text{OH} + \text{OH}^{\bullet} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OH}^{\bullet}$$
- (ii) l'addition, il peut ajouter au cercle aromatique des structures telles que des bases purines et pyrimidines de l'ADN ;
- (iii) le transfert d'électron (exemple avec l'ion chlorure) :

$$\text{Cl}^- + \text{OH}^{\bullet} \rightarrow \text{Cl}^{\bullet} + \text{OH}^-$$

La réactivité du radical hydroxyle est importante *in situ*, il réagira immédiatement avec les molécules biologiques proches de son lieu de formation et produira des radicaux secondaires à réactivité variable. Douki *et al.* (1998) ont observé une augmentation des taux de 8-OHdG et de 5-OHdC dans l'ADN hépatique et rénale de rats traités chroniquement par l'acide 5-aminolevulinique (ALA), un précurseur de l'hème. Ce qui indique l'implication du radical hydroxyle ou d'autres espèces réactives de l'oxygène *via* la réaction de Fenton dans les réactions d'oxydations *in vivo* de l'ADN médiées par l'ALA.

E/ Rôle des métaux de transition

L'autooxydation de l'ion ferreux va produire le radical hydroxyle (Biaglow et Kachur, 1997). Les complexes polyphosphatés de l'ion ferreux réduisent le dioxygène et les intermédiaires réactifs de l'oxygène selon les réactions décrites par Kachur *et al.* (1998) :



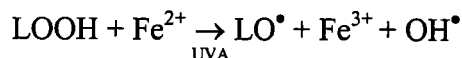
Les réactions (b) et (c) sont rapides, ce qui empêche l'accumulation du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène dans la solution, mais aboutit à la formation du radical OH^{\bullet} plus toxique. Yue Qian et Buettner (1999) supposent que la réaction des ions ferreux avec le peroxyde d'hydrogène n'est seulement qu'un initiateur mineur de l'oxydation par les radicaux libres ; les initiateurs majeurs des oxydations biologiques sont les espèces formées par la réaction du Fe^{2+} avec le dioxygène.

Les travaux de Shih et Hu (1999) indiquent qu'une irradiation aux UV A de noyaux hépatiques de rats augmente la peroxydation lipidique, mais aucune lésion à l'ADN n'est observée.

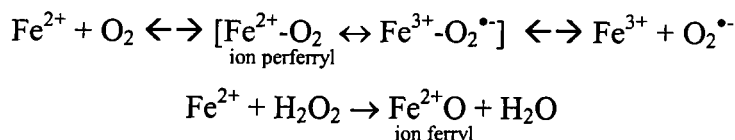
Tableau I : Exemples de métaux impliqués dans la génération des radicaux de l'oxygène

NOM	EFFETS AU NIVEAU CELLULAIRE	REFERENCES
Aluminium	Métal potentialisant la stimulation de la lipoperoxydation induite par le fer ferreux dans les synaptosomes isolés de rat	Amador <i>et al.</i> , 1999
Cadmium	Métal induisant une toxicité rénale et hépatique après absorption avec l'augmentation des taux de lipoperoxydes et une déplétion en SOD	Novelli <i>et al.</i> , 1998
Chrome	La réduction du chrome (VI) en chrome (V) par les mitochondries et certaines flavoenzymes va générer l'anion superoxyde et donner le peroxyde d'hydrogène via une réaction de dismutation	Shi <i>et al.</i> , 1999
Cuivre	Le système composé de cuivre (II) et de catéchol est générateur du radical hydroxyle très dommageable pour les cellules	Schweigert <i>et al.</i> , 2000
Mercure	Métal induisant indirectement une augmentation des radicaux de l'oxygène et de la lipoperoxydation car il inhibe les systèmes antioxydants (GPx, SOD)	Bulat <i>et al.</i> , 1998
Nickel	Le nickel va catalyser la génération de radicaux hydroxyles via la réaction d'Haber Weiss et stimuler la peroxydation lipidique dans le sérum et la moelle de rats	Chen <i>et al.</i> , 1999 Barceloux, 1999
Plomb	Génération du radical hydroxyle et induction du stress oxydant dans des cellules endothéliales isolées de rat.	Ding <i>et al.</i> , 2000

L'ajout d'ions ferreux dans le milieu durant l'exposition aux UV aboutit à la formation de dommages à l'ADN (8-OHdG et cassures) et à l'augmentation de l'oxydation des lipides membranaires selon la réaction :



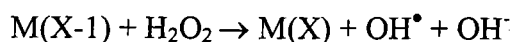
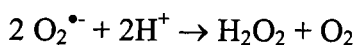
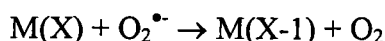
Le fer sous forme de complexes fer-oxygène, tels que l'ion perferryl ou l'ion ferryl, sera générateur de radicaux de l'oxygène. L'ion perferryl est un composé intermédiaire qui est produit par les complexes $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2$ ou $\text{Fe}^{3+}/\text{O}_2^{\bullet-}$ (Schafer *et al.*, 2000) :



En conséquence de leur haute affinité électronique, les ions perferryl et ferryl sont d'importants oxydants au détriment des tissus biologiques, avec une réactivité proche de celle du radical hydroxyle.

Le fer ferrique facilite l'initiation et/ou la propagation de la peroxydation des lipides membranaires en augmentant les niveaux de radicaux de l'oxygène générés par le complexe Fe^{2+} -citrate des mitochondries (Castilho *et al.*, 1999). Rodenas *et al.* (2000) ont montré que la peroxydation des lipides peut se produire en l'absence de fer par un mécanisme médié par le peroxydant qui est généré par les leucocytes au niveau de site d'inflammation.

D'autres métaux que le fer (comme le cuivre, le chrome, le nickel ou l'aluminium) vont pouvoir participer à ces réactions de transfert d'électrons par passage d'un état oxydé à un état réduit (Tableau I) *via* la réaction de **Fenton**. Ces espèces métalliques (M) vont donc jouer un rôle important dans des manifestations toxiques selon la réaction (d'après Stohs et Bagchi, 1995) :



Les composés nickel divalents se lient aux groupements sulfhydrique, azo, et amino de macromolécules, incluant les acides nucléiques et les protéines. Le nickel sous la forme de chlorures va catalyser la génération du radical hydroxyle *via* la réaction de Haber-Weiss dans le sérum et les cellules osseuses brunes de rat (Chen *et al.*, 1999).

Le système composé de Cu(II) et de catéchol est générateur du radical hydroxyle très dommageable pour les cellules (Schweigert *et al.*, 2000).

3/ LES SYSTEMES ANTIOXYDANTS

Dans des conditions physiologiques normales, les systèmes cellulaires sont soumis à des attaques continues par des facteurs de stress d'origine endogènes et/ou exogènes. L'organisme réagit par un ensemble complexe de systèmes de protection afin de limiter les actions de ces agents. Ces moyens de protection forment un système de défense antioxydant qui consiste en un ensemble de biomolécules, enzymatiques ou non, dont le rôle est de prévenir la génération de radicaux libres et/ou de les piéger.

La production des radicaux de l'oxygène et des défenses antioxydantes sont maintenues en équilibre *in vivo*. Un déséquilibre de la balance prooxydants-antioxydants en faveur des espèces réactives va créer une situation de stress oxydant amenant des dommages tissulaires et la possibilité de maladies chroniques (Sies, 1991).

Les trois groupes d'action antioxydante développés par les organismes vivants sont :

- les enzymes qui limitent la formation initiale de radicaux de l'oxygène des composés organiques (radicaux peroxydes et alkoxydes),
- les antioxydants 'piégeurs ou éboueurs' (*scavengers*) qui désactivent les radicaux libres et brisent les chaînes de réaction radicalaires. De très nombreux constituants alimentaires peuvent avoir ce comportement tels que les polyphénols, les alcaloïdes, les vitamines. Des composés endogènes jouent le même rôle, dont les plus importants sont le glutathion réduit et les vitamines C et E,
- une troisième ligne de défense consiste en un système de réparation pour les acides nucléiques endommagés, les protéines et les lipides.

A/ Les enzymes de protection

Il faut bien avoir en mémoire que la protection des organismes n'est pas assurée de façon homogène par tous les antioxydants. La concentration des différents enzymes et piégeurs est très inégale selon les tissus. De plus à l'intérieur d'une cellule, des compartiments comme les peroxysomes, les mitochondries, le cytosol ou la membrane disposent de protections différentes et spécifiques. Il existe trois types d'enzymes antioxydantes majeures qui sont mises en œuvre pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène : les superoxyde dismutases, les glutathion peroxydases et les catalases.

a/ Les superoxyde dismutases

La première description de cette enzyme par Mc Cord et Fridovich (1969) a été réalisée dans des érythrocytes de bovins. Elles comportent un métal de transition (fer, manganèse, cuivre ou zinc) dans leur site actif (Cossu *et al.*, 1997a). L'ion métallique va capter un électron de l'anion superoxyde par une réaction de dismutation et le transférer au noyau imidazole de l'une des histidines du site actif selon la réaction:



Il existe deux formes de SOD :

- La première forme de SOD utilise le cuivre et le zinc et est notée CuZn-SOD. Chez les bactéries, elle est codée par le gène *sod C*.

Le zinc n'a pas d'action catalytique et sert à stabiliser le site actif (Cossu *et al.*, 1997a). Une forme extracellulaire de cette enzyme existe et permet la défense contre les radicaux oxygénés dérivant des phagocytes extracellulaires (De Groote *et al.*, 1997). En 1974, la CuZn-SOD a été isolée par Puget et Michelson à partir de *Photobacterium leiognathi*, alors qu'elle n'avait été détectée que chez les eucaryotes précédemment. Les effets protecteurs de cette enzyme sont importants, par exemple, Kimura *et al.*, (2000) ont démontré ses effets inhibant le relargage de lactate déshydrogénase et de lutte contre l'apoptose dans des lignées de fibroblastes soumis à un rayonnement UV. Le cuivre est un cofacteur catalytique de CuZn-SOD et des céruloplasmines. Pan et Loo (2000) ont montré qu'une déficience en cuivre dans les lymphocytes T compromettrait les systèmes de défense antioxydants.

- D'autres SOD emploient le manganèse ou le fer comme métal catalytique et sont nommées Mn-SOD et Fe-SOD (Morrissey et O'Brien, 1998). Chez les bactéries, ces formes sont codées par deux gènes *sod A* et *sod B* pour la Mn-SOD et la Fe-SOD respectivement. La Mn-SOD est présente chez les archéobactéries, et chez les eucaryotes au niveau de la matrice mitochondriale exclusivement. La Fe-SOD est présente chez les eubactéries, et les chloroplastes de certaines plantes (Lynch et Kuramitsu, 2000).

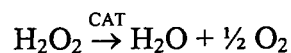
Ces superoxydes dismutases sont toutes inactivées de façon réversible par l'élimination du métal du site actif, sous l'influence de chélateurs par exemple. Les Fe-SOD et les CuZn-SOD sont inhibées par le peroxyde d'hydrogène (Yim *et al.*, 1990).

Paller et Eaton (1995) ont montré que la combinaison de la SOD avec le glutathion réduit élimine le pouvoir protecteur de ces antioxydants et induit la formation de radicaux thionyl toxiques et/ou du peroxyde d'hydrogène provoquant des lésions cellulaires.

b/ La catalase et les glutathion peroxydases

Les peroxydes sont continuellement générés dans les cellules et doivent être éliminés pour empêcher les dommages oxydatifs. Dans le cerveau par exemple, le peroxyde généré en larges quantités est le peroxyde d'hydrogène, c'est le produit de réaction catalysée par la SOD et d'autres oxydases.

• **La catalase (CAT)** est une hémoprotéine tétramérique de 240 kDa, présente dans les hématies et les peroxysomes hépatiques, ayant pour cofacteur un atome de fer (Sokolova *et al.*, 2001). Elle réduit rapidement le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire via la réaction :



Sa localisation peroxysomale en fait une enzyme antioxydante complémentaire de la glutathion peroxydase sélénium-dépendante contre la peroxydation induite par le peroxyde d'hydrogène. L'activité catalasique est présente chez les mammifères, les vertébrés et invertébrés aquatiques et les procaryotes (Saint-Denis *et al.*, 1998). La catalase est localisée dans les peroxysomes et les glyoxysomes. La baisse d'activité de la catalase, observée par exemple par Ray *et al.* (2000) dans des tissus issus de tumeurs du sein, entraîne des augmentations des taux de peroxyde d'hydrogène qui vont amener la formation du radical OH^\bullet et initier la lipoperoxydation.

Tableau II : Antioxydants non enzymatiques

COMPOSE	ORIGINE ET EFFETS	REFERENCES
α-tocophérol	= vitamine E, antioxydant liposoluble phénolique, piègeur de radicaux oxygénés	Noguchi et Niki, 2000 Sakuma <i>et al.</i> , 1998 Kelly <i>et al.</i> , 1998 Sen <i>et al.</i> , 2000 Dmitriev et Ivanova, 1994
Ubiquinol Q10	Antioxydant liposoluble	Witting <i>et al.</i> , 1998 Portakal <i>et al.</i> , 2000
Caroténoïdes	Pigments lipophiles synthétisés par les plantes et les microorganismes	Duthie <i>et al.</i> , 1998 Palacios <i>et al.</i> , 1999 Bast <i>et al.</i> , 1998
Glutathion	Thiol très abondant dans les organismes vivants, synthétisée par la γ GlutamylCystéine-synthétase et la Glutathion-synthétase, stocke la cystéine	Deneke et Fanburg, 1989 Mundays et Winterbourn, 1989 De Leve et Kaplowitz, 1990 Chung <i>et al.</i> , 2000 Dringen, 2000 Penninckx, 2000
Acide ascorbique	= vitamine C, antioxydant hydrosoluble, puissant agent réducteur	Kelly <i>et al.</i> , 1998 Cozzi <i>et al.</i> , 1997 Drake <i>et al.</i> , 1996
Acide urique	Lutte contre radicaux hydrosolubles tels radical hydroxyle	Ames <i>et al.</i> , 1981
Flavonoïdes	Capteurs de radicaux	Lebeau <i>et al.</i> , 2001
Elements traces	Cofacteur de nombreuses enzymes antioxydantes telles superoxyde dismutase et les peroxydes	Tato <i>et al.</i> , 1994
Salicylates	Oxydation induite par l'anion superoxyde et l'oxyde nitrique des lipoprotéines de basse densité (<i>in vitro</i>)	Hermann <i>et al.</i> , 1999
Acide dipicolinique	Issu des spores de microorganismes, agent chélateur de métaux (<i>in vitro</i>)	Murakami <i>et al.</i> , 1998
Mélatonine	Hormone pinéale, piège les oxyradicaux et le peroxydant, inhibe la réponse inflammatoire et l'expression des NO synthases (<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>)	Reiter, 1996a Reiter, 1996b Cuzzocrea <i>et al.</i> , 1997 Akbulut <i>et al.</i> , 1998
Nicanartine	Prévient l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (<i>in vitro</i>)	Dailly, 2000
Hémine	Prévient l'oxydation des membranes érythrocytaires (<i>in vitro</i>)	Dailly, 2000
Cuivre	Préexposition à de faibles concentrations (10 ppb) de cuivre limitent les dommages oxydatifs induits par l'endosulfane dans le foie de poissons	Pandey <i>et al.</i> , 2001
Glycine Taurine Méthionine	Piégeurs de l'acide hypochloreux, impact thérapeutique pour limiter l'altération des lipoprotéines de basse densité (<i>in vitro</i>)	Jerlich <i>et al.</i> , 2000
Tempol	Piégeur de l'anion superoxyde, réduit le stress oxydant au niveau rénal (<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>)	Chatterjee <i>et al.</i> , 2000
Biliverdine et Bilirubine : métabolites de l'hémoglobine	Pigments biliaires qui inhibent la peroxydation lipidique dans le cerveau (<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>)	Van Bergen <i>et al.</i> , 1999
Antibiotiques : (Tétracycline, Rifamycine, Rifampicine)	Protection contre le peroxydant et inhibent la nitration de la tyrosine (<i>in vitro</i>)	Whiteman et Halliwell, 1997
β-carbolines : Tryptoline et Pinoline	Antioxydants issus du système nerveux des mammifères : action neuroprotective (<i>in vitro</i>)	Garcia <i>et al.</i> , 2000
CGP 2881	Molécule de structure similaire au probucol (composé phénolique) inhibent l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>)	Feldman <i>et al.</i> , 1999
Agents phénoliques: BO-653 et HTHQ	Inhibent l'oxydation des lipoprotéines de basse densité et les effets carcinogènes des amines hétérocycliques (<i>in vitro</i>)	Hirose <i>et al.</i> , 1999 Noguchi et Niki, 2000

• Il existe deux formes distinctes de **glutathion peroxydases** :

- l'activité glutathion peroxydase sélénium-dépendante (SeGPx) qui catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes organiques tels que l'hydroperoxyde du cumène.

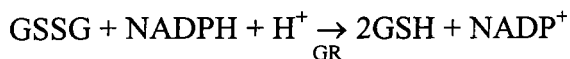
- La glutathion peroxydase sélénium-indépendante, assimilée à une isoenzyme de glutathion S-transférase, réduit les peroxydes organiques uniquement (Almar *et al.*, 1998).

La glutathion peroxydase sélénium-dépendante a été découverte par Mills en 1957 dans les erythrocytes de bovins : c'est une métalloenzyme tétramérique (80 000 daltons). L'activité de cette enzyme est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium : un déficit en sélénium entraîne une diminution d'activité qui est associée à l'apparition de nécroses et de réactions inflammatoires (Jovanovic *et al.*, 1997). C'est une séléno-enzyme (Flohe *et al.*, 1973) formée de 4 sous-unités identiques portant chacune, au niveau du site actif, un atome de sélénium sous forme de sélélocystéine. Présent dans le cytosol et les mitochondries, cette enzyme catalyse la réduction de l'eau oxygénée et des hydroperoxydes (Cossu *et al.*, 1997a). Dans le cerveau, cette enzyme est primordiale parce qu'elle peut interagir directement avec les peroxydes lipidiques (Singh et NathPathak, 1990).

En 1976, Lawrence et Burk ont découvert l'existence d'une glutathion peroxydase sélénium indépendante (Se-indGPx) qui ne peut réduire que les peroxydes organiques. Cette enzyme dimérique de 50 000 daltons serait une glutathion transférase ayant une activité peroxydasique et localisée majoritairement dans le réticulum endoplasmique.

c/ La glutathion réductase

La glutathion réductase (GR) est une enzyme importante pour le maintien d'une activité glutathion peroxydasique. C'est une flavoprotéine dimérique qui joue un rôle à part entière dans le processus de détoxification. Cette enzyme réduit le glutathion oxydé (GSSG, glutathion disulfide) en présence de NADPH, issu de la voie des pentoses phosphates, de manière à régénérer les niveaux de glutathion réduit (Kelly *et al.*, 1998) :



B/ Les antioxydants non enzymatiques

L'action protectrice enzymatique est complétée par celle de différents antioxydants non enzymatiques se comportant comme des piègeurs de radicaux. Les molécules jouant un rôle antioxydant sont présentées dans le tableau II.

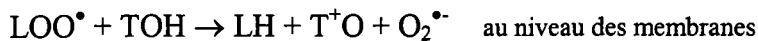
a/ Les antioxydants liposolubles

* L'**α-tocophérol** (α-TOH), biologiquement et chimiquement, est la forme la plus active et la plus abondante de la vitamine E. C'est un important antioxydant liposoluble présent dans les cellules. Il appartient à la famille des antioxydants phénoliques (Noguchi et Niki, 2000). Il joue un rôle important contre l'athérogénèse : il protège les lipoprotéines contre les modifications peroxydatives *in vivo* (Sakuma *et al.*, 1998).

L'activité principale du tocophérol est de stopper la chaîne de propagation des radicaux peroxydes : deux radicaux de l'oxygène sont piégés par molécule de tocophérol (Kelly *et al.*, 1998).

La vitamine E est régénérée par la vitamine C, au niveau cytosolique, elle-même régénérée par des enzymes, les ascorbate réductases (Sen *et al.*, 2000).

L' α -tocophérol bloque la peroxydation des cellules lipidiques induite dans les lipoprotéines oxydées. Dans les membranes biologiques oxydées, la réaction du tocophérol avec le radical peroxyde formé résulte en la formation d'une molécule lipidique et de l'anion superoxyde (Dmitriev et Ivanova, 1994) :



* Un autre antioxydant liposoluble qui contribue à la protection de la bicouche lipidique contre le stress oxydant est l'**ubiquinol Q₁₀** (ou co-enzyme Q₁₀, CoQ₁₀). C'est un composé intrinsèque du système de transport d'électrons mitochondrial. Le coenzyme Q₁₀H₂, la forme réduite du coenzyme Q₁₀, est nécessaire à la protection des couples lipoprotéines de basse densité libres-ascorbate exposés aux peroxydes aqueux et lipophiles, aux ions métalliques (Cu²⁺, Fe³⁺), aux neutrophiles activés, aux macrophages/monocytes stimulés, à l'oxyde de chlore, à l'oxygène singulet, à l'anion peroxyde et à l'oxyde nitrique (Witting *et al.*, 1998). Dans les lipoprotéines, le co-enzyme Q₁₀H₂ agit comme un coantioxydant de l' α -tocophérol, permettant la régénération de la vitamine. Une étude de Portakal *et al.* (2000) montre que l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules issues de tumeurs du sein s'accompagne de la surexpression des enzymes antioxydantes (SOD, GPx, CAT) et de la consommation du co-enzyme Q₁₀. La forme réduite du coenzyme ne joue pas seulement un rôle contre la lipoperoxydation mais également contre les dommages oxydatifs aux protéines et à l'ADN.

* Les **caroténoïdes** sont des pigments lipophiles qui absorbent la lumière dans la région de 400 à 500 nm du spectre visible. Ils sont synthétisés par les microorganismes photosynthétiques et les plantes, mais pas par les animaux (Duthie *et al.*, 1998). Les caroténoïdes, ingérés par voie alimentaire, sont connus pour inhiber la peroxydation lipidique dans les microsomes de foie de rat et les mitochondries (Palacios *et al.*, 1999). Parmi l'ensemble des caroténoïdes, deux vont servir d'analogues de la provitamine A, l' α et le β -carotène qui sont d'efficaces antioxydants contre l'oxygène singulet et le radical peroxyde (Bast *et al.*, 1998).

b/ Les antioxydants hydrosolubles

* Le **glutathion** (L- γ -glutamyl-L-cystéinyglycine) est le thiol non-protéique le plus abondant dans les organismes vivants (Penninckx, 2000). Il est présent majoritairement à l'état réduit (GSH) dans les cellules. Le glutathion est synthétisé *in vivo* par l'action consécutive de deux enzymes : la γ glutamylcystéine-synthétase et la glutathion-synthétase (Dringen, 2000). Ces enzymes sont activées en présence de mutagènes tels que l'Aflatoxine B1, le B(a)P, le 1-Nitropyrene (Ketterer, 1988). Le glutathion est synthétisé dans divers types cellulaires : il est présent à des taux de 12 mM dans les cellules de mammifères (Dringen, 2000). Il agit comme un antioxydant, il participe aux réactions de détoxification des xénobiotiques et il stocke et transporte la cystéine. Le glutathion agit comme un donneur d'électrons, permettant de désactiver les espèces réactives comme le radical hydroxyle et les radicaux phénoxy, mais surtout comme substrat des glutathion peroxydases pour la réduction des peroxydes (Deneke et Fanburg, 1989 ; Mundays et Winterbourn, 1989 ; De Leve et Kaplowitz, 1990).

La cytotoxicité induite dans les cellules endothéliales par l'oxyde nitrique et/ou l'anion superoxyde peut être bloquée par le glutathion (Chung et al., 2000).

Il intervient aussi dans la conjugaison des substances électrophiles, catalysée par des glutathion transférases. A pH=7, le glutathion, sous sa forme anionique (GS⁻), inactive l'oxygène singulet (Cadenas, 1989).

Une augmentation de la forme oxydée du glutathion (GSSG) traduit un stress oxydant (Akerboom et Sies, 1990 ; Pocerlich *et al.*, 2000).

* L'**acide ascorbique** (vitamine C) existe à l'état d'ascorbate à pH physiologique et c'est un antioxydant soluble dans l'eau (Kelly *et al.*, 1998). L'ascorbate est un puissant agent réducteur qui réagit directement avec l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et les hydroperoxydes lipidiques. L'ascorbate, comme le β -carotène, luttent contre les dommages induits par le peroxyde d'hydrogène et par la bléomycine, dans les cellules d'ovaires de hamsters cultivées *in vitro* (Cozzi *et al.*, 1997). L'acide ascorbique a des propriétés anticarcinogéniques ; ainsi, Drake *et al.* (1996) ont démontré l'intérêt d'un régime riche en vitamine C pour lutter contre les cancers gastriques chez l'homme. De plus, l'ascorbate va régénérer au niveau cytosolique la vitamine E et ainsi, prolonger la durée de vie de cet antioxydant. Paradoxalement, sous certaines conditions (faible concentration, présence d'ions métalliques), l'acide ascorbique peut agir comme un prooxydant en augmentant les dommages oxydatifs aux lipides, à l'ADN et aux protéines (Griffiths et Lunec, 2001).

* L'**acide urique** présente une activité antioxydante, à des concentrations physiologiques (300 μ M dans le plasma), vis-à-vis des radicaux hydrosolubles tels l'hydroxyle (Ames *et al.*, 1981). Il reste inefficace contre les générateurs de radicaux liposolubles.

* D'autres dérivés naturels comme les **flavonoïdes** sont également des capteurs de radicaux (Lebeau *et al.*, 2001). Ils peuvent réduire les lésions provoquées par les radicaux de l'oxygène dans le tissu cardiaque après une ischémie.

* Les **éléments traces** (zinc, sélénium, cuivre, manganèse et chrome) jouent un rôle important dans les mécanismes de défense antioxydants. Par exemple, un déficit en sélénium entraîne une diminution de l'activité de la glutathion peroxydase sélénium-dépendante associée à l'apparition de nécroses et de réactions inflammatoires (Jovanovic *et al.*, 1997).

C/ Les protéines de fixation des métaux

Un autre système de protection consiste à séquestrer les métaux sous forme libre impliqués dans la production des espèces radicalaires.

La transferrine maintient le fer libre plasmatique à des niveaux très faibles (Gutteridge *et al.*, 1982). La lactoferrine est produite par les neutrophiles et joue le même rôle que la transferrine. La céruloplasmine fixe les ions cuivre et oxyde le fer ferreux. L'albumine fixe également les ions cuivre (Gutteridge et Wilkins, 1983).

La nature antioxydante des métallothionéines est connue chez les mammifères ; en ce qui concerne les invertébrés, Viarengo *et al.* (1999, 2000) ont montré chez *Mytilus galloprovincialis* que les métallothionéines inhibent la réaction de Fenton et donc, réduisent le stress oxydant en se liant aux métaux de transition tels que le fer et le cuivre.

4/ CONSEQUENCES DES REACTIONS RADICALAIRES

Les métabolites dérivés de l'oxygène s'attaquent à tous les constituants cellulaires possédant un groupement nucléophile. Ils seront responsables de lésions directes de molécules biologiques mais aussi, de lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des produits libérés, notamment lors de l'oxydation des lipides.

Les principales cibles des réactions radicalaires sont :

- ◆ les lipides des membranes biologiques,
- ◆ les protéines,
- ◆ l'ADN.

A/ La peroxydation lipidique

Les réactions des radicaux libres de l'oxygène avec les lipides polyinsaturés ont été étudiées pour leur implication dans le processus de rancissement et les modifications de la sapidité en nutrition. Les lipides sont particulièrement sensibles à l'oxydation, surtout ceux formés d'acides gras polyinsaturés comme dans les membranes cellulaires (Ibrahim *et al.*, 1999). Une étude de Herrero *et al.* (2001) montre que le degré d'insaturation des acides gras des membranes mitochondriales joue un rôle important dans la genèse d' H_2O_2 et les dommages oxydatifs consécutifs à la lipoperoxydation. Les acides gras monoinsaturés, comme l'acide oléique, qui comportent une seule double liaison sont moins sensibles aux attaques radicalaires.

Le mécanisme précis de la lipoperoxydation est très controversé. Une réaction directe de la molécule d'oxygène avec un acide gras polyinsaturé est empêchée par les barrières de spin des molécules et les contraintes thermodynamiques (Minotti, 1993). Ainsi, la lipoperoxydation peut être précédée par des modifications de la structure électronique de l'acide gras et/ou de l'oxygène. De plus, il ne faut pas écarter le rôle joué par les métaux de transition, tels que le fer ou le cuivre, qui vont pouvoir osciller d'un état réduit à un état oxydé et, perturber la balance redox des systèmes biologiques.

La peroxydation lipidique médiée par les radicaux libres se subdivise en trois phases successives : initiation, propagation et terminaison (Halliwell et Gutteridge, 1984).

- i. **Initiation** : C'est la formation d'un radical lipidique par la perte d'un atome d'hydrogène de l'acide gras cible suite à une attaque radicalaire. L'espèce radicalaire peut provenir de la métabolisation de xénobiotique ou même être une molécule radicalaire de l'environnement. La phase d'initiation conduit à la formation d'un radical libre d'acide gras polyinsaturé, se stabilisant par un remaniement électronique conduisant à la formation de deux diènes conjugués.
- ii. **Propagation** : Le radical carboné réagit avec l'oxygène pour former un radical lipoperoxyde. Ce radical réagit avec un lipide membranaire adjacent, et engendre simultanément, un hydrolipoperoxyde et un radical lipoperoxyde, assurant ainsi la propagation du processus. Les formes ionisées des métaux de transition participent activement à cette phase de propagation. L'hydrolipoperoxyde est instable en présence de fer et d'autres métaux qui vont servir de catalyseur dans la réaction de Fenton amenant la formation de radicaux alkoxydes (Cheeseman, 1993).

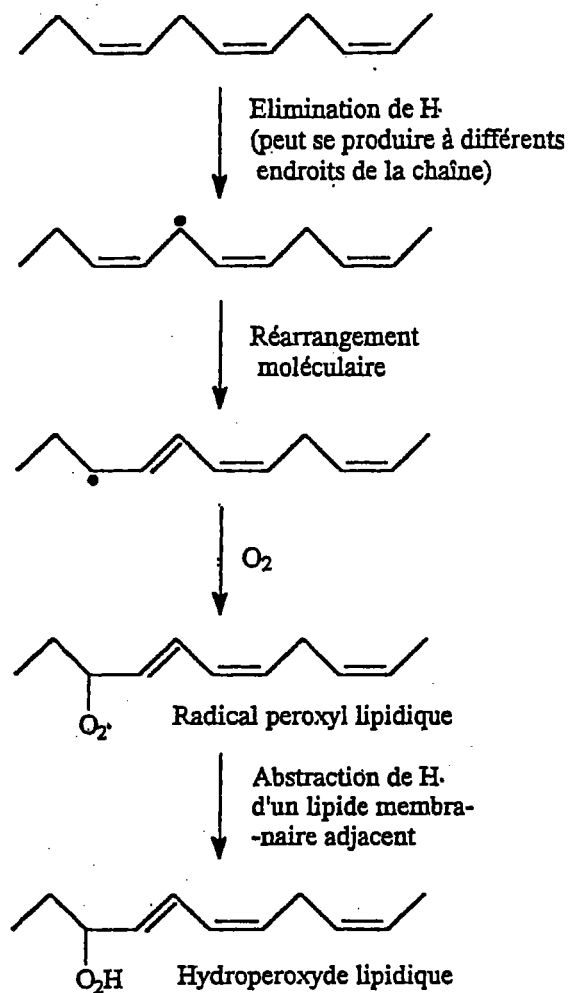


Figure 4 : Mécanisme de la lipoperoxydation. L'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir d'un acide gras à 3 doubles liaisons est représentée. (Doyotte, 1998)

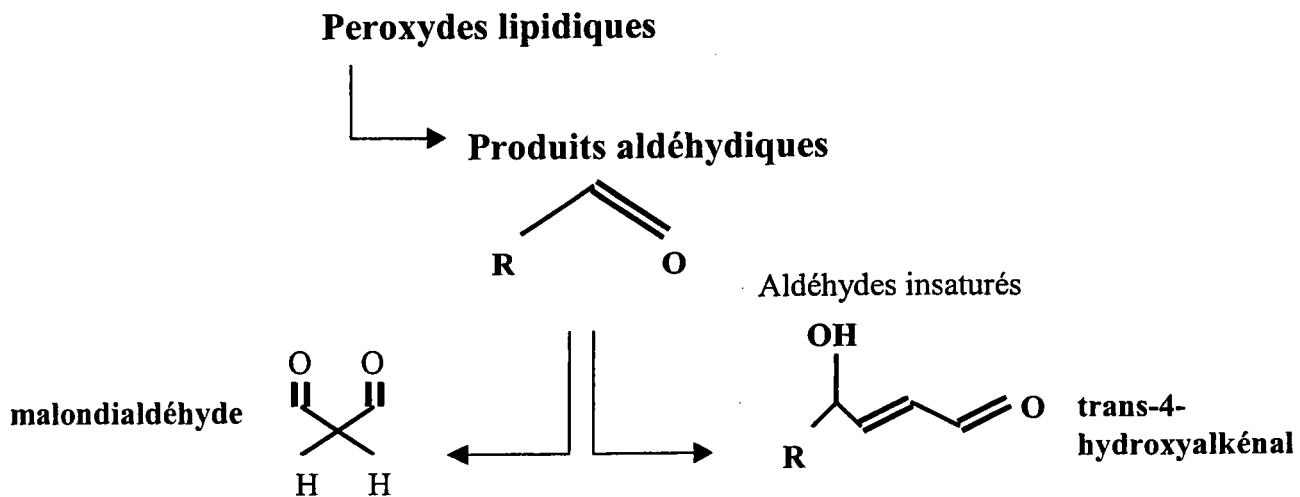


Figure 5 : Produits formés lors de la lipoperoxydation (De Zwart L.L. *et al.*, 1999)

iii. Terminaison: Chaque radical lipoperoxyde est à l'origine d'une centaine de molécules d'hydrolipoperoxydes. La phase de terminaison consiste en la formation de composés stables issus de la rencontre de deux espèces radicalaires (Halliwell *et al.*, 1992).



Cette phase n'est pas immédiate car la probabilité de rencontre entre deux radicaux libres est beaucoup plus faible que celle entre un radical libre et des acides gras polyinsaturés.

La lipoperoxydation conduit à la formation de différents hydrolipoperoxydes (figure 4) qui, du fait de leur instabilité en présence d'ions ou de métaux de transition, sont à l'origine de « composés de coupures » constitués d'aldéhydes, d'acides gras et de traces d'hydrocarbures (éthane, pentane) (Wade et Van Rij, 1985). Parmi les aldéhydes, on retrouve le malondialdéhyde (MDA), issu de l'oxydation des insaturations maloniques présentes dans les acides gras polyinsaturés (Frankel, 1983) et les hydroxyalkénals (Esterbauer, 1993), dont le 4-hydroxynonénal. La figure 5 montre certains produits aldéhydiques formés lors de la peroxydation lipidique. La formation de dérivés d'oxydation dans les bicouches lipidiques entraîne des perturbations de la micro-architecture membranaire et altère les fonctions des enzymes et des transporteurs membranaires.

Le malondialdéhyde

Le malondialdéhyde (MDA) est un β -dialdéhyde tricarboné produit de la peroxydation des acides gras polyinsaturés possédant au moins trois doubles liaisons (acide arachidonique, acide éicosapentaénoïque, acide docosapentaénoïque, acide gamma-linolénique). Le malondialdéhyde peut également être formé à partir de composés non lipidiques tels que l'acide ascorbique, le désoxyribose ou le saccharose lorsqu'ils sont exposés à l'action des radicaux hydroxyles, en présence de métaux par exemple (Janero, 1990). Il est formé *in vivo* lors de la biosynthèse des prostaglandines et des éicosanoïdes (Gavino *et al.*, 1981). Le MDA est également un excellent substrat des peroxydases (Lefèvre *et al.*, 1998). Les lipoperoxydes plaquettaires sont à l'origine d'une partie du malondialdéhyde sanguin (Lepage *et al.*, 1994).

Le malondialdéhyde va altérer différents constituants du plasma comme les protéines, le glutathion et les acides aminés (Londero et Lo Greco, 1996 ; Cighetti *et al.*, 1999 ; Pilz *et al.*, 2000). Par ses fonctions aldéhydiques, il est susceptible de réagir avec les fonctions amine et thiol (Cighetti *et al.*, 1999). Ainsi, la forte réactivité de la fonction aldéhyde vis-à-vis de la fonction amine primaire entraîne la formation d'une base de Schiff ($>C=N-$), caractérisée par une liaison labile en milieu acide ou alcalin (Kikugawa et Sugimura, 1986).

Le MDA réagit avec l'ADN pour produire un adduit majeur, le M1G ou 3-(2'-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)-pyrimido[1, 2-a]purin-10(3H)-one, qui est mutagène (Nestmann *et al.*, 1996). Le M1G est détecté dans l'ADN de cancéreux au niveau du foie, des lymphocytes, du pancréas et du sein à des niveaux de 1-120 M1G / 10^8 nucléotides (Marnett, 1999).

B/ Les lésions aux protéines

Les protéines intracellulaires et extracellulaires sont des cibles critiques de l'attaque des radicaux libres en raison de leurs activités catalytiques. Plusieurs acides aminés tels que la cystéine, la méthionine, le tryptophane sont particulièrement vulnérables aux dommages induits par les espèces radicalaires (Kim *et al.*, 2000).

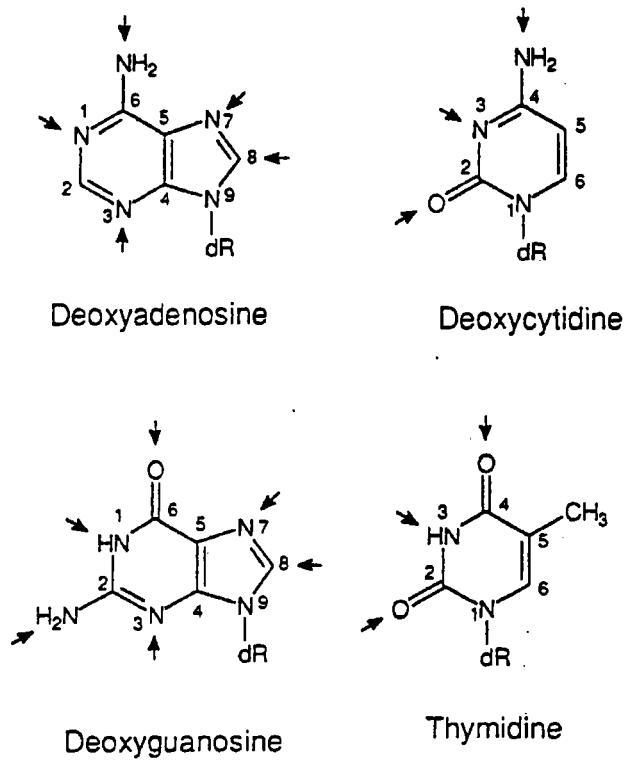


Figure 6 : Sites potentiels de formation des adduits à l'ADN (adapté de La et Swenberg, 1996)

Les radicaux de l'oxygène peuvent agir directement et simultanément sur plusieurs sites, et ce préférentiellement au niveau des groupements -SH et -NH₂ (Halliwell et Gutteridge, 1989). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et des protéines de transport des ions. Ainsi, on observe la formation de carbonyles et d'acides aminés oxydés tels que l'*ortho*-tyrosine, la méthionine sulfoxyde et l'oxohistidine (Miyata *et al.*, 2000).

Les conséquences des réactions radicalaires consistent en des agrégations et des pontages, des fragmentations et des cassures, des modifications des groupements thiols des protéines (Horton et Fairhurst, 1987 ; Pré, 1991 ; Rice-Evans *et al.*, 1991). Les protéines cellulaires peuvent subir deux types de détérioration :

- par oxydation des chaînes latérales d'acides aminés ;
- par des réactions secondaires avec les produits de la lipoperoxydation comme le 4-hydroxynonanal, qui réagit avec les groupes sulfhydriques et amino des protéines et affecte leur fonction par des modifications covalentes (Reinheckel *et al.*, 1998).

D'un point de vue fondamental, la réponse cellulaire au stress se traduit par l'induction de protéines de stress qui jouent un rôle-clé dans la réparation et/ou l'élimination des protéines cellulaires endommagées. Gilberti et Trombetta (2000) se sont intéressés aux relations entre les protéines de stress Hsp72 et Hsp 32 et les systèmes de défense antioxydants, après exposition de rats à l'acide kaïnique, une excitotoxine synthétisée par l'algue *Digenea simplex* (0 ; 5 ; 7,5 ; 10 mg acide kaïnique/Kg/24h). Ces deux protéines sont induites dans le système nerveux central lors de la déplétion des taux de glutathion et des enzymes antioxydantes. Elles sont impliquées dans le mécanisme de protection du système nerveux quand les systèmes de défense sont dépassés par les attaques des radicaux oxygénés.

C/ Les lésions à l'ADN

La molécule d'ADN constitue une cible cellulaire importante pour les attaques radicalaires et peut jouer un rôle important dans l'initiation et la promotion du cancer. Borek (1997) a montré que les enzymes antioxydantes sont quasi inexistantes dans les cellules cancéreuses qui vont donc accumuler les radicaux libres.

Il existe 18 sites potentiels de formation d'adduits à l'ADN (figure 6). La spécificité des réactions au niveau des différents sites comme par exemple, l'attaque en C8 de la guanine par le radical hydroxyle, dépend de la réactivité des radicaux, de la nucléophilie des sites de l'ADN et des facteurs stériques (La et Swenberg, 1996). Ces dénaturations peuvent avoir de graves conséquences sur la réplication du génome.

Le radical hydroxyle est tellement réactif qu'il peut attaquer tous les constituants de l'ADN par des réactions dites « site spécifique ». En raison de sa faible distance de diffusion (2 nm), les lésions à l'ADN vont se produire là où le radical hydroxyle est généré (Pryor, 1988 ; Halliwell et Aruoma, 1991).

La 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine

Le radical hydroxyle et l'oxygène singulet génèrent la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OHdG), soit par dégradation d'un endoperoxyde instable formé par l'oxygène singulet (figure 7), soit à partir d'un adduit radicalaire résultant de la fixation du radical hydroxyle en C8 de la guanine (figure 8) (Halliwell *et al.*, 1992 ; Epe, 1993).

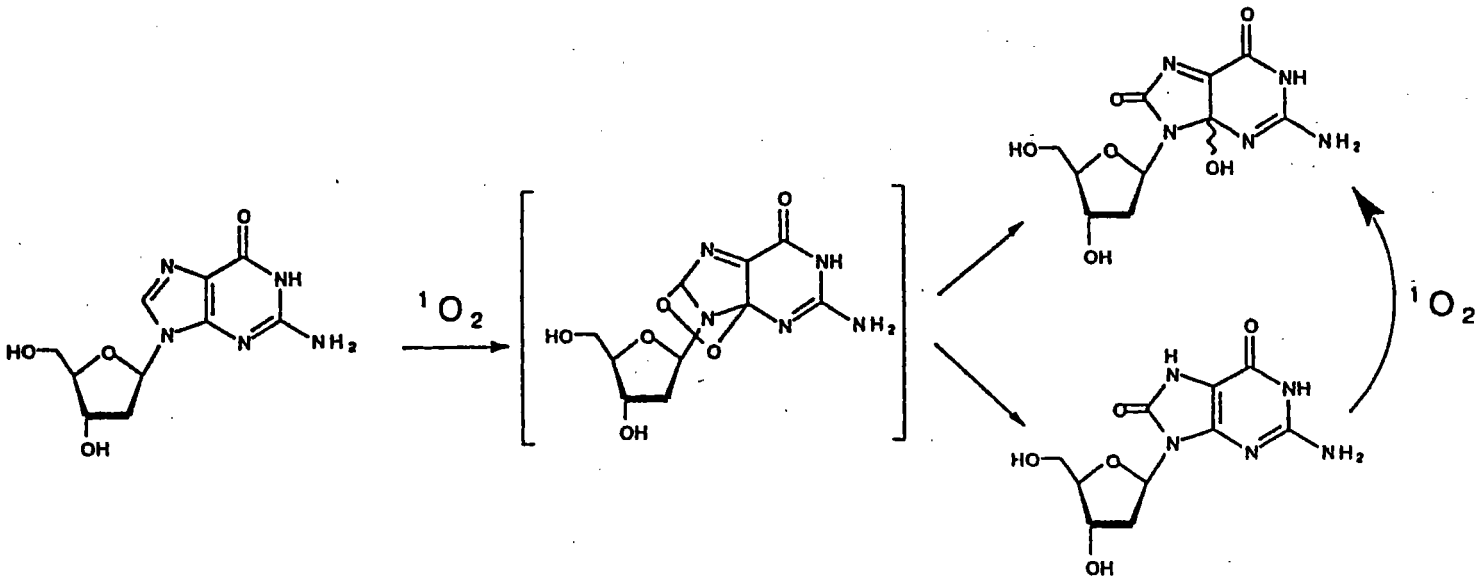


Figure 7 : Principaux produits d'oxydation de la 2'-déoxyguanosine par l'oxygène singlet, incluant la 7,8-dihydro-8-oxo-2'-déoxyguanosine et le diastéréoisomère de la 7,8-dihydro-4-hydroxy-8-oxo-2'-déoxyguanosine.

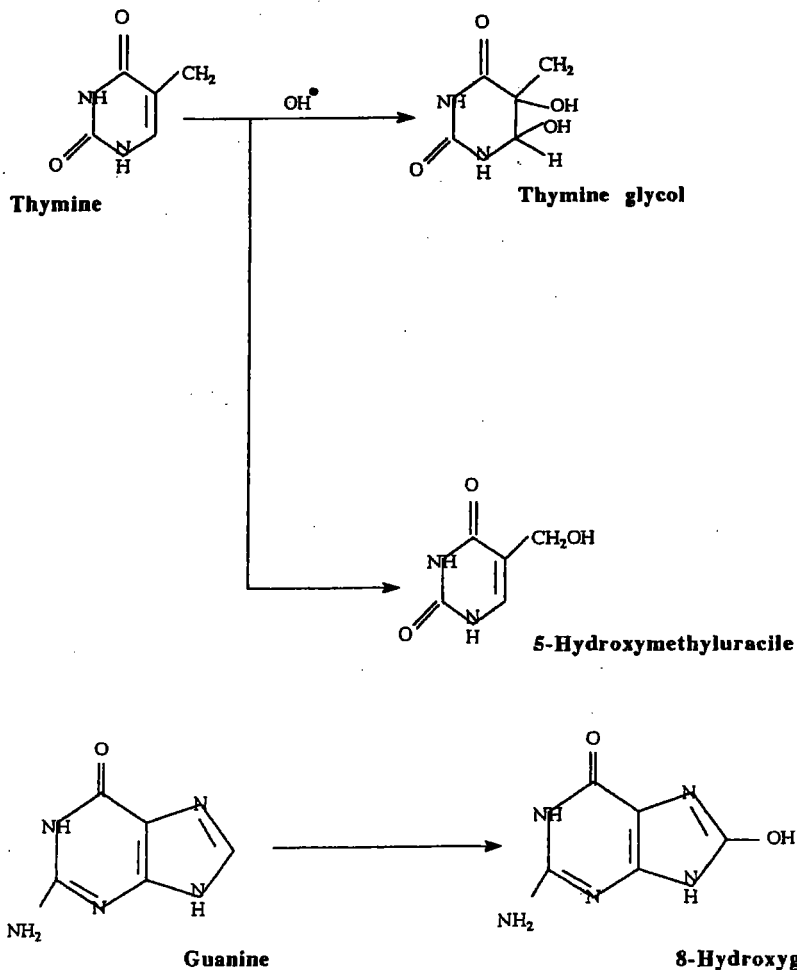


Figure 8 : Exemple de produits d'hydroxylation de la thymine et de la guanine formés après attaque de l'ADN par le radical hydroxyle.

La 8-OHdG est une lésion promutagène, elle induit des mésappariements pendant la synthèse d'ADN *in vitro* (Cheng *et al.*, 1992) et des transversions G :C → T :A si les systèmes de réparation n'agissent pas avant la réplication (Wood *et al.*, 1990).

L'implication de la 8-OHdG a été suggérée dans les transversions G → T détectées à haute fréquence dans le spectre de mutations des gènes *ras* et *p53* dans les organes de mammifères (Shigenaga *et al.*, 1990 ; Kamiya *et al.*, 1995).

Il existerait un processus de réparation spécifique de l'ADN, comme le suggère la présence de 8-OHdG dans les urines (Shigenaga *et al.*, 1990).

La 8-OHdG s'est révélée être l'une des lésions majeures résultant de l'oxydation des bases de l'ADN après exposition *in vitro* à des radicaux hydroxyles générés par des systèmes physiologiques au cours de réactions souvent catalysées par les ions cuivriques et ferriques (Aruoma *et al.*, 1989a, 1989b), aux rayons X et γ , aux UV (Kasai *et al.*, 1984), à des peroxydes organiques (Altman *et al.*, 1994), à des dérivés quinoniques (Nakagawa et Tayama, 1996), à des dérivés minéraux comme l'amiante (Fung *et al.*, 1997), les dérivés du chrome (Faux *et al.*, 1992) et du nickel (Dally et Harwig, 1997).

La production de résidus 8-OHdG augmente *in vivo* dans les tissus au cours de processus physiologique comme le vieillissement (Epe, 1993). L'augmentation de 8-OHdG a été observée après exposition au 2-nitropropane, hépatocancérigène (Sai *et al.*, 1998), après exposition aux proliférateurs de peroxyosomes (Kasai *et al.*, 1989), aux radiations ionisantes (Zastawny *et al.*, 1995) ou lors d'exposition à des cancérigènes comme le nickel (Kasprzak *et al.*, 1997), l'aflatoxine B1 (Shen *et al.*, 1995) et les haloacétates bromés (Parrish *et al.*, 1996). Une augmentation des niveaux de base de 8-OHdG a été observée dans différents processus pathologiques comme le cancer (Abdi et Ali, 1999), ainsi que dans le tabagisme (Lodovici *et al.*, 2000).

Si la guanine est la cible majoritaire, les autres bases de l'ADN peuvent aussi être altérées et donner toute une variété de produits de dégradation. L'adénine, comme la guanine, peuvent être attaquées en C4, C5 et C8. La thymine peut former des thymine glycols et la 5-(hydroxyméthyl)uracile (Halliwell et Dizdaroglu, 1992).

D/ Mécanismes de réparations des lésions initiées par les oxyradicaux

Il existe des systèmes de réparations des lésions oxydatives, capables de reconnaître les cibles cellulaires endommagées. Par exemple, les résidus méthionine des protéines, oxydées au niveau du soufre, peuvent être réparés par une méthionine sulfoxyde réductase. Par contre, dans le cas d'autres acides aminés lésés par des attaques radicalaires, les protéines apparaissent irréversiblement endommagées et doivent être éliminées de la cellule (Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Rice-Evans *et al.*, 1991).

Des systèmes protéolytiques reconnaissent les protéines modifiées par les oxydants ; ils sont présents chez *E. coli*, ainsi que dans le cytosol et dans les mitochondries des cellules de mammifères (Kehrer, 1993).

Les systèmes impliqués dans la réparation des lésions oxydatives à l'ADN agissent par un mécanisme d'excision-resynthèse qui fait intervenir successivement :

- des ADN glycosylases qui excisent les bases modifiées,
- des endonucléases et des exonucléases qui reconnaissent les sites abasiques et les éliminent,
- une ADN polymérase et une ADN ligase qui restaurent une molécule d'ADN identique à son état initial (Téoule, 1987 ; Breimer, 1991 ; Ramotar *et al.*, 1993).

Il existe une formamidopyrimidine-ADN glycosylase (Fpg) codée par le gène *fpg* chez les bactéries qui reconnaît la 8-OHdG, la FapyGua et les sites abasiques (Sattler *et al.*, 2000) et protège l'ADN des attaques initiées par le stress oxydant. Chez les eucaryotes, le gène *ogg1* code pour une 8-OHdG ADN-glycosylase qui a une fonction homologue à la Fpg bactérienne (Boîteux et Radicella, 1999).

Tableau III: Méthodes utilisées pour la détection et la mesure de la peroxydation lipidique au niveau biologique

	METHODE	REFERENCES
Acides gras polyinsaturés au niveau plasmatique (EPA et DHA)	Analyse des acides gras par CPG ou HPLC	Andersen <i>et al.</i> , 1996
Diènes conjugués issus de l'oxydation des acides gras polyinsaturés	Technique spectrophotométrique : Absorption dans l'UV à 233 nm	Recknagel et Glende, 1984 Ristimäe <i>et al.</i> , 1999
Génération de radicaux lipides et hydroxyles	Technique spectroscopique (RPE)	Bartoli <i>et al.</i> , 1999
Hydroperoxydes lipidiques	Après réduction par l'iode, détection spectrophotométrique (353 nm)	Pryor et Castle, 1984
	HPLC	Rice-Evans <i>et al.</i> , 1991
	Détermination colorimétrique par l'orange xylénol avec détection spectrophotométrique à 580 nm	Hermes-Lima <i>et al.</i> , 1995 Pannunzio et Storey, 1998
	Chromatographie couche mince avec détection fluorescente	Terao <i>et al.</i> , 2001
	Spectrométrie de masse couplé à l'impact d'électrons (EI)	Spiteller, 2001
Produits d'oxydation de l'acide arachidonique	Dosage des isoprostanes par spectrométrie de masse ou techniques immunologiques (ELISA)	Cracowski <i>et al.</i> , 2000a
Hydrocarbures volatiles présents dans l'air expiré (éthane et pentane) <i>in vivo</i>	CPG	Lawrence et Cohen, 1984 Schweich <i>et al.</i> , 1994 De Zwart L.L. <i>et al.</i> , 1999
Peroxydes lipidiques (lipofuscine)	Spectrofluorométrie : excitation/émission = 350/445 nm	Accomando <i>et al.</i> , 1999 Mourete <i>et al.</i> , 1999
Ensemble du spectre des aldéhydes formés lors de la lipoperoxydation	Dérivation par DNHP puis séparation par chromatographie couche mince et HPLC avec détection UV à 365-378 nm	Esterbauer et Zollner, 1989
	Dérivation par CHD puis séparation et identification par HPLC avec détection fluorescente	Rice-Evans <i>et al.</i> , 1991
Génération de protéines modifiées par le MDA <i>in vitro</i>	Technique immunologique sur membrane (chemiluminescence)	Kim <i>et al.</i> , 2000 Tanaka <i>et al.</i> , 1999
Identification de deux produits d'oxydation des protéines <i>in vivo</i> (GGS et AAS)	HPLC couplé à spectrométrie de masse	Daneshvar <i>et al.</i> , 1997
Isoprostanes	Spectrométrie de masse Méthodes immunochimiques (ELISA)	Cracowski <i>et al.</i> , 2000b Nourooz-Zadeh <i>et al.</i> , 1997 Sakamoto, 1999

EPA : Acide Eicosapentaénoïque ; DHA : Acide Docosahexaénoïque ; RPE : Résonance paramagnétique électronique ; GGS : γ -Glutamyl semialdéhyde ; AAS : 2-amino-adipic semialdéhyde ; DNHP : 2,4-dinitrophénylhydrazine ; CHD : 1,3-cyclohexanedione CPG : chromatographie en phase gazeuse ; HPLC : chromatographie liquide haute performance ; ELISA : Enzyme-labeled immunosorbent assay

5/ DETECTION DES LESIONS OXYDATIVES

Les moyens du diagnostic peuvent reposer sur l'appréciation de l'état des moyens de défense, mais les espèces oxygénées réactives ayant une grande réactivité chimique, de nombreuses structures moléculaires peuvent leur servir de cible conduisant alors à différents produits de dégradation dont le dosage permet l'évaluation indirecte du stress. La mesure seule d'un paramètre *in vivo* ne peut servir d'indice de dommages oxydatifs (England *et al.*, 2000).

Les problèmes posés par la quantification du stress oxydant sont différents dans des systèmes *in vitro* et dans des systèmes biologiques. *In vivo*, la quantification du stress oxydant est beaucoup plus difficile, puisque certains marqueurs ont des demi-vies très brèves (hydroperoxydes), ou sont rapidement métabolisés, comme les aldéhydes, par conjugaison puis élimination hépatique (Lefèvre *et al.*, 1998).

La grande diversité des espèces formées (radicaux libres, hydroperoxydes lipidiques, aldéhydes et alcanes, chromolipides fluorescents), ainsi que l'inégalité tissulaire des systèmes de défense rend difficile le choix d'un marqueur du processus de lipoperoxydation. De nombreuses techniques d'évaluation ont été proposées. Les méthodes les plus couramment utilisées pour l'évaluation de la peroxydation des lipides sont présentées dans le tableau III.

A/ Méthodes d'évaluation de la lipoperoxydation

Parmi ces méthodes, plusieurs mesurent des espèces formées au cours de l'initiation de la lipoperoxydation.

Les diènes conjugués sont des produits initiaux de l'attaque des lipides par les radicaux libres (Recknagel et Glende, 1984). Ils sont issus de la stabilisation du radical d'acide gras par réarrangement moléculaire. Le contenu en diènes conjugués des lipides est déterminé par spectroscopie UV à 233 nm. Cette méthode a l'inconvénient *in vivo* de nécessiter un contrôle des lipides non peroxydés qui est difficile à obtenir.

La mesure du taux d'acides gras polyinsaturés (acide éicosapentaénoïque et acide docosahexaénoïque) au niveau plasmatique peut servir à l'estimation du degré d'attaque des lipides. Les acides gras sont mesurés par CPG ou HPLC (Andersen *et al.*, 1996).

Un ensemble de méthodes permet de quantifier les hydroperoxydes lipidiques, produits intermédiaires de la lipoperoxydation qui sont issus de l'étape de propagation.

Ils peuvent être réduits par l'iode et quantifiés en spectrophotométrie à 353 nm (Pryor et Castle, 1984) ou avec plus de sensibilité par HPLC (Rice-Evans *et al.*, 1991). Des problèmes d'interférence sont liés à l'utilisation de la méthode chromatographique. Hermes-Lima *et al.* (1995) ont mis au point une technique de détermination colorimétrique spécifique et basée sur l'utilisation de l'orange xylénol, les hydroperoxydes lipidiques sont quantifiés par spectrophotométrie à 580 nm (Pannunzio et Storey, 1998).

Une technique de détection spécifique des hydroperoxydes lipidiques par chromatographie couche mince a été développée par Terao *et al.* (2001). Elle permet de visualiser par des « spots » fluorescents les produits de la lipoperoxydation. Cette méthode est utilisée pour surveiller les effets du stress oxydant sur les lipoprotéines de basse densité.

Une technique de spectrométrie de masse associée à une ionisation électronique (IE) est également utilisée pour déterminer les taux d'hydroperoxydes lipidiques (Spiteller, 2001).

Tableau IV: Principales méthodes analytiques de détection du 4-hydroxynonéal

	METHODE	REFERENCES
4-hydroxynonéal	HPLC avec détection UV à 220-223 nm	Esterbauer et Slater, 1981 Esterbauer et Zollner, 1989 Esterbauer <i>et al.</i> , 1991
	GC-SM	Rice-Evans <i>et al.</i> , 1991
	Réaction avec le N-méthyl-2-phénylindole (pH < 7) donnant un produit chromophore absorbant à 586 nm	Erdelmeier <i>et al.</i> , 1998 Gérard-Monnier <i>et al.</i> , 1998
	Dérivation par DNSH puis séparation et identification par chromatographie micellaire avec détection fluorescente	Claeson <i>et al.</i> , 2001

GC-SM : chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse ; DNSH : dansylhydrazine (5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulphonehydrazine)

La détection des produits ultimes de la lipoperoxydation reste la méthode la plus utilisée pour évaluer les effets du stress oxydant.

L'attaque de l'acide arachidonique par les radicaux libres va produire divers aldéhydes dont les plus connus sont le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE). Le tableau IV montre les principales méthodes analytiques de mesure du 4-HNE.

Le dosage du 4-hydroxynonéal a été proposé par Esterbauer et Slater (1981) comme marqueur de la peroxydation lipidique. Cependant, sa détermination nécessite des techniques longues limitant son emploi. La combinaison protéine-4-HNE peut être appréciée par des anticorps monoclonaux, puisque les lipoprotéines de basse densité modifiées par le 4-HNE au niveau des résidus lysine présentent un pouvoir antigénique (Esterbauer *et al.*, 1991 ; Claeson *et al.*, 2001).

La détection des protéines modifiées par les produits issus de la lipoperoxydation permet de comprendre les effets génotoxiques des aldéhydes formés (Kim *et al.*, 2000) et des radicaux libres (Daneshvar *et al.*, 1997).

Les produits aldéhydiques de coupure ainsi que les hydroperoxydes sont à l'origine de structures complexes fluorescentes, correspondant aux chromolipoides, lipofuscines et céroïdes, s'accumulant dans les tissus au cours du vieillissement (Accomando *et al.*, 1999), lors de stress oxydant ou de déficit en antioxydants (Mourente *et al.*, 1999). La détection des chromolipoides est faite par spectrofluorométrie (excitation : 350 nm, émission : 445 nm). L'ensemble du spectre d'aldéhydes formés lors de la lipoperoxydation a été mesuré par deux techniques de dérivation : la dérivation par la dansylhydrazine(5-(diméthylamino)naphtalène-1-sulphonehydrazine avec identification par HPLC avec détection UV (Esterbauer et Zollner, 1989) et la dérivation par la 1,3-cyclohexanedione avec identification par HPLC avec détection fluorescente (Rice-Evans *et al.*, 1991).

La mesure des hydrocarbures volatiles (alcanes exhalés) peut servir de marqueurs de la peroxydation lipidique (Lawrence et Cohen, 1984), mais ces produits ne sont présents qu'à des concentrations extrêmement faibles. Les alcanes dosés sont l'éthane et le pentane par chromatographie gazeuse avec détection à ionisation de flamme.

Les F2-isoprostanes représentent une nouvelle famille d'isomères des prostaglandines F2, produites *in vivo* par peroxydation radicalaire de l'acide arachidonique (Cracowski *et al.*, 2000a). Les F2-isoprostaglandines sont formés *in situ* sur les chaînes phospholipidiques membranaires puis libérés ultérieurement. La quantification des deux isoformes principales (isoprostaglandine F2 α -type III et VI) dans les liquides et tissus biologiques est réalisée par spectrométrie de masse ou par des méthodes immunochimiques type Elisa (Cracowski *et al.*, 2000b). Les F3-isoprostanes sont issus de l'attaque de l'acide eicosapentaénoïque (EPA) par des radicaux libres (Nourooz-Zadeh *et al.* (1997). L'EPA oxydé va aboutir à une famille de F3-isoprostanes avec 8-epi PGF_{3 α} comme produit mineur de la réaction. D'autres isoprostanes tels que le 8-isoprostane sont issus de la réaction des radicaux libres avec l'acide arachidonique et peuvent servir d'indicateurs de l'attaque des lipides par les oxydants (Sakamoto *et al.*, 1999).

B/ Mesure du malondialdéhyde

La lipoperoxydation est communément mise en évidence par la mesure de la concentration en malondialdéhyde (MDA), produit terminal de la dégradation des lipides, par chromatographie liquide (HPLC) ou par spectrophotométrie du complexe coloré formé avec l'acide thiobarbiturique (TBA) (Tableau V).

Seules de petites quantités de MDA libre sont présentes dans les échantillons biologiques et des méthodes très sensibles sont nécessaires pour sa détection. C'est le plus souvent le MDA total (libre et lié) qui est évalué.

Tableau V : Principales méthodes analytiques de détection du malondialdéhyde

	METHODE	REFERENCES
Malondialdéhyde	Test à l'acide thiobarbiturique : Spectroscopie à 535 nm	Gutteridge <i>et al.</i> , 1974 Buege et Aust, 1978 Yagi, 1984
	HPLC avec détection fluorimétrique des adduits MDA-diéthylTBA	Londero et Lo Greco, 1996
	MDA libre : HPLC à détection UV à 267 nm	Behrens et Madere, 1991
	GC-SM	Cighetti <i>et al.</i> , 1999
	Dérivation par DNHP puis séparation par HPLC avec détection UV à 310 nm	Pilz <i>et al.</i> , 2000
	Electrophorèse en zone capillaire	Korisis <i>et al.</i> , 2001
	Réaction avec le N-méthyl-2- phénylindole (pH < 7) donnant un chromophore absorbant à 586 nm	Erdelmeier <i>et al.</i> , 1998 Gérard-Monnier <i>et al.</i> , 1998
	Technique immunochimique : anticorps monoclonaux anti-adduit MDA-déoxyguanosine (ELISA)	Sevilla <i>et al.</i> , 1997
GC-SM avec capture électronique et ionisation chimique négative pour les adduits MDA-déoxyguanosine	Rouzer <i>et al.</i> , 1997	
Méthyl-MDA = standard interne HPLC à detection UV GC-SM	Claeson <i>et al.</i> , 2001	

MDA : malondialdéhyde ; HPLC : chromatographie liquide haute performance ; GC-SM : chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ; DNHP : 2,4-dinitrophénylhydrazine ; ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

Le malondialdéhyde libre est défini comme le MDA non lié aux protéines, c'est-à-dire ultrafiltrable, ou présent dans le surnageant après précipitation des protéines par un réactif ni acide ni alcalin, puisque la liaison $>C=N-$ est labile à ces pH (Lefèvre *et al.*, 1998).

Le MDA plasmatique est très majoritairement sous forme liée. Dans une étude datant de 1997 utilisant une méthode de dosage du MDA par électrophorèse capillaire (limite de détection 0,08 pM), Wilson *et al.* ont montré que le MDA libre, au contraire des TBARS, n'était pas retrouvé dans le plasma humain ni à l'état basal ni après transplantation coronaire. D'autres études ont montré, par contre, la présence de MDA libre dans le plasma. Stalikas et Konidari (2001) ont dosé le MDA libre par CG-SM selon 3 procédures : par ultrafiltration, par dérivation du plasma entier sans suppression des protéines au préalable, par précipitation des protéines par addition d'une solution de dérivation (2,4,6-trichlorophénylhydrazine). Les taux de MDA libre représentent 25 % du MDA total dans le plasma quelque soit le type de procédure utilisée. De même, Cighetti *et al.* (1999) a dosé mes taux de MDA libre et total dans du plasma humain frais et dans des microsomes hépatiques de rats par CG-SM. Les taux trouvés sont de $0,14 \pm 0,03 \mu\text{M}$ ($n = 70$) et de $0,048 \pm 0,006 \text{ nmol/mg}$ protéines ($n=3$ pool) pour le plasma et les microsomes respectivement. Les taux de MDA totaux sont de $1,3 \pm 0,07 \mu\text{M}$ dans le plasma et de $0,36 \pm 0,04 \text{ nmol/mg}$ protéines pour les microsomes. Le dosage du MDA libre est applicable au suivi de patient ayant subi une transplantation hépatique : des comparaisons entre les augmentations des taux de MDA libre et total suggèrent une liaison rapide aux protéines du MDA libre, et un retour à des niveaux de base après 6 à 8 jours chez des patients sans complication (Steghens *et al.*, 2001). Le MDA libre semble refléter une production récente alors que le MDA total (libre et lié) peut être considéré comme un indicateur à plus long terme du stress oxydant.

Le test à l'acide thiobarbiturique (TBA) reste la méthode la plus communément utilisée. La réaction du MDA avec deux molécules de TBA va former un complexe absorbant à 532 nm, extractible par des solvants organiques comme le butanol (Buege et Aust, 1978 ; Yagi, 1984).

Le résultat du dosage du MDA par l'acide thiobarbiturique est donc la somme du MDA préexistant lié ou non aux molécules biologiques, des peroxydes lipidiques, des produits d'auto-oxydation des acides gras et autres substances qui donnent naissance soit à du MDA, soit à des molécules réagissant avec l'acide thiobarbiturique en milieu acide et à chaud (Gutteridge *et al.*, 1974). C'est pourquoi à la notion initiale de dosage du MDA s'est substituée la notion de « substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique » (TBARS). Une des sources de l'hétérogénéité des résultats observés avec les TBARS est liée au nombre important de molécules différentes qui ne relèvent pas forcément du stress oxydant, mais qui réagissent avec l'acide thiobarbiturique.

Parmi les méthodes directes de dosage du MDA, c'est-à-dire sans réaction de dérivation, la méthode de Behrens et Madere (1991) fait appel à une précipitation des protéines par l'éthanol suivie d'une chromatographie par formation de paire d'ions. Son application exclut l'accès à toute forme de MDA liée notamment aux protéines. Sa limite de détection est de $2 \mu\text{M}$ de MDA injectés.

Londero et Lo Greco (1996) utilisent une technique de séparation HPLC avec détection spectrofluorimétrique (532 nm) des adduits MDA-TBA, avec une limite de détection de $27 \mu\text{M}$ injectés.

Plus récemment, des méthodes utilisant le couplage chromatographie gazeuse-spectromètre de masse (GC-SM) ont permis le dosage du MDA libre et total dans le plasma humain (Cighetti *et al.*, 1999). Korisis *et al.* (2001) ont mis au point une technique de détermination des taux de MDA libre dans le plasma par électrophorèse capillaire.

Pilz *et al.* (2000) ont développé une technique de dosages du MDA libre et total avec le 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) par HPLC. Claeson *et al.* (2001) ont suggéré l'utilisation du méthyl malondialdéhyde (Me-MDA) comme standard interne lors de la détermination du MDA dans des échantillons de cerveau de rat. L'applicabilité de la mesure du Methyl-MDA a été démontrée en utilisant des techniques électrophorétiques, chromatographiques (HPLC avec détection UV) et de couplage GC-MS.

Tableau VI : Principales méthodes de mesure de la 8-OHdG

METHODES	SENSIBILITE	QUANTITE D'ADN QUANTIFIEE (μg)	AVANTAGES ET INCONVENIENTS	REFERENCES
HPLC-EC	1 8OHdG/ 10^6 dG 0,01 8OHdG/ 10^6 dG	10-100	Simplicité, spécificité et sensibilité <i>Artéfacts d'oxydations de dG lors des protocoles d'extraction et d'hydrolyse de l'ADN</i> Dosage possible dans les urines Oxydation de l'ADN limitée par le TEMPO, le froid, les temps d'incubation courts et avec des chimiques pauvres en métaux de transition (Hofer et Möller, 1998)	Ames, 1988 Floyd <i>et al.</i> , 1986 Shigenaga <i>et al.</i> , 1990, 1994 Loft <i>et al.</i> , 1993 Tagesson <i>et al.</i> , 1995 Adachi <i>et al.</i> , 1995 Topp <i>et al.</i> , 2000
GC-SM-SIM	1 8OHdG/ 10^6 dG	50	Large spectre de lésions oxydatives déterminées Même sensibilité que HPLC-EC <i>Surexpression de la 8-OHdG/HPLC : hydrolyse et dérivation vont contribuer à l'oxydation de la dG (taux basaux 8-OHdG)</i>	Dizdaroglu, 1994 Cadet <i>et al.</i> , 1998 Kasai, 1997 Toraason, 1999
ELISA	0,5 8OHdG/ 10^5 dG	10-100	Rapide, sensible et très spécifique (colonne d'immunoaffinité) Bonne corrélation avec HPLC-EC mais niveaux ELISA plus élevés <i>Méthode semi-quantitative et réactions croisées avec d'autres types de dommages à l'ADN</i>	Degan <i>et al.</i> , 1991 Yin <i>et al.</i> , 1995 Radak <i>et al.</i> , 2000
Immunohistochimie			Ne nécessite qu'un petit échantillon Absence d'extraction ou d'hydrolyse de l'ADN limitant l'auto-oxydation <i>Méthode semi-quantitative et réactions croisées avec d'autres types de dommages à l'ADN</i>	Takahashi <i>et al.</i> , 1998 Garçon <i>et al.</i> , 2001a Garçon <i>et al.</i> , 2001b
Endonucléases de réparation	1-5 8OHdG/ 10^7 dG	10	Sensibilité et pas d'extraction et d'hydrolyse de l'ADN (limite l'auto oxydation) Conversion des pyrimidines oxydées en cassures du brin d'ADN au niveau des sites de dommages oxydatifs L'utilisation d'endonucléases spécifiques comme la FPG donne des valeurs plus basses de 8-OHdG que celles mesurées par HPLC	Collins <i>et al.</i> , 1996 Gedik <i>et al.</i> , 1998 Beckman <i>et al.</i> , 2000
Elution alcaline	0,1 8OHdG/ 10^6 dG	10	Bonne sensibilité Utilisée en association avec HPLC-EC	Gabelova <i>et al.</i> , 1997
Postmarquage au ^{32}P	1 8OHdG/ 10^7 dG	1	Bonne sensibilité <i>Long et difficilement applicable en routine</i> Ne nécessite qu'un petit échantillon <i>Surestimation par rapport à HPLC-EC</i>	Cadet <i>et al.</i> , 1998 Schuler <i>et al.</i> 1997 Möller <i>et al.</i> , 1998
Postmarquage au ^3H	0,5-3 8OHdG/ 10^4 dG	100	Analyse simultanée de plusieurs nucléosides dans l'ADN et l'ARN <i>Transmutation possible</i>	Kwee <i>et al.</i> , 1998

HPLC-EC: Chromatographie liquide haute performance avec détection électrochimique; GC-SM: Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse ; SIM: selected ion monitoring; ELISA : enzyme linked immuno assay ; TEMPO : 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl; FPG : formamidopyrimidine-ADN glycosylase

C/ Mesure de la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine

Parmi les lésions oxydatives de l'ADN, la 8-hydroxylation de la guanine constitue la lésion prédominante (Marnett et Burcham, 1993). Diverses méthodes ont été développées pour mesurer la 8-OHdG dans les échantillons biologiques et, leur efficacité a été relatée par plusieurs auteurs (Collins *et al.*, 1996 ; Cadet *et al.*, 1998 ; Toraason, 1999). Le tableau VI présente différentes techniques de mesure de la 8-OHdG rapportées de la littérature.

Des études ont montré que les taux de 8-OHdG mesurés par diverses méthodes varient en fonction des protocoles expérimentaux utilisés. En effet, les niveaux de cette lésion sont affectés par le statut redox de la cellule et le mélange d'espèces réactives présentes (Halliwell, 1998).

Les procédures telles que l'extraction phénolique, la dialyse de l'ADN isolé, le stockage de tissu précédant une extraction d'ADN et la digestion par nucléase de l'ADN pour libérer les bases oxydées lors de l'analyse par HPLC peuvent résulter en des artefacts d'oxydations (Halliwell, 1998).

L'étape d'isolement de l'ADN par une extraction phénol-chloroforme a souvent été accusée d'augmenter les niveaux de la 8-OHdG ou de sensibiliser l'ADN aux futures attaques oxydantes. Claycamp (1992) a réussi à augmenter artificiellement les taux de 8-OHdG dans l'ADN isolé par le phénol.

De même, les études de Finnegan *et al.* (1996) ont montré que l'utilisation de ce solvant durant l'extraction d'ADN élevaient les niveaux détectés de cette lésion alors que, l'extraction par une pronase E (protéinase) sans extraction phénolique n'apportait aucune modification des niveaux de 8-OHdG. D'autres auteurs, par contre, ont démontré que la méthode par le phénol n'augmentait pas significativement les taux de 8-OHdG (Helbock *et al.*, 1998 ; Halliwell, 1998). Ces dernières études tendent à montrer que l'augmentation des niveaux de base de 8-OHdG ne peut être une conséquence directe de l'utilisation de phénol lors des étapes d'extraction de l'ADN.

a/ Méthodes chromatographiques

La chromatographie liquide avec détection électrochimique (HPLC-EC) a été la plus souvent utilisée pour quantifier la 8-OHdG dans des systèmes biologiques variés, probablement en raison de sa simplicité et de sa sensibilité. La détection électrochimique permet de mesurer cette lésion avec une sensibilité 1000 fois supérieure à la détection UV (Floyd *et al.*, 1986). Les limites de détection des techniques HPLC-EC sont de l'ordre de 1 résidu 8-OHdG pour 10^6 bases de l'ADN (Shigenaga *et al.*, 1990, 1994). Adachi *et al.* (1995) ont amélioré la limite de détection de la technique HPLC-EC à 0,01 résidu 8-OHdG pour 10^6 bases.

Des techniques analytiques basées sur l'HPLC-EC ont été développées pour la mesure de la 8-OHdG et de la 8-OHG dans les urines. Ames (1988) a utilisé de multiples extractions phase-solide sur des mini-colonnes précédant une séparation en gradient, et plus récemment les extractions ont été réalisées sur des colonnes d'immunoaffinité avec des anticorps monoclonaux spécifiques de ces lésions, ne nécessitant qu'une séparation isocratique (Shigenaga *et al.*, 1990, 1994).

Des méthodes HPLC-EC bi et tri-dimensionnelles automatisables ont été reportées respectivement par Tagesson *et al.* (1995) et Loft *et al.* (1993). Topp *et al.* (2000) ont utilisé une extraction phase-solide sur des mini-colonnes précédant une séparation par 4 colonnes HPLC montées en série (colonnes I, II=échangeuses de cations ; colonnes III, IV=C₁₈), pour déterminer les taux dans les urines de mammifères. L'excrétion urinaire de 8-OHdG et 8-OHG fournit une estimation de la réparation de ces lésions au niveau de l'ADN.

Les limites de ce type de dosage résident dans l'interférence des acides nucléiques d'origine alimentaire et de processus physiologiques cellulaires tels que le *turnover* normal des cellules.

Plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature différant principalement par les techniques de préparation de l'ADN. Hofer et Möller (1998) ont pu limiter l'artéfact d'oxydation en utilisant le nitroxyde TEMPO (2,2,6,6-tétraméthylpiperidine-N-oxyl), en travaillant à froid (0°C et -80°C), en limitant le temps d'incubation et en travaillant en milieu pauvre en métaux de transition.

b/ Autres méthodes de détection de la 8-OHdG

Une autre méthode de détection de la 8-OHdG est la chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-SM), qui a l'avantage de pouvoir évaluer plusieurs adduits à l'ADN en une fois (Cadet *et al.*, 1998). Cette technique est applicable à l'ADN lui-même ou à des complexes ADN-protéines comme la chromatine (Dizdaroglu, 1994).

L'ADN est préalablement hydrolysé et les produits sont convertis en dérivés volatiles séparés par chromatographie gazeuse. La structure des composés finaux est identifiée par spectrométrie de masse. La limite de détection de la GC-SM dans l'ADN ou la chromatine est approximativement de 1 8-OHdG/10⁶ dG, cette méthode est donc aussi sensible que l'HPLC, mais il existe des artéfacts d'oxydations de l'ADN. En général, la 8-OHdG mesurée par GC-SM donne des valeurs 10 fois plus élevées que celles obtenues par HPLC-EC, car la 8-OHdG est produite comme un artéfact durant l'étape de dérivation précédant l'analyse GC-SM (Kasai, 1997).

Les deux étapes, hydrolyse et dérivation, contribuent à l'oxydation de la dG et sont responsables des valeurs élevées de 8-OHdG (Toraason, 1999). La formation artéfactuelle de la 8-OHdG peut être minimisée par une purification de la base modifiée précédant la réaction de dérivation lors des procédures GC-SM (Cadet *et al.*, 1998).

Une autre approche qui évite l'auto-oxydation de l'ADN est la mesure de la 8-OHdG *in situ*. Deux études récentes ont utilisé des anticorps monoclonaux pour estimer les changements du contenu en 8-OHdG dans des coupes de foie de rat (Takahashi *et al.*, 1998) et dans le poumon (Garçon *et al.*, 2001a, 2001b). L'utilisation de ces anticorps est une extension du test ELISA pour la 8-OHdG (Degan *et al.*, 1991 ; Yin *et al.*, 1995). Cependant, les techniques immunohistochimiques et les méthodes ELISA sont semi-quantitatives et présentent de nombreuses réactions croisées avec d'autres types de dommages à l'ADN. Ces inconvénients sont contrebalancés par les possibilités offertes de détecter les changements locaux de la 8-OHdG *in situ*, de travailler sur des quantités minimales d'échantillons, et ce, sans extraction ou hydrolyse de l'ADN préalable.

La méthode ELISA a été utilisée pour étudier les taux de 8-OHdG dans les urines de marathoniens et, les auteurs ont montré l'incidence d'un exercice physique intense sur les dommages à l'ADN lors du stress oxydant (Radak *et al.*, 2000).

La 8-OHdG peut également être détectée par électrophorèse sur gel. Collins *et al.* (1996) ont modifié le test des comètes en incluant la Fapy glycosylase (FPG) dans l'essai, qui convertit les pyrimidines oxydées en cassures du brin d'ADN au niveau des sites de dommages oxydatifs. Comme avec les techniques immunohistochimiques, il n'est pas nécessaire d'extraire ou d'hydrolyser l'ADN, ce qui élimine le problème de l'auto-oxydation (Beckman *et al.*, 2000 ; Persinger *et al.*, 2001). Gedik *et al.* (1998) ont comparé les résultats des niveaux de base de la 8-OHdG dans l'ADN hépatique de rat, de cellules HeLa et de leucocytes humains, obtenus par HPLC avec ceux obtenus par l'essai des comètes, qui nécessite l'emploi d'enzymes spécifiques pour introduire des cassures dans l'ADN au niveau des sites de dommages oxydatifs. Les résultats montrent que les niveaux d'oxydation de l'ADN estimés par le test des comètes sont en général sept fois plus bas que ceux estimés par HPLC.

L'utilisation d'endonucléases spécifiques comme la FPG donne des valeurs de l'ordre de 0,05 FPG-sites sensibles/ 10^5 dG.

Des méthodes additionnelles pour mesurer les dommages oxydatifs à l'ADN incluent l'élution alcaline (Gabelova *et al.*, 1997), le postmarquage au ^{32}P (Schuler *et al.* 1997) et le postmarquage au ^3H (Kwee *et al.*, 1998). Ces dernières techniques ne sont pas utilisées pour le « *biomonitoring* ».

Tableau VII : Etudes rapportées dans la littérature portant sur la mesure de la lipoperoxydation et de la 8-OHdG chez les mammifères

COMPOSES ETUDIÉS	ORGANISMES	DOSE	CONDITIONS D'EXPOSITION	ORGANES	STRESS OXYDANT ET 8-OHdG	AUTEURS
Nitrilotriacétate de fer (Fe-NTA)	Rats mâles	100 µM Fe-NTA	4, 24 et 48 heures	Hépatocytes	↑ 8-OHdG en fonction de la durée d'exposition, après 48 ^H (×7,4) ↑ MDA après 24 heures (×12)	Morel <i>et al.</i> , 1997
				Lignée cellulaire d'hépatome	↑ 8-OHdG en fonction de la durée d'exposition : plus forte induction après 48 ^H , pas de dosage du MDA	
Nitrilotriacétate de fer	Rats mâles	15 mg/Kg i.p.	1 heure	Rein	↑ 8-OHdG après 1 heure (×1,6) ↑ MDA après 1 heure (×1,7)	Qi <i>et al.</i> , 1999
2-Nitropropane	Rats mâles	Intubation gastrique (mg/Kg): H=660 L= 360	2 semaines	Foie	↑ 8-OHdG pour la dose L (×1,8) et H (×2,9) ↑ lipoperoxydation (TBARS) pour la dose L (×1,6) et H (×3,4)	Sai <i>et al.</i> , 1998
Nitrilotriacétate de fer	Rats	1 mM Fe/4 mM NTA	2 heures à 37°C	Foie (coupes)	↑ lipoperoxydation (TBARS) pour le tissu entier (×7) et les noyaux (×4), rien pour la lignée cellulaire Faible induction 8-OHdG pour les 3 essais Faible induction de la lipoperoxydation pour le tissu (×1,4), rien pour la lignée cellulaire Pas d'induction 8-OHdG	Wang et Hu, 2000
Bromotrichlorométhane Bromobenzène 2-Nitropropane		1 mM		Lignée cellulaire		
Acide δ-aminolevulinique	Rats mâles	40 mg/Kg i.p.	2 semaines	Foie	↑ 8-OHdG après 15 jours de traitement (×1,4)	Karbownik <i>et al.</i> , 2000
				Membrane Microsomale hépatique	↑ MDA et 4-HDA après 15 jours de traitement (×1,3)	
Hématite (Fe ₂ O ₃)	Rats mâles	3 mg/200 µL instillé intra-trachéal	48 heures	Poumon	8-OHdG : ×2 avec B(a)P ×24 avec Fe ₂ O ₃ + B(a)P MDA : ×2 avec Fe ₂ O ₃ , B(a)P et les 2	Garçon <i>et al.</i> 2001b
Benzo(a)pyrène (B(a)P)						
Fe ₂ O ₃ + B(a)P						

4-HDA : 4-hydroxyalkénal ; i.p. : intra péritonéal ; MDA : malondialdéhyde ; 8-OHdG : 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine

6/ INDUCTION DE LA LIPOPEROXYDATION ET FORMATION DE LA 8-OHdG CHEZ LES MAMMIFERES

L'altération des phospholipides membranaires par les radicaux de l'oxygène aboutit à la peroxydation des lipides. Les espèces réactives de l'oxygène attaquent également l'ADN et en modifient la conformation (Marnett, 2000). Parmi les mutations de l'ADN, la mesure de la 8-OHdG reste le marqueur le plus utilisé pour étudier les effets des oxydants et les dommages à l'ADN. Nous nous sommes plus intéressés aux études portant sur ces deux paramètres de toxicité chez les mammifères afin de mieux cerner les corrélations entre la cytotoxicité et la génotoxicité des oxydants. Les études concernant les mesures de la lipoperoxydation et de la 8-OHdG chez des mammifères exposés à divers xénobiotiques sont répertoriées dans le tableau VII avec un rappel des conditions d'intoxication.

Exposition à des métaux

La lipoperoxydation et la formation de 8-OHdG sont induites significativement lors d'exposition à des xénobiotiques. Les métaux sont capables d'altérer la balance redox dans les cellules et de stimuler la lipoperoxydation. Morel *et al.* (1997) ont montré que l'exposition d'hépatocytes à 100 μ M de Fe-NTA induisait une forte augmentation de la 8-OHdG ($\times 7,4$) et des taux de MDA ($\times 12$). L'injection intrapéritonéale de fer (15 mg/Kg) produit en une heure une augmentation de la lipoperoxydation (taux de MDA $\times 1,7$) et de la 8-OHdG ($\times 1,6$) dans le rein des rats (Qi *et al.*, 1999). Des stimulations comparables de la lipoperoxydation, pour des concentrations plus faibles, ont été reportées dans le tissu hépatique de rats exposés au nitrilotriacétate de fer (1 mM fer/4 mM nitrilotriacétate). Par contre, Wang et Hu (2000) n'ont pas observé d'induction concernant la 8-OHdG dans cette étude.

Exposition à des molécules organiques

L'étude de Sai *et al.* (1998) montre la hausse de la lipoperoxydation et de la 8-OHdG dans le foie de 2 lots de rats mâles ayant consommé du 2-nitropropane (660 mg/Kg ou 360 mg/Kg). Les augmentations les plus importantes sont observées pour la concentration la plus forte en 2-nitropropane ($\times 2,9$ pour la 8-OHdG et $\times 3,4$ pour le MDA). L'exposition à des concentrations de 1 mM de bromotrichlorométhane, bromobenzène et 2-nitropropane, pendant 2 heures, n'induit ni lipoperoxydation et ni 8-OHdG dans le foie de rats (Wang et Hu, 2000). Après 15 jours de traitement (40 mg/Kg) à l'acide δ -aminolévulinique, la lipoperoxydation ($\times 1,3$ pour le MDA) et les taux de 8-OHdG ($\times 1,4$) sont augmentés au niveau hépatique chez le rat (Karbownik *et al.*, 2000). Garçon *et al.* (2001b) ont reporté que l'exposition au B(a)P et au fer résulte en une augmentation de l'incidence des tumeurs pulmonaires chez les rongeurs supérieure à une exposition au B(a)P seul : l'action synergique des 2 produits (fer et B(a)P) augmente de 24 fois les taux de 8-OHdG dans le poumon. Il n'y a pas d'effet synergique des toxiques sur la lipoperoxydation, les taux de MDA sont doublés pour les toxiques seuls ou en mélange.

L'exposition aux métaux et aux molécules organiques en laboratoire aboutit souvent à l'induction de la lipoperoxydation et des taux de 8-OHdG dans les tissus de mammifères intoxiqués car les concentrations d'exposition sont généralement très élevées. Certains toxiques en mélange, par exemple le fer et le B(a)P, ont une action synergique sur les lésions induites au sein de l'organisme exposé. Cependant, les résultats des différentes études montrent que cette induction n'est pas une règle générale : la situation est en réalité plus complexe, car des mécanismes de compensation et d'adaptation face au stress oxydant peuvent se mettre en place et prévenir le développement de ce processus.

7/ REPONSES DES ANIMAUX AQUATIQUES AU STRESS OXYDANT DÛ AUX CONTAMINANTS DE L'ENVIRONNEMENT

Il est maintenant établi que les contaminants environnementaux peuvent augmenter le stress oxydant chez les organismes aquatiques (Winston *et al.*, 1990).

Les mollusques ont été les premiers organismes sentinelles utilisés dans les programmes de surveillance de la contamination chimique des écosystèmes aquatiques, tout d'abord en milieu marin puis en eau douce. Les bivalves sont de bons biomarqueurs d'exposition aux polluants, ce sont des bioaccumulateurs de certains composés chimiques néfastes pour l'environnement (métaux lourds, pesticides, hydrocarbures) (Solé *et al.*, 1996). Ces organismes sont remarquablement adaptés pour ce type d'étude pour de nombreuses raisons : animaux sédentaires pour la plupart, large distribution, coût réduit, facilité de collecte et bonne résistance au stress de prélèvement.

A/ Activités antioxydantes endogènes chez les animaux aquatiques

La production de dommages biologiques par des oxyradicaux dans les organismes aquatiques dépendra de l'efficacité des défenses antioxydantes (Michiels et Remacle, 1988).

Les mécanismes de protection impliquent un nombre élevé d'enzymes antioxydantes : la superoxyde dismutase, la catalase, les glutathion peroxydases, la glutathion réductase, la NAD(P)H dépendant DT-diaphorase et les piègeurs de radicaux libres tels que le glutathion (Livingstone *et al.*, 1992 ; Regoli *et al.*, 1998a). Ces enzymes jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (Cheung *et al.*, 2001). L'augmentation de leur activité reflète une réponse spécifique aux polluants (Doyotte *et al.*, 1997) et elles ont été proposées comme biomarqueurs du stress oxydant médié par les contaminants dans une large variété d'organismes marins, incluant les moules (Livingstone *et al.*, 1992 ; Regoli *et al.*, 1998a). La toxicité liée aux oxydants sera effective si ces enzymes sont inhibées, les dommages à l'ADN et la lipoperoxydation se manifesteront si le système n'est pas réparé (Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Xu *et al.*, 1999).

Il existe des essais qui prennent en compte la capacité des systèmes de défense antioxydants à piéger les oxyradicaux. L'index de résistance au stress oxydant ou TOSC (total oxidant-scavenging capacity) a été mesuré dans diverses fractions subcellulaires de la glande digestive de *Mytilus sp* (Regoli *et al.*, 1998b). L'index de résistance est exprimé en TOSC/ mg protéine et les mesures sont effectuées à partir d'homogénats cellulaires. Cet essai est approprié pour les oxydants solubles dans les lipides, et l'analyse de la fraction microsomale confirme l'importance des antioxydants associés aux membranes dans la protection contre la toxicité des radicaux de l'oxygène. Winzer *et al.* (2001) ont testé les effets de diverses substances (H₂O₂, B(a)P et Nitrofurantoïne) sur des cultures cellulaires d'hépatocytes de carrelets mâles et femelles afin d'évaluer l'impact du stress oxydant et les modulations liées au sexe. Ils ont montré qu'après 24 heures d'exposition la capacité de piéger les radicaux oxygénés augmente significativement après exposition au peroxyde d'hydrogène. Le B(a)P et la nitrofurantoïne induisent des réponses sexe-dépendantes. Les capacités de piégeage sont augmentées avec le B(a)P seulement dans les hépatocytes des femelles alors que la nitrofurantoïne initie ces réponses seulement dans les cellules des mâles. Les différences de réactions face au stress oxydant entre les mâles et les femelles, après exposition aux pro-oxydants, peuvent provenir de l'activation enzymatique démontrant ainsi l'importance des voies de biotransformation dans les réponses au stress.

Van der Oost *et al.* (1996) ont montré que chez l'anguille (*A. anguilla*) la présence d'adduits à l'ADN dans le foie des poissons exposés *in situ* est corrélée à la présence de xénobiotiques mutagènes et cancérigènes tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques.

De même, l'exposition de moules (*Mytilus edulis*) à des contaminants organiques de type HAP après le naufrage du pétrolier *Aegean Sea* montre l'induction de la lipoperoxydation et la présence d'adduits à l'ADN dans la glande digestive des bivalves (Solé *et al.*, 1996).

Ching *et al.* (2001) ont rapporté que l'exposition en laboratoire de moules (*Perna viridis*) à des concentrations croissantes en B(a)P (0 ; 0,3 ; 3 et 30 µg/L) durant 21 jours induit des niveaux élevés d'adduits à l'ADN au niveau hépatique. Cheung *et al.* (2001) ont montré que certains paramètres antioxydants (glutathion *S*-transférase, catalase et glutathion réduit) sont induits dans les branchies de bivalves (*P. viridis*) exposés pendant 30 jours *in situ* à des sédiments contaminés par des HAP.

Okay *et al.*, 2000 ont testé les effets d'un apport nutritionnel contaminé par le B(a)P chez la moule marine. L'ingestion d'algues contaminées par du B(a)P (50 µg/L) induit le système de monooxygénases microsomale à fonction multiple (MFO) [incluant les B(a)P hydroxylase (BPH) et les activités CYPc-NADPH réductase] dans la glande digestive de *Mytilus edulis* après 1 jour mais pas après 7 et 15 jours, indiquant une réponse transitoire du système MFO dans la glande digestive. Ils ont également observé une bioaccumulation du B(a)P dans le tissu entier des moules.

Il existe des différences de métabolisation entre les diverses espèces aquatiques. Ainsi, des xénobiotiques facilement métabolisables, comme le B(a)P, se retrouvent à des concentrations élevées en début de chaîne alimentaire chez les invertébrés marins après bioaccumulation, alors que les composés, comme le pentachlorophénol (PCP), sont bioaccumulés tout au long de la chaîne alimentaire et vont atteindre des concentrations importantes chez les prédateurs, tels que les vertébrés (Livingstone, 1998).

B/ Biomarqueurs du stress oxydant chez les organismes aquatiques

L'intérêt de l'utilisation d'organismes aquatiques réside dans la liaison pouvant être faite entre les réponses individuelles des organismes avec les changements dans les populations voire la communauté : de telles corrélations vont permettre un diagnostic rapide et précoce de l'impact des xénobiotiques sur la qualité de notre environnement. L'utilisation des invertébrés, qui sont présents en début de chaîne alimentaire, dans de telles stratégies va pouvoir prévenir et empêcher les effets hostiles sur les vertébrés. Si les mollusques aquatiques sont communément utilisés comme des bioindicateurs de contamination environnementale et particulièrement métallique, c'est en raison de leur capacité à bioaccumuler les polluants. L'étude du stress oxydant et de ses implications au niveau toxicologique, chez les organismes aquatiques, a débuté il y a une vingtaine d'années, après la mise en évidence d'activités antioxydantes chez les poissons. Ces résultats ont conduit les biologistes à étudier les mécanismes de production des espèces réactives de l'oxygène chez ces organismes et ses conséquences en terme de lipoperoxydation et de lésions à l'ADN. La contamination des écosystèmes est impliquée comme étant un facteur de stress oxydant et, ses effets sont étudiés chez les organismes aquatiques depuis plusieurs années (Cossu *et al.*, 1997b).

Les organismes aquatiques sont exposés fréquemment à des substances nocives, lors d'accidents de pollution, qui contribuent à augmenter les risques de stress oxydatif des communautés benthiques. Ainsi, l'accumulation de polluants, tels que les métaux lourds, au niveau des tissus va engendrer des radicaux de l'oxygène *via* le cycle redox.

L'utilisation de ces systèmes vivants sera primordiale pour la surveillance de la qualité des eaux et permettra d'évaluer les effets de ces substances au niveau de l'organisme.

Tableau VIII : Etudes rapportées dans la littérature portant sur l'exposition de vertébrés ou invertébrés aquatiques à des métaux

COMPOSES ETUDIÉS	ORGANISMES	DOSE	CONDITIONS D'EXPOSITION	ORGANES	LIPOPEROXYDATION ET STRESS OXYDANT	AUTEURS
Cadmium	Bivalves / marin <i>Mytilus edulis</i>	40 mg/L	6 jours	Glandes digestives Branchies	rien pour les 2 tissus	Viarengo <i>et al.</i> , 1988
Cuivre		0,04 mg/L			MDA ↑ dans les 2 tissus, ↓ GSH	
Zinc		0,08 mg/L			rien pour les 2 tissus	
Cadmium	Bivalves / marin <i>Ruditapes decussatus</i>	5; 50; 500 µg/L	20 minutes : fraction S9 incubé 20 mn à 25°C <i>In Vitro</i>	Glande digestive Branchies	A 500 µg/L, TBARS ↑ dans les G et B, avant pas de variation	Roméo et Gnassia-Barelli, 1997
Cuivre		6,25; 12,5; 25 µg/L			TBARS ↑ dès 6,25 µg Cu/L dans les branchies et les glandes digestives	
Mercure		0,005; 0,05; 0,5; 5 µg/L			TBARS ↑ dès 0,5 µg Hg/L dans les branchies et les glandes digestives	
Cuivre	Bivalves / marin <i>Ruditapes decussatus</i>	30 µg/L	4, 7, 9, 12 jours <i>In Vivo</i>	Glande digestive Branchies	TBARS ↑ dans les glandes digestives après 7 jours d'exposition	Roméo et Gnassia-Barelli, 1997
Cuivre	Bivalves / marin <i>Crassostrea virginica</i>	5; 10; 20; 40; 80 µg/L	4, 7, 14 jours <i>In Vivo</i>	Glande digestive	MDA ↑ à partir de 40 µg/L Pas d'effet sur [GSH]	Ringwood <i>et al.</i> , 1998
Cuivre	Bivalves / marin <i>Crassostrea virginica</i>	20 ou 80 µg/L	2, 4, 7 jours <i>In Vivo</i>	Glande digestive	MDA ↑ à 20 et 80 µg Cu/L Lipoperoxydation (MDA) plus élevée avec Cu + BSA que Cu seul	Connors et Ringwood, 2000
Cuivre + BSO		BSO : 20 mg/L				
Cuivre	Poisson / marin <i>Dicentrarchus labrax</i>	50; 250; 1000 ng/g i.p.	1 injection sacrifice 48 heures après	Rein : Fraction microsomale	MDA ↑ avec les concentrations en Cu	Roméo <i>et al.</i> , 2000
Cadmium		500; 1000; 2000 ng/g i.p.			Peu d'effet sur la lipoperoxydation (pas d'induction de MDA)	
Arsenic	Poisson / eau douce <i>Ictalurus punctatus</i>	0,01; 0,1; 1 mg/L	7 jours	Foie	TBARS : rien GSH : rien Induction des MT hépatiques	Schlenk <i>et al.</i> , 1997
Cuivre	Bivalves / eau douce <i>Unio tumidus</i>	30 µg/L	3 jours	Glande digestive Branchies	Pas d'effet sur la lipoperoxydation	Doyotte <i>et al.</i> , 1997
Thiram		100 µg/L			Pas d'effet sur la lipoperoxydation	
Cuivre + Thiram		30 µg Cu + 100 µg Th/L			Augmentation significative du MDA pour le mélange Cu+Th	

SOD : superoxyde dismutase, GPx : glutathion peroxydase, CAT : catalase, GRd : glutathion réductase, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, GST : glutathion-S-transférases, EROD : éthoxyrésorufine O-dééthylase, MROD : méthoxyrésorufine O-dééthylase, MDA : malondialdéhyde, TBARS : Substances réactives à l'ac. thiobarbiturique, BSO : Sulfoximine buthionine (inhibiteur de la synthèse de glutathion), i.p. : Intra-péritonéal

a/ Niveaux endogènes de la lipoperoxydation

L'étude du stress oxydant et de ses implications toxicologiques chez les organismes aquatiques a réellement débuté il y a environ vingt ans. Les mollusques aquatiques possèdent les mêmes systèmes antioxydants que les mammifères (Cossu *et al.*, 1997b). En dépit de la nature adaptative de ces défenses antioxydantes, une conséquence reconnue de la production accrue d'oxyradicaux est la lipoperoxydation.

Plusieurs études comparatives ont indiqué des degrés de peroxydation différents selon les organes et les espèces considérées. La production de radicaux de l'oxygène reste la plus élevée dans les organes aérobie les plus actifs métaboliquement : chez la morue (*Gadus morhua*), l'analyse *in vitro* montre des taux élevés dans le foie, puis les branchies et les muscles (Lemaire *et al.*, 1993). Les taux de lipides oxydés sont plus bas dans le foie que dans les branchies et les reins du poisson-chat (*Channa punctatus*), ils sont plus vulnérables aux attaques des espèces réactives cela est dû en partie à la différence de potentiel antioxydant de ces organes (Ahmad *et al.*, 2000). La sensibilité à la lipoperoxydation est plus faible au niveau de l'épithélium cilié de la trachée de rat que dans les branchies de moule *Mytilus edulis* (Karpenko et Odintsova, 1996). La lipoperoxydation est plus faible dans les branchies et les reins du bivalve *Mizuhopecten yessoensis* que dans sa glande digestive et ses gonades (Lukyanova et Khotimchenko, 1995).

Divers facteurs sont susceptibles de moduler le stress oxydant chez les organismes aquatiques. La lipoperoxydation est diminuée dans la glande digestive de bigorneaux (*Littorina littorea*) en anoxie durant 6 jours (Pannunzio et Storey, 1998). La production de radicaux de l'oxygène et la lipoperoxydation sont influencées par le sexe des individus exposés aux mêmes xénobiotiques (Winzer *et al.*, 2001) L'augmentation de température *in vitro* stimule la lipoperoxydation dans la glande digestive de la coquille Saint-Jacques (Viarengo *et al.*, 1995) et de la patelle *Nucella concinna* (Abele *et al.*, 1998), ainsi que dans le foie du poisson-épine *Terapon jarbua* (Chien et Hwang, 2001).

L'importance du régime alimentaire est à souligner, un apport en vitamine C va limiter la lipoperoxydation et le pourcentage d'acides gras polyinsaturés dans le foie de *Terapon jarbua* (Chien et Hwang, 2001). La lipoperoxydation est plus importante chez les organismes âgés et en période de ponte (Sawada *et al.*, 1993).

b/ Induction de la lipoperoxydation lors d'exposition à des composés minéraux et organiques

L'environnement aquatique est soumis à diverses pollutions dont la plupart sont d'origine anthropique. Les conséquences en terme de lipoperoxydation ont été analysées expérimentalement et *in situ*. L'avantage des approches en laboratoire est de mieux corréliser les résultats avec l'exposition des organismes mais les conditions expérimentales font souvent appel à des concentrations élevées de polluants et des durées d'exposition courtes. Ce type d'approche va simuler plutôt des conditions d'intoxication aiguë. Alors que, les études sur terrain semblent plus appropriées pour ce type d'étude. L'identification des contaminants, qui est nécessaire, n'est pas toujours aisée *in situ*.

Les principales études en laboratoire concernant les effets des métaux et des molécules organiques sur des organismes aquatiques ont été repertoriées dans les tableaux VIII et IX. Le tableau X présente les études réalisées *in situ*.

Tableau IX : Etudes rapportées dans la littérature portant sur l'exposition de vertébrés ou invertébrés aquatiques à des polluants organiques seuls ou en mélange *in vitro*

COMPOSES ETUDIÉS	ORGANISMES	DOSE	CONDITIONS D'EXPOSITION	ORGANES	LIPOPEROXYDATION ET STRESS OXYDANT	AUTEURS
B(a)P	Bivalves / marin <i>Mytilus edulis</i>	0,05 mg/L	2, 6 et 19 jours	Glande digestive	Induction de l'enzyme DTD à J6 Pas d'induction de la lipoperoxydation	Livingstone <i>et al.</i> , 1990
B(a)P H ₂ O ₂	Poisson / marin <i>Platichthys flesus</i>	50 et 100 µM	6 jours	Foie (hépatocytes)	[Oxyradicaux] ↑ après 2 ^H pour les faibles concentrations en BaP et H ₂ O ₂ (50µM)	Winzer <i>et al.</i> , 2000
B(A)P H ₂ O ₂	Poisson / marin <i>Platichthys flesus</i> Mâles et femelles	100 µM	2 et 24 heures	Foie (hépatocytes)	↑ Oxyradicaux après 2 ^H avec les 3 composés ; LP ↑ après 2 ^H avec H ₂ O ₂ pour les 2 sexes ↑ LP et TOSC après 2 ^H avec BaP pour les cellules femelles, ↑ après 2 ^H avec NF pour les cellules males	Winzer <i>et al.</i> , 2001
Nitrofurantoïne (NF)		100 µM				
		50 µM				
Dichlorvos (insecticide)	Poisson / eau douce <i>Cyprinus carpio</i> <i>Ictalurus nebulosus</i>	1 et 5 mg/L	24 heures	Foie Rein Branchies Muscle Cerveau	MDA : ↓ chez la carpe dans tous les tissus, × 2 dans le cerveau du poisson-chat et = dans les autres tissus, Induction du GSH, SOD pour les 2 espèces	Quy Hai <i>et al.</i> , 1997
Arochlor	Poisson / marin <i>Micropogonias undulatus</i>	0,42 mg/Kg nourriture	17 jours	Foie ovaires	× 3 dans le foie pas d'effet dans les ovaires ↑ GPx	Thomas et Wofford, 1993
Paraquat	Poisson / marin <i>Sparus aurata</i>	50 mg/Kg i.p.	2 et 7 jours	Foie	× 5 à J2, mort à J7, SOD : ↓	Pedrajas <i>et al.</i> , 1995
Arochlor		500* et 1000** mg/Kg i.p.	2 et 7 jours	Foie	Rien à J2 × 0,24* et × 0,52** à J7	
Dieldrine		0,15 et 0,67 mg/Kg i.p.	2 et 7 jours	Foie	× 3 à J2 et × 0,7 à J7 pour 0,15 mg/Kg × 1,8 à J2 et × 3 à J7 pour 0,67 mg/Kg + apparition de nouvelles isoformes SOD	
Malathion		1,5 et 7,5 mg/Kg i.p.	2 et 7 jours	Foie	× 2 à J2 et × 0,4 à J7 pour 1,5 mg/Kg = à J2 et × 1,6 à J7 pour 7,5 mg/Kg + apparition de nouvelles isoformes SOD	
2,4-D	Poisson / eau douce <i>Oreochromis niloticus</i>	27 ppm	24, 48, 72 et 96 heures	Foie	MDA : rien G6PD : ↑ GR : ↑ GPx : ↑ SOD : rien	Oruç et Üner, 2000
Azinphosmethyl		0,03 ppm			MDA : rien G6PD : ↑ GR : ↑ GPx : ↑ SOD : ↓	
2,4-D + Azinphosmethyl		mélange			MDA : rien G6PD : ↑ GR : ↑ GPx : ↓ SOD : ↑	
Iprodione	Poisson / eau douce <i>Oncorhynchus mykiss</i>	0,2; 0,3 et 0,4 mM	24 heures	Foie (hépatocytes)	MDA : ↑ ROS : ↑ GSH : ↓ CAT : ↓ pour 0.3 et 0.4 mM	Radice <i>et al.</i> , 2001
Methylarsonate Monosodium	Poisson / eau douce <i>Ictalurus punctatus</i>	0,01; 0,1 et 1 mg/L	7 jours	Foie	TBARS : rien GSH : rien Induction des MT hépatiques	Schlenk <i>et al.</i> , 1997
Effluents D'une Papeterie (Kraft)	Poisson / eau douce <i>Heteropneustes fossilis</i>	0,5; 1; 2 % (v/v)	15, 30, 60 et 90 jours	Branchies Foie Rein	TBARS : ↑ dans branchies et rein dans tous les cas de figure TBARS : ↑ dans foie à 0.5 % et à 90 jours	Fatima <i>et al.</i> , 2000
Effluents D'une Papeterie	Poisson / eau douce <i>Channa punctatus</i>	1 % (v/v)	15, 30, 60 et 90 jours	Branchies Foie Rein	TBARS : ↑ dans branchies et rein Lipoperoxydation déterminée à 60 jours seulement GSH : ↑ GPx : ↑ GST : ↑ CAT : ↑ (60 et 90 jours) dans le foie	Ahmad <i>et al.</i> , 2000
Endosulfane	Poisson / eau douce <i>Channa punctatus</i>	5 ppb	24 heures	Branchies Foie Rein	TBARS : ↑ GSH : ↑ GPx : ↑ GST : ↑ CAT : ↓	Pandey <i>et al.</i> , 2001

SOD : superoxyde dismutase, GPx : glutathion peroxydase, CAT : catalase, GRd : glutathion réductase, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, GST : glutathion-S-transférases, G6PD : glutathion-6-phosphate déshydrogénase, EROD : éthoxyrésorufine O-dééthylase, DTD : DT-diaphorase, 4-HNE : 4-hydroxynonanal, MDA : malondialdéhyde, TBARS : Substances réactives à l'ac. Thiobarbiturique, TOSC : Total oxidant-scavenging capacity

Exposition des espèces aquatiques à divers métaux (tableau VIII)

La toxicité des métaux peut s'exercer par la peroxydation lipidique considérée comme une des premières étapes de dommages des membranes cellulaires par les xénobiotiques (Viarengo *et al.*, 1988). La lipoperoxydation mesurée *in vitro* dans les reins du poisson *D. labrax* est plus élevée en présence de cuivre que de cadmium (Roméo *et al.*, 2000).

Une augmentation de la peroxydation est observée *in vitro* et *in vivo* dans les branchies et les glandes digestives du bivalve *M. edulis* (Viarengo *et al.*, 1988), et de la palourde *R. decussatus* (Roméo et Gnassia-Barelli, 1997), traités avec du cuivre alors que le cadmium n'induit aucun changement des concentrations en MDA. Les métaux de transition, tels que le fer et le cuivre, stimulent la peroxydation des lipides en agissant comme catalyseur de la formation des radicaux de l'oxygène chez ces deux espèces de mollusques. D'un autre côté, le cadmium qui n'entre pas dans le cycle redox sera incapable de stimuler le processus de lipoperoxydation dans les tissus testés. L'étude de Roméo *et al.* (2000) montre que le rein est l'organe principal de stockage du cadmium tandis que le foie accumule le cuivre.

L'induction de la lipoperoxydation dépend de l'espèce considérée. Le cadmium induit la lipoperoxydation dans les glandes digestives et les branchies de *Ruditapes decussatus*, un bivalve marin, à des taux de 500 µg/L (Roméo et Gnassia-Barelli, 1997). Il n'y a pas d'induction du stress oxydant dans le rein de *Dicentrarchus labrax* après injection intrapéritonéale de 500, 1000 et 2000 ng/g (Roméo *et al.*, 2000), ni dans les glandes digestives et les branchies de *M. edulis* exposés à 40 mg/L de cadmium (Viarengo *et al.*, 1988).

Exposition des espèces aquatiques à des molécules organiques (Tableau IX)

L'exposition au paraquat stimule la lipoperoxydation et l'intoxication est en général associée à des activités enzymatiques antioxydantes augmentées, en particulier les glutathion peroxydases, la superoxyde dismutase et la catalase. L'injection intrapéritonéale de paraquat à la dose de 50 mg/Kg à un poisson marin (*Sparus aurata*) a entraîné après 2 jours une augmentation des TBARS dans la fraction hépatique simultanément à une diminution de l'activité superoxyde dismutase (Pedrajas *et al.*, 1995). La lipoperoxydation est un élément significatif de la toxicité du paraquat, après 7 jours, Pedrajas *et al.* notent la mort des poissons intoxiqués.

L'induction de la peroxydation lipidique peut être spécifique de l'espèce ou du tissu considéré. L'étude de Quy Hai *et al.* (1997) a mis en évidence une réponse différente chez deux espèces de poissons d'eau douce lors d'exposition à un insecticide organophosphoré, le dichlorvos : L'exposition à des doses de 1 et 5 mg/L de ce pesticide entraîne l'induction des taux de MDA ($\times 2$), du glutathion et de la superoxyde dismutase dans le cerveau du poisson chat (*Ictalurus nebulosus*), mais pas dans le foie, le rein, les branchies et le muscle. Les auteurs ne notent pas d'induction de la lipoperoxydation chez la carpe (*Cyprinus carpio*). L'exposition aux effluents d'une papeterie - 1% (v/v) pendant 15, 30, 60 et 90 jours - a provoqué une induction de la lipoperoxydation et des systèmes antioxydants (glutathion, peroxydases, catalase) dans les branchies et les reins, mais rien au niveau de la glande digestive de *Channa punctatus* (Ahmad *et al.*, 2000).

Le stress oxydant peut également varier avec le sexe de l'individu : l'exposition *in vitro* à 100 µM de B(a)P induit, après 2 heures d'exposition, la lipoperoxydation dans des cultures primaires d'hépatocytes de femelles de poissons marins *Platichthys flesus*, alors que la nitrofurantoïne (50µM) initie ces réponses seulement chez les mâles (Winzer *et al.*, 2001). L'exposition au peroxyde d'hydrogène (100 µM) augmente les niveaux de lipoperoxydation dans les deux sexes.

Tableau X : Etudes reportées dans la littérature portant sur l'exposition *in situ* ou en laboratoire de vertébrés ou invertébrés aquatiques à des sédiments contaminés

TYPES D'ETUDES	ORGANISMES	POLLUANTS µg/g poids sec	ACCUMULATION µg/g poids frais	ORGANES	LIPOPEROXYDATION ET STRESS OXYDANT	AUTEURS
ETUDES IN SITU						
Estuaire de Huelva Mines de pyrite	Poissons / eau douce <i>Mugil sp.</i>	HAPs: 44 PCBs : 2,3 DTT: 7,1	Foie Cuivre: 51,1 Fer: 300	Foie	× 3 × 0,6 (hydroperoxydes) ↑ GSH GST SOD GPx CAT EROD	Rodriguez-Ariza <i>et al.</i> , 1993
Estuaire de Huelva Mines de pyrite	Bivalves / marin <i>Chamelea gallina</i> <i>Ruditapes decussates</i> <i>Crassostrea gigas</i>	HAPs: 44 PCBs : 2,3 DTT: 7,1	Métaux totaux(organisme entier) 132,4 58,8 1194,3	Organisme entier	× 0,8 = × 0,2 ↑ GST SOD GPx CAT	Rodriguez-Ariza <i>et al.</i> , 1992
Estuaire de Hooghly Port Haldia ; 3 stations Mesures avant, pendant et après la mousson	Crustacé / marin <i>Balanus balanoides</i>	HAPs	Référence : 0.7-0.5-0.4 Kachubaria : 0.8-0.6-0.5 Port Haldia : 5.1-4.5-3.1	Tissu digestif Glande et intestins	MDA ↑ dans station 3 (port) × 1.33 après mousson CAT et SOD ↑ dans st3 GST ↑ dans st3 avant mousson	Niyogi <i>et al.</i> , 2001
3 sites pollués près de Hong Kong	Bivalves / marin <i>Perna viridis</i>	PCBs(PCs) Réf. 149(89) Site2 289(131) Site 3 273(73) Site 4 515(175)		Glande digestive Branchie	MDA ↑ dans les branchies avec les niveaux élevés en pesticides chlorés ↑ GSH GST corrélées avec les taux élevés en PCBs dans les 2 tissus	Cheung <i>et al.</i> , 2001
Rivière (cokerie) 4 stations A (réf), B (avant), C et D (après)	Bivalves / eau douce <i>Unio tumidus</i>	HAPs (PCBs) Site B 24(2.06) SiteC 15.7(1.25) Site D 42(1.29)		Glande digestive Branchies	MDA site C ↑ GPx CAT MDA ↑ site D (× 3.5) ↓ GPx CAT GSH SOD	Cossu <i>et al.</i> , 1997
4 sites pollués Sites F(Fensch), M (Moselle), LG (Lot et Garonne), S (Sarthe) D'amont en aval	Bivalves / eau douce <i>Unio tumidus</i>	HAPs (PCBs) SiteF: 42 (1.29) SiteM : 8.2(386) SiteLG :1.4(1.2) SiteS : traces		Glande digestive Branchies	MDA ↑ site LG ↓ GSH GRd GPx (sites LG et F) ↑ GSSG site LG MDA ↑ site F (aval) ↓ GSH GRd GPx	Cossu <i>et al.</i> , 2000
Deux Rivières Warri (raffinerie) Ethiophe (mat.fécales)	Poissons / eau douce <i>Tilapia mariae</i> <i>Malapterurus electricus</i> <i>Thysia ansorgii</i>			Cœur Cerveau	× 2.8 Warri comparé à Ethiophe SOD ↑ et CAT mêmes taux × 1.8 Warri comparé à Ethiophe SOD ↑ et CAT mêmes taux	Isamah <i>et al.</i> , 2000
Fleuve Amazone	Poisson / eau douce <i>Colossoma macropomum</i>			Foie Sang Plasma	TBARS 10× plus élevés dans foie que dans sang et plasma SOD et CAT élevés dans foie	Marcon et Filho, 1999
ETUDES EN LABORATOIRE						
Sédiments contaminés 1, 2, 7 et 14 jours	Invertébré / humidité <i>Eisenia fetida andrei</i>	B(a)P 0.05, 1, 100 et 1000		Organisme entier	J ₁ → J ₂ : ↑ et J ₂ → J ₇ : ↓ et J ₇ → J ₉ : ↓ idem pour MROD, CAT et GST	Saint-Denis <i>et al.</i> , 1999
Sédiments contaminés 25, 80 et 144 jours	Poisson / marin <i>Limanda limanda</i>	HAPs : 310 PCBs : 0,015 Cd : 0,41 Hg : 0,85		Foie	J ₂₅ → J ₈₀ : ↑ (×4 à J ₈₀) J ₈₀ → J ₁₄₄ : ↓ (< référence) idem pour EROD, CAT et SOD	Livingstone <i>et al.</i> , 1993
Sédiments contaminés 2, 7, 14 et 28 jours	Poisson / eau douce <i>Ictalurus punctatus</i>	HAPs : 93 PCBs : 7		Foie	× 1.4 à 1.6 de J ₂ à J ₂₈ ↑ SOD, CAT, GSH, GSSG, EROD	Di Giulio <i>et al.</i> , 1993

SOD : superoxyde dismutase, GPx : glutathion peroxydase, CAT : catalase, GRd : glutathion réductase, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, GST : glutathion-S-transférases, EROD : éthoxyrésorufine O-dééthylase, MROD : méthoxyrésorufine O-dééthylase, MDA : malondialdéhyde, TBARS : Substances réactives à l'ac. thiobarbiturique

La stimulation du processus de peroxydation peut dépendre également des doses appliquées et du mode d'administration des xénobiotiques. L'iprodione, un fongicide dicarboximide, n'a pas d'effet sur les hépatocytes de truite (*Oncorhynchus mykiss*) à 0,2 mM, alors que des concentrations de 0,3 et 0,4 mM vont induire fortement et rapidement la lipoperoxydation accompagnée de la formation de radicaux de l'oxygène et de l'induction du cytochrome P450 1A1 (Radice *et al.*, 2001).

L'arochlor 1254, mélange de PCB, induit la lipoperoxydation, mais seulement s'il est administré dans l'alimentation. Thomas et Wofford (1993) ont montré que ce mélange augmentait les taux de TBARS dans les microsomes hépatiques de *Micropogonias undulatus* intoxiqués par des aliments contenant 0,42 mg/Kg d'arochlor. Aucun signe de stress oxydant n'a été noté après injection intrapéritonéale (500 et 1000 mg/Kg) chez *Sparus aurata* (Pedrajas *et al.*, 1995).

D'autres xénobiotiques organiques se sont montrés incapables d'induire la lipoperoxydation et les défenses antioxydantes : le B(a)P à faible dose (0,05mg/L) (Livingstone *et al.*, 1990), le 2,4-D et l'aziphosmethyl seuls ou en mélange (Oruç et Üner, 2000), le méthylarsonate monosodique (Schlenk *et al.*, 1997).

Exposition des organismes in situ (tableau X)

La diversité des caractéristiques écologiques des invertébrés et vertébrés aquatiques permet d'évaluer l'impact des contaminations sur un large éventail d'espèces qui diffèrent, par exemple, par leur mobilité, leurs sources de nourriture et leur comportement alimentaire (prédateurs, herbivores, mangeurs de dépôts) ou leur mode de vie. *In situ*, les sources de contamination sont multiples (HAP, PCB, métaux) et l'établissement de corrélation directe entre un type de polluant et la lipoperoxydation est difficile.

Une hausse de la lipoperoxydation (MDA) a été mesurée dans les tissus digestifs de crustacés marins prélevés dans l'estuaire de Hooghly (Inde) au niveau de la station la plus polluée par les HAPs (3,1 à 5,1 µg/g poids sec de tissu) par rapport au site de référence (0,4 à 0,7 µg/g poids sec de tissu) (Niyogi *et al.*, 2001). Les effets délétères de l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques ont également été rapportés chez des bivalves au sein d'une rivière contaminée (42 µg/g de sédiments) : les activités antioxydantes (GPx, GRd, SOD, GSH) sont dépassées face à l'augmentation de la cytotoxicité liée au stress oxydant (Cossu *et al.*, 1997b). Des stimulations similaires de la lipoperoxydation ont été obtenues lors de l'exposition de poissons au laboratoire à des sédiments contaminés par les HAPs et les PCBs (Livingstone *et al.*, 1993 ; Di Giulio *et al.*, 1993), même si les inductions de la lipoperoxydation étaient transitoires.

Quand les niveaux de pollution sont trop élevés, les systèmes de défense sont dépassés et chutent, tandis que le contenu en glutathion oxydé augmente confirmant les conséquences du stress oxydant. L'étude de Cossu *et al.* (2000) a montré que chez *Unio tumidus*, l'augmentation des taux de MDA et de GSSG, au niveau branchial, est la plus importante pour le site le plus pollué en HAPs soit 42 µg/g de sédiments. Des taux de MDA plus élevés ont été mesurés dans les branchies des bivalves prélevés au niveau des points les plus pollués par les pesticides chlorés (131 et 175 µg/g poids sec) et les PCBs (289 et 515 µg/g poids sec) par rapport au site de référence (149 µg/g pour les PCB et 89 µg/g poids sec pour les pesticides chlorés) (Cheung *et al.*, 2001).

Des diminutions des taux de MDA ont été rapportées lors de deux études menées par Rodriguez-Ariza *et al.* (1992, 1993) sur l'estuaire de Huelva contaminé par les HAPs, PCBs et les métaux (fer et cuivre). L'inhibition de la lipoperoxydation chez le poisson et les bivalves s'explique par une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes et des enzymes de détoxification (GST) tandis que le contenu en GSSG confirmait la réalité d'un stress oxydatif.

Dans certains cas, l'induction de la lipoperoxydation est transitoire et, on note une baisse des taux de MDA alors que les conditions d'expérimentation ne sont pas modifiées (Livingstone *et al.*, 1993 ; Saint Denis *et al.*, 1999).

L'exposition des organismes aquatiques aux xénobiotiques en laboratoire aboutit souvent à l'induction de la peroxydation lipidique. Ceci s'explique par des concentrations d'exposition expérimentales souvent très élevées.

Les résultats des différentes études *in situ* montrent que cette induction n'est pas une règle générale: la situation est en réalité plus complexe car des mécanismes de compensation et d'adaptation face au stress peuvent se mettre en place et prévenir le développement du processus de lipoperoxydation.

Les réponses face au stress oxydant peuvent être transitoires : les niveaux de lipoperoxydation peuvent retrouver leurs taux initiaux après une première phase d'induction, alors que les conditions d'intoxications ne semblent pas avoir été modifiées. Ces effets temporaires sont visibles par exemple dans les études de Livingstone *et al.* (1993), sur des poissons exposés pendant 144 jours au laboratoire à des sédiments contaminés par les HAP et les PCB ou dans celles de Saint-Denis *et al.* (1999) sur invertébrés terrestres (*Eisenia fetida andrei*) prélevés *in situ* sur des sites contaminés par du B(a)P.

Le retour à des taux physiologiques, après induction, peut traduire un effet compensatoire. L'augmentation de la lipoperoxydation témoignera dans un premier temps de l'attaque des membranes biologiques par les oxyradicaux, que les systèmes de protection enzymatiques, activés dans un second temps, réduiront en limitant la surproduction des radicaux.

Tableau XI : Etudes rapportées dans la littérature portant sur la mesure de la 8-OHdG après exposition en laboratoire ou *in situ* de vertébrés ou invertébrés aquatiques à des xénobiotiques

COMPOSES ETUDIÉS	ORGANISMES	DOSE	CONDITIONS D'EXPOSITION	ORGANES	8-OHdG	AUTEURS
Nitrofurantoïne	Poisson / marin <i>Parophrys vetulus</i>	0.1, 1, 10 mg/Kg	72 heures	Foie Rein Sang	dose-réponse à 0.1-10 mg/Kg : × 8 à ×16 × 2 à 10 mg/Kg × 3 à 10 mg/Kg	Nishimoto <i>et al.</i> , 1991
		Cinétique: 10 mg/Kg	1, 2, 3, 5, 7 jours	Foie	↗ maximale à J ₁ J ₂ et J ₃ (× 4) ↘ aux contrôles à J ₅ et J ₇	
B(a)P	Bivalves / marin <i>Mytilus galloprovincialis</i>	0.5, 5, 50, 100, 500, 1000 ppb	48 et 72 heures	Glande digestive	dose-réponse de 0.5 à 100 ppb (× 2) puis ↘ à J ₇₂ ↗ à J ₄₈ à 1000 ppb (× 2,3)	Canova <i>et al.</i> , 1998
				Branchies	dose-réponse de 5 à 100 ppb (× 4) puis ↘ à J ₇₂ ↗ maximale à J ₄₈ à 5ppb (× 2)	
t-BOOH	Poisson / eau douce <i>Ictalurus punctatus</i> Poisson / marin <i>Ameriurus nebulosus</i>	40 mg/Kg i.p.	6, 24 et 48 heures	Foie	<i>A. nebulosus</i> : pas de changement <i>I. punctatus</i> : ↗ maximale à J ₄₈ (× 4) chez 1 individu sur 6	Ploch <i>et al.</i> , 1999
Cuivre (CuCl ₂)	Poisson / marin <i>Sparus aurata</i>	0.17 mg/Kg i.p.	2 jours	Foie Branchies Sang	↗ 8-OHdG dans les branchies après 8 et 24 heures, ↘ après 48 heures	Rodriguez-Ariza <i>et al.</i> , 1999
Paraquat		42.5 mg/Kg i.p.				
Malathion		6.38 mg/Kg i.p.	7 jours			
Dieldrine		0.85 mg/Kg i.p.				
Tamoxifène	Invertébré / marin <i>Paracentrotus lividus</i>	1, 2.5, 5, et 7.5 × 10 ⁻⁷ M	2 heures (gamètes mâles)	Embryons (blastula)	dose-réponse de 1 à 2,5.10 ⁻⁷ M (× 2 à × 4 en moyenne) ↘ aux fortes concentrations (5 ; 7,5.10 ⁻⁷ M)	Pagano <i>et al.</i> , 2001
ETUDE IN SITU	ORGANISMES	DOSE	CONDITIONS D'EXPOSITION	ORGANES	8-OHdG	AUTEURS
Etude de transfert : 2 stations d'études Redhead = site contrôlé Burwood = site perturbé	Bivalves / marin <i>Saccostrea commercialis</i>	Métaux (Pb, Hg, Co, Ni)	3 mois	Branchies	Pas de différence de concentration entre les 2 sites	Avery <i>et al.</i> , 1996
2 lacs du Canada : Wabush Shabogomo (référence)	Poisson / eau douce <i>Salvelinus namaycush</i>	Fe ₃ O ₄ et Fe ₂ O ₃ 279 µg Fe/L <20 µg Fe/L		Foie	= par rapport au site de référence	Payne <i>et al.</i> , 1998
2 stations de la Baie de Cadiz : San Fernando = chantier naval Puerto Real = site propre	Poisson / marin <i>Sparus aurata</i>	HAPs PCBs métaux		Foie	Taux de 8-OHdG plus élevé à San Fernando (× 1,5) par rapport au site de Puerto Real	Rodriguez-Ariza <i>et al.</i> , 1999

i.p. : intra-péritonéal ; ppb ; ; partie par billion

C/ Induction de la 8-OHdG chez les organismes aquatiques

La mesure de la 8-OHdG reste une méthode relativement récente pour examiner les lésions à l'ADN, comparé à la technique du test des Comètes ou du postmarquage au ^{32}P . Le nombre de travaux publiés sur les organismes aquatiques, à ce jour, est beaucoup moins important que celui portant sur la lipoperoxydation.

Une augmentation des lésions oxydatives à l'ADN résultant de l'exposition à des contaminants a été mise en évidence chez les poissons et les mollusques. Le tableau XI présente les résultats obtenus après exposition d'animaux aquatiques à des xénobiotiques en laboratoire ou *in situ*.

Des concentrations élevées de 8-OHdG dans les tissus de poissons ont été reportées pour des expositions expérimentales aiguës de quelques heures (Ploch *et al.*, 1999), ou de plusieurs jours (Nishimoto *et al.*, 1991) à des xénobiotiques (nitrofurantoïne, B(a)P, métaux de transition), et chez des poissons prélevés dans des écosystèmes marins contaminés (Rodriguez-Ariza *et al.*, 1999). Ces études ont indiqué une augmentation de 1,5 à 16 fois des niveaux hépatiques de 8-OHdG chez les poissons exposés par rapport aux contrôles. Payne *et al.* (1998) n'ont par contre pas observé de modifications dans les taux de 8-OHdG chez les poissons *Salvelinus namaycush* capturés dans un lac pollué par du minerai de fer au Canada.

Les études concernant l'induction de 8-OHdG chez les invertébrés aquatiques sont plus rares. Canova *et al.* (1998) ont montré des augmentations des taux de 8-OHdG dans les glandes digestives et les branchies de moules (*Mytilus galloprovincialis*) exposées à diverses concentrations de B(a)P. De même, les expériences de génotoxicité du Tamoxifène (anti-œstrogène utilisé pour le traitement de cancers du sein), réalisées par Pagano *et al.* en 2001, ont révélé des inductions des taux de 8-OHdG dans les embryons d'oursins (*Paracentrotus lividus*), après seulement deux heures d'exposition. Les travaux *in situ* d'Avery *et al.* en 1996 n'ont pas indiqué d'augmentation de la 8-OHdG dans les branchies d'huîtres (*Saccostrea commercialis*) en relation avec l'exposition aux polluants chimiques.

Plusieurs études comparatives ont indiqué des degrés de formation de la 8-OHdG différents selon les organes et les espèces considérées. Bien que les taux de bases oxydées soient plus élevés dans le foie du poisson-chat (eau douce) que chez le poisson-globe (marin) exposés au *t*-BOOH, un oxydant exogène, les niveaux observés ne sont pas significativement différents des témoins (Ploch *et al.*, 1999).

Ces résultats suggèrent que les cellules hépatiques de ces deux espèces de poissons sont peu sensibles à la formation de dommages à l'ADN, même après l'exposition à un sévère stress oxydant. Rodriguez-Ariza *et al.* (1999) ont étudié les effets de quatre xénobiotiques (cuivre, paraquat, malathion et dieldrine) dans le foie, les branchies et le sang chez *Sparus aurata*. Aucun changement n'a été enregistré après injection de cuivre (0,17 mg/Kg) ou de malathion (6,38 mg/Kg) quel que soit le tissu analysé ; le paraquat (42,5 mg/Kg) a provoqué une augmentation des taux de 8-OHdG dans les branchies après 8 et 24 heures tandis que la dieldrine a induit une hausse de 63% des niveaux de bases oxydées par rapport aux témoins dans le foie.

Les exemples cités précédemment illustrent la différence de sensibilité entre les divers tissus d'un même organisme exposé à certaines substances génotoxiques ou pro-oxydantes.

Dans des conditions physiologiques normales, les systèmes cellulaires sont soumis à des attaques continues par des agents de stress de sources endogènes et/ou exogènes. L'organisme réagit par un ensemble complexe de systèmes de protection afin de limiter les actions de ces agents. L'exposition de l'organisme à diverses sources de contamination va créer un déséquilibre en faveur des espèces réactives amenant une situation de stress oxydant à l'origine de dommages tissulaires et génomiques.

L'utilisation des marqueurs de stress oxydant est intéressante dans le diagnostic environnemental pour mettre en évidence les effets délétères résultant de l'exposition à une pollution. Les biomarqueurs sont au diagnostic écotoxicologique, ce que les analyses biologiques sont au diagnostic médical, en d'autres termes ils sont indispensables pour détecter rapidement un dysfonctionnement susceptible d'avoir des répercussions à terme.

Le malondialdéhyde (MDA) a été choisi dans cette étude comme marqueur de l'oxydation des lipides membranaires pouvant conduire à la nécrose cellulaire. De manière à refléter les altérations génomiques, l'hydroxylation en C₈ de la guanine a été étudiée en parallèle des mesures du MDA lors de nos travaux. L'augmentation éventuelle des taux de MDA et de 8-OHdG témoigne d'un impact biologique des conditions environnementales.

Notre étude vise à valider ces deux marqueurs de toxicité pour la surveillance des populations exposées aux polluants dans les milieux aquatiques. L'application de ces deux paramètres en parallèle nous révélera (i) si l'exposition à des contaminants induisant une peroxydation lipidique consécutive à un stress oxydant, peut entraîner des lésions oxydatives de l'ADN, et (ii) si la guanine oxydée choisie comme marqueur de génotoxicité est représentative d'autres lésions structurales et fonctionnelles de l'ADN.

Peu d'études relevées dans la littérature portent sur l'association de paramètres de cytotoxicité et de génotoxicité chez les bivalves. Nous avons choisi de travailler sur des bivalves d'eau douce qui peuvent se révéler d'intéressants indicateurs pour le contrôle de la qualité des écosystèmes aquatiques dulçaquicoles.

Une approche *in situ* sur des populations d'*Unio tumidus* exposés à des sédiments contaminés permettra d'évaluer l'intérêt de la mesure des taux de MDA et de 8-OHdG en tant qu'indicateurs précoces de perturbations. Les expérimentations en laboratoire nous révéleront si la 8-OHdG est représentative des lésions de l'ADN. Ce travail devrait apporter des réponses concernant les relations entre l'induction de la lipoperoxydation et la formation de la 8-OHdG.

MATERIEL ET METHODES

1/ MATERIEL BIOLOGIQUE

Les mollusques aquatiques et surtout les bivalves sont utilisés comme des bioindicateurs de contaminations environnementales en raison de leur capacité à bioaccumuler les polluants (Solé *et al.*, 1996). L'utilisation de moules autochtones ou encagées comme bioindicateurs de contamination chimique par les HAP, par exemple, a progressivement évolué comme un moyen de surveillance des pollutions marines. Cette approche, nommée « Mussel Watch », a été conçue à l'origine pour contrôler les concentrations en contaminants dans les régions côtières (O'Connor, 1996, 1998). De tels programmes de biosurveillance ont été réalisés aux USA (NS&T ou « National Status and Trends ») et en France (RNO ou Réseau National d'Observation de la Qualité du Milieu Marin) avec des huîtres et des moules marines ou provenant d'estuaires (Cantillo, 1998). L'espèce *Mytilus edulis* a été employée pour l'étude et le suivi des concentrations en éléments traces, en HAP et CHC de 1986 à 1994 au niveau des estuaires et des zones côtières de la Mer du Nord et de la Mer Baltique (Ostapczuk *et al.*, 1997).

A/ Généralités

Les dosages des différents paramètres biologiques ont été réalisés sur les glandes digestives et les branchies d'un bivalve d'eau douce, *Unio tumidus* Philipsson.

a/ Systématique

EMBRANCHEMENT : Mollusques

CLASSE : Bivalves Lamellibranches

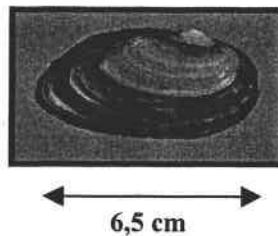
ORDRE : Eulamellibranches (Métabranchiés)

SUPERFAMILLE : Unionacés

FAMILLE : Unionidés

GENRE : *Unio*

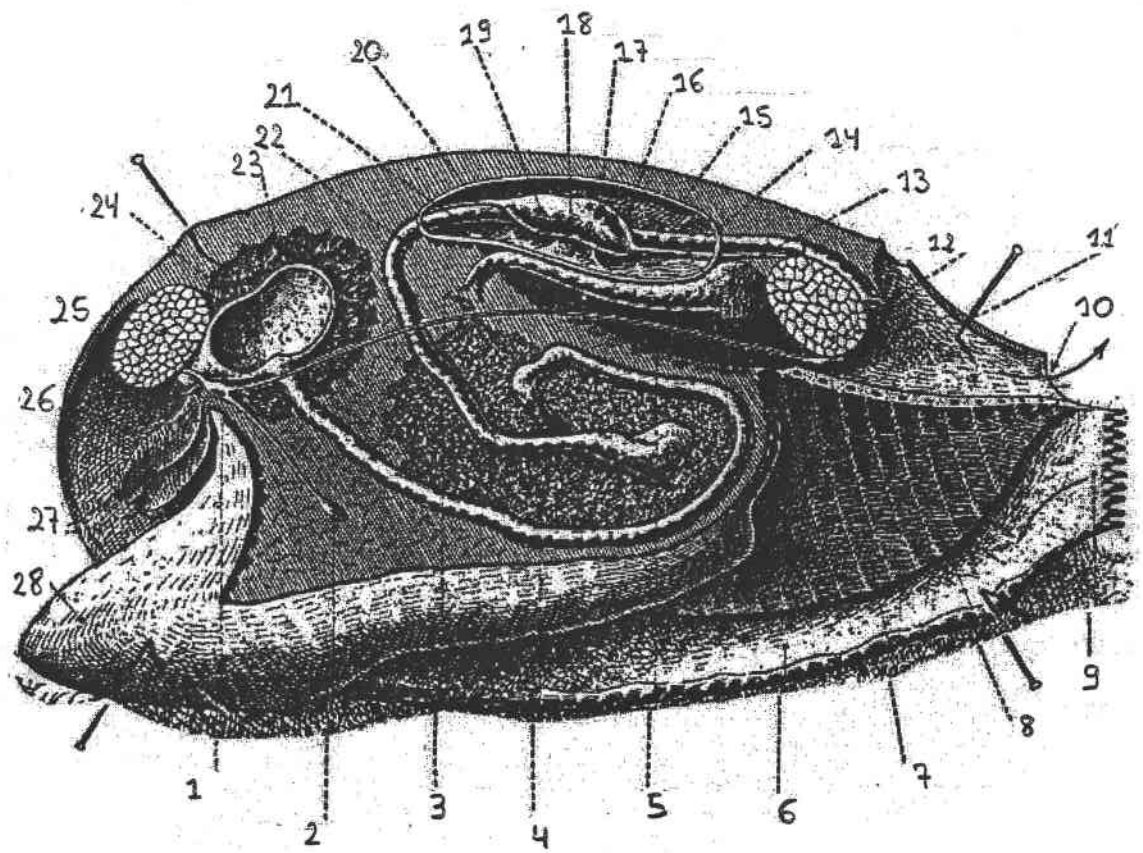
ESPECE : *tumidus*



b/ Morphologie

L'embranchement des Mollusques est très important numériquement (40 000 espèces actuelles environ).

Le corps mou de l'animal, non segmenté, est subdivisé en trois parties essentielles (tête, pied, masse viscérale) et partiellement protégé par une coquille calcaire sécrétée par la face dorsale du manteau (ou *pallium*) qui délimite la cavité palléale dans laquelle se localisent les branchies.



Légende :

- | | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 1) ganglion cérébral | 15) rectum |
| 2) ganglion du pied | 16) péricardium |
| 3) pore excréteur | 17) manteau péricardique |
| 4) glande génitale | 18) oreillette droite |
| 5) rein | 19) ventricule |
| 6) manteau | 20) aorte antérieure |
| 7) ganglion viscéral | 21) ouverture réno-péricardique |
| 8) branchie | 22) intestin |
| 9) siphon ventral | 23) glande digestive |
| 10) siphon dorsal | 24) estomac |
| 11) muscle adducteur postérieur | 25) muscle adducteur antérieur |
| 12) anus | 26) bouche |
| 13) canal excréteur | 27) palpe labial |
| 14) aorte postérieure | 28) pied |

Figure 9 : Anatomie d'un bivalve lamellibranche

Les mollusques possèdent un pied ventral musculeux, souvent cilié, qui joue un rôle dans la locomotion. Ils ont un manteau qui enveloppe la masse viscérale dorsale et qui sécrète la coquille composée principalement de carbonate de calcium. La coquille protège l'animal mais ne l'entoure pas entièrement.

Le manteau forme généralement un repli vers l'intérieur de la coquille à la jonction du pied, la cavité formée par ce repli appelée cavité palléale renferme typiquement les organes respiratoires. Les mollusques possèdent une radula qui est une structure en forme de râpe utilisée pour l'alimentation (Tachet *et al.*, 2000).

B/ Classe des bivalves

Les bivalves lamelibranches sont des mollusques aquatiques, généralement fousseurs, à symétrie bilatérale dont le corps est protégé par deux valves presque toujours externes, reliées dorsalement par un ligament élastique qui tend à les écarter et souvent engrenées par des dents constituant une charnière. La fermeture des valves est assurée par deux muscles adducteurs qui les relient l'une à l'autre. Le muscle adducteur antérieur peut s'atrophier ou quelquefois disparaître au cours du développement.

L'anatomie d'un bivalve lamelibranche est présentée sur la figure 9.

Les branchies, l'une droite, l'autre gauche, consistent généralement en deux lames branchiales suspendues à un axe pouvant s'étendre de la bouche à l'anus, vers le haut de la cavité palléale. Ces lames branchiales sont le plus souvent formées chacune par deux séries de longs filaments repliés sur eux-mêmes en U, de sorte que l'ensemble de leurs parties proximales forme deux feuilletts descendants voisins. La ciliation assure la filtration de l'eau au niveau des branchies qui est rejetée par un orifice exhalant postérieur et effectue la capture puis le tri des particules alimentaires qui sont dirigées vers la bouche.

Les bivalves sont des microphages, ils n'ont pas de radula, et se nourrissent par filtration de particules en suspension comprenant le phytoplancton, le zooplancton et les résidus organiques ou seston.

Les bivalves d'eau douce appartiennent tous à l'ordre des Eulamelibranches. Ils sont représentés par trois superfamilles : les Unionacés, les Corbiculacés et les Dreissenacés.




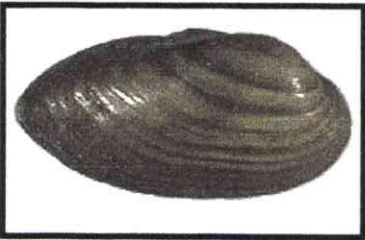
Famille des Unionidés

Chez les Unionacés, la maturité sexuelle est atteinte au bout de six à douze ans. La période de reproduction commence à la fin de la période hivernale et se poursuit jusqu'à l'automne. Les Unionacés ne produisent qu'une seule génération par an (Germain, 1931).

Les Unionidés sont unisexués à fécondation interne et ovipares. Les œufs (0,25-0,3 mm de diamètre chez l'Anodonte) sont en nombre important : jusqu'à 200 000 chez les Unionidés. Dès leur fécondation, les œufs s'accumulent dans les branchies, le plus souvent dans le feuillet branchial externe qui sert de poche incubatrice appelée marsupium.

Après quelques mois, les embryons (ou *glochidium*) sont expulsés au dehors. Les glochidies mènent d'abord une vie pélagique, puis elles se fixent par ses crochets au corps d'un poisson (sur les branchies, les écailles ou les nageoires suivant les genres).

Tableau XII : Les genres d'Unionidés (Tachet *et al.*, 2000)

GENRE	CARACTERISTIQUES
<p data-bbox="404 197 540 225">Anodonta</p>  <p data-bbox="401 504 543 532"><i>A. anatina</i></p>	<p data-bbox="787 197 1389 336">Charnière sans dent, valves minces et fortement bombées, apex des jeunes individus garni de fines rides lamelleuses (de 4 à 12), jusqu'à 150 mm de long.</p>
<p data-bbox="365 538 576 566">Pseudanodonta</p>  <p data-bbox="394 834 547 861"><i>P. littoralis</i></p>	<p data-bbox="787 538 1389 683">Charnière sans dent, valves minces et faiblement bombées, apex des jeunes individus garni de fines rides lamelleuses (de 3 à 5), jusqu'à 90 mm de long.</p>
<p data-bbox="404 868 540 895">Potomida</p>  <p data-bbox="394 1178 547 1206"><i>P. littoralis</i></p>	<p data-bbox="787 868 1389 974">Valves épaisses sub-circulaires, noirâtres, la hauteur correspond au deux tiers de la longueur</p> <p data-bbox="787 978 1180 1010">Une seule espèce : <i>P. littoralis</i></p>
<p data-bbox="433 1215 503 1242">Unio</p>  <p data-bbox="394 1525 543 1553"><i>U. tumidus</i></p>	<p data-bbox="787 1215 1389 1321">Apex érodé, valves à bord ventral droit ou convexe, dents latérales postérieures présentes.</p>

Les cellules du poisson en contact avec l'embryon prolifèrent, et en quelques heures, entourent complètement le parasite d'une sorte de kyste (ou thylacie).

Au bout de plusieurs semaines, la paroi du kyste qui enrobe l'animal s'amincit et se rompt : le jeune Unionidé tombe sur le fond. Il mesure environ 10 mm et n'a pas d'organes génitaux.

La plupart des espèces libèrent leurs glochidies à la fin du printemps ou pendant l'été, cet évènement pouvant être consécutif à l'augmentation de la température de l'eau.

Le cycle de vie des bivalves Unionidés dure plusieurs années. L'embryon mettra 3 ans pour atteindre la taille adulte (Germain, 1931). La longévité des Unionidés est comprise entre dix et trente ans. Il existe 4 genres d'Unionidés : les genres *Anodonta*, *Pseudanodonta*, *Potomida* et *Unio* (tableau XII).

Les Unionidés sont largement répandues en France et en Europe. Les espèces *Unio tumidus* et *Unio pictorum* sont présentes dans les régions nord et nord-est de la France au niveau des cours d'eau et des étangs. L'ensemble de nos travaux a porté sur l'espèce *Unio tumidus*.

L'espèce *Unio tumidus* vit dans les écosystèmes dulçaquicoles à l'interface eau-sédiment. Sa coquille, fortement nacrée intérieurement, est recouverte d'une épaisse cuticule très foncée de couleur brun-vert.

Unio tumidus nous est apparu comme un organisme de choix pour diverses raisons :

- Les travaux de Mouthon et Charvet (1999) ont permis d'établir une échelle de sensibilité des genres et des familles de mollusques face aux pollutions biodégradables. Cette échelle se compose de 13 groupes classés selon leur sensibilité. Les espèces les plus tolérantes appartiennent au groupe 1. Les espèces les plus sensibles dépendent du groupe 13. Les résultats montrent que les espèces *Unio tumidus*, *Pseudanodonta elongata* et *Myxas glutinosa* sont parmi les plus sensibles à une pollution organique. C'est pourquoi il est intéressant d'intégrer ces espèces comme indicateurs de la qualité d'écosystèmes aquatiques lors de programmes de surveillance environnementaux.
- sa taille (6,5 cm de long en moyenne) permet la mesure individuelle de divers paramètres biochimiques au sein d'un même tissu ce qui est intéressant pour étudier la variabilité inter-individuelle ;
- du fait de sa position à l'interface eau-sédiment, sa réponse peut refléter l'impact des contaminants présents dans l'eau et les sédiments ;
- sa faible mobilité permet la mise en cage des individus sans effet de stress secondaire et les études de transfert sur des sites perturbés.

Les voies de contamination des mollusques aquatiques par des xénobiotiques présents dans le milieu environnant sont multiples. Les deux voies principales de contamination des bivalves sont :

- par assimilation directe à travers les membranes cellulaires. Le polluant sous forme dissoute va diffuser à partir des branchies dans l'hémolymphe et passer dans les divers compartiments cellulaires où il pourra exercer son action toxique,

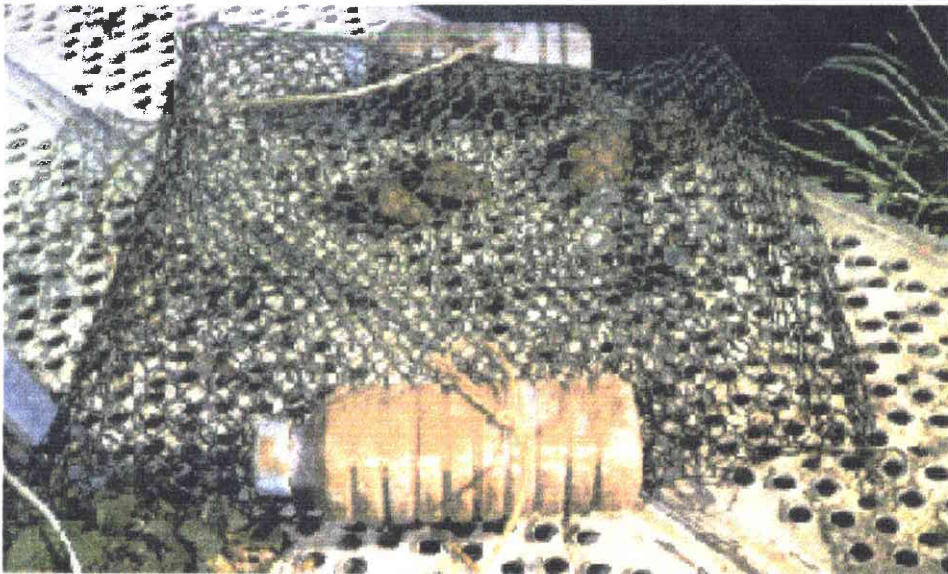
- par assimilation indirecte à partir des particules digérées dans le tractus intestinal.

L'importance relative de ces mécanismes peut varier selon les espèces (Das et Jana, 1999). Parmi ces deux voies d'assimilation, la voie directe est impliquée dans le transport des ions métalliques sous forme ionique ou complexée sur les sites récepteurs, par transfert à travers les membranes biologiques (Vercauteren et Blust, 1999). Dans de nombreux cas, seul le métal sous forme libre peut interagir avec le site de liaison des composés biologiques. En général, la forme ionique des métaux, incluant le cadmium, le zinc et le fer, est biodisponible aux organismes aquatiques, et la concentration totale en métaux dans l'eau ne fournit pas une indication fiable sur la biodisponibilité (Das et Jana, 1999). Kaspler (1999) a montré que les sels de Cd et de Zn sous forme de sulfates ont des effets plus importants sur le métabolisme énergétique et la survie d'*Unio tumidus* par rapport aux effets des sels sous forme de chlorures.

Figure 10 : L'étang de Manom, un site témoin d'échantillonnage des bivalves



Figure 11 : Exemple de cage utilisée lors des études de transfert



2/ ECHANTILLONNAGE, CONSERVATION ET PREPARATION DES TISSUS

A/ Echantillonnage et conservation des tissus

Lors des études de transfert et des expérimentations au laboratoire, les bivalves ont été prélevés dans deux sites de référence localisés à proximité du laboratoire :

- un étang (Manom) qui a servi lors des études réalisées entre septembre 1998 et décembre 1999 (figure 10),

- un second site moins étendu (la Maxe), sur lequel ont été prélevés les organismes utilisés pour les études réalisées entre janvier 2000 et septembre 2001.

L'utilisation de deux sites d'échantillonnage différents a permis de préserver l'espèce autochtone *Unio tumidus* et éviter la disparition de cette population par prélèvement intensif des individus à Manom. Des analyses physico-chimiques ont été effectuées régulièrement sur les sédiments afin de contrôler le maintien de la qualité des sites en évaluant la présence de polluants organiques et de métaux à l'origine d'un stress oxydant.

Les bivalves ont été prélevés manuellement en fouillant le sédiment sur environ 10 cm de profondeur. La taille des individus était comprise entre 5,5 et 6,5 cm, ce qui correspondait à des organismes adultes.

L'échantillonnage du sédiment sur l'ensemble des sites a été effectué selon les conseils de techniciens de l'Agence de l'eau ; les sédiments sont prélevés sur 8-10 cm de profondeur à l'aide d'un godet, puis on laisse décanter et l'eau résiduelle est éliminée, on procède ainsi jusqu'à l'obtention d'une quantité suffisante de sédiments que l'on conserve à 4°C durant le trajet et jusqu'aux analyses.

Les bivalves issus du site témoin ont été immédiatement transférés sur les sites étudiés en utilisant des glacières contenant de l'eau provenant du site de prélèvement. Les cages (40 X 30 X 10 cm) ont été préparées à partir de grillage plastifiée avec une maille de 10 mm. Elles étaient légèrement enfoncées dans le sédiment (environ 5 cm) et fixées à un piquet métallique (80 cm) planté également dans le sédiment plus profondément. Les cages contenant 6 moules ont été laissées pendant 7 et 21 jours sur chacun des sites (figure 11). Ces durées d'exposition ne sont pas arbitraires: les précédents travaux effectués par notre équipe de recherche (Cossu *et al.*, 1997; Doyotte *et al.*, 1997; Cossu *et al.*, 2000) ont montré l'augmentation des effets liés au stress oxydant dans les tissus des organismes exposés pendant 7 jours, des retours à des niveaux de base des taux de MDA et des systèmes antioxydants ont été observés après 21 jours d'exposition alors que ce phénomène de récupération n'était pas visible après 15 jours.

Des bivalves ont été encagés sur le site témoin d'origine de manière à contrôler l'absence de stress liés à l'encagement ou à la présence de perturbations chimiques. Sur chaque site, deux cages ont été utilisées correspondant au 2 temps d'exposition.

Le choix des sites pour les études de transfert a été déterminé par la présence de sédiments et de nutriments. Des études écologiques sur la faune et la flore ont permis de justifier la qualité des sites. La présence d'*Unios* dans la Moselle a été vérifiée par contre cela n'a pas été le cas concernant les gravières.

Après chacun des temps d'exposition, les bivalves ont été disséqués sur le terrain et les glandes digestives et les branchies prélevées et congelées immédiatement dans l'azote liquide. Les tissus ont été conservés dans l'azote liquide jusqu'à l'analyse. L'homogénéisation, la préparation des fractions subcellulaires et les dosages des divers paramètres ont été réalisés selon les protocoles préalablement établis par Cossu (1996) et Doyotte (1998).

B/ Préparation des échantillons pour le dosage du MDA

a/ Préparation des homogénats de glandes digestives et de branchies

Après une décongélation rapide, les tissus sont pesés et homogénéisés dans du tampon phosphate 50 mM (pH=7,6) auquel sont ajoutés du phénylméthylsulfonylfluorure (PMSF), un inhibiteur des sérines protéases et un mélange sérine-borate (inhibiteur de la γ -glutamylcystéine transpeptidase qui hydrolyse le glutathion) à des concentrations finales dans le tampon de 1 mM.

L'ensemble des étapes d'homogénéisation a été réalisé à 4°C.

Afin de préserver l'intégrité des organites cellulaires, les glandes digestives ont été homogénéisées manuellement par 3 tours de Potter Elvehjem à raison de 2 mL de tampon pour 500 mg de tissu.

Pour les branchies, 6 tours de Potter ont été nécessaires et l'homogénéisation a été faite dans 2 mL de tampon pour 1000 mg de tissu.

L'homogénat ainsi obtenu a immédiatement été utilisé pour la détermination du MDA.

b/ Protocole expérimental en vue du dosage du MDA

La peroxydation des lipides est évaluée par le dosage du malonaldéhyde (MDA) libre, selon la technique décrite par Behrens et Madère (1991), qui est une méthode chromatographique par appariement d'ions. Elle a été retenue pour sa sensibilité et sa spécificité.

- L'échantillon est déprotéinisé avec 50 % d'éthanol Chromanorm (95-96 % vol.) à 4°C pendant 1 heure.
- Il est ensuite centrifugé à 30000 g pendant 30 minutes à 4°C : le surnageant recueilli est dilué au ¼ ou au ½ dans du tampon phosphate de sodium, 30 mM, pH 5,5, contenant 25 % d'éthanol.
- Un volume de 20 μ L est injecté dans le système HPLC et l'élution dure 30 minutes.

La colonne utilisée (Supelco) est une colonne C18 en phase inverse (RPC18) de 25 cm de long et ayant un diamètre interne de 4,6 mm, et une porosité de 5 μ m. Elle est mise à équilibrer au moins 12 heures avant la début des dosages, en circuit fermé, à un débit de 0,2 mL de phase mobile/ minute.

La phase mobile utilisée est composée d'un tampon phosphate de sodium 30 mM à pH = 6,5, contenant 25 % d'éthanol ultrapur (qualité Chromanorm) et 0,5 mM de bromure de tétradécyltriméthylammonium.

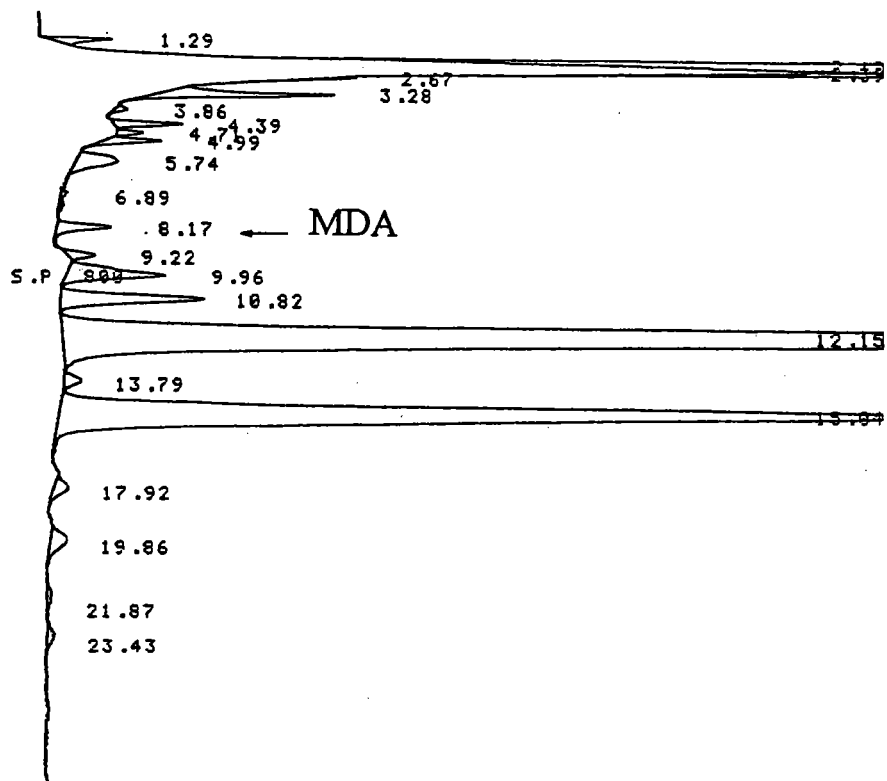


Figure 12 : Profil chromatographique du MDA obtenu après injection (20 µL) d'un homogénat de **glande digestive** déprotéinisé et dilué au 1/2.

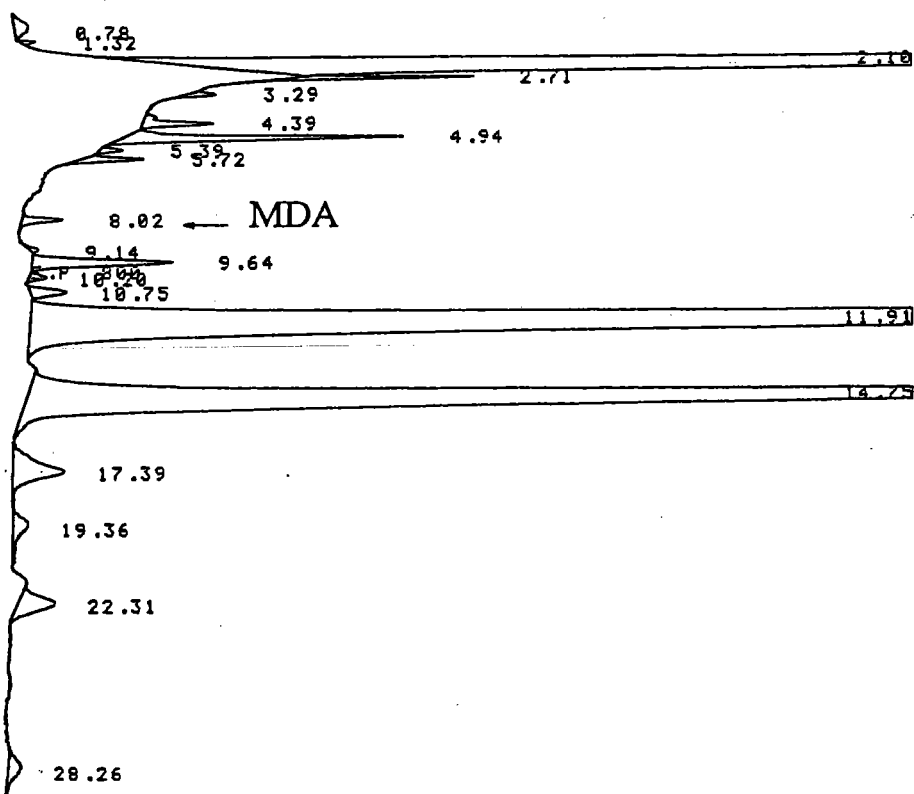


Figure 13 : Profil chromatographique du MDA obtenu après injection (20 µL) d'un homogénat de **branchie** déprotéinisé et dilué au 1/2.

Le bromure de tétradécyltriméthylammonium a pour rôle d'éviter la polymérisation du MDA pendant sa séparation et sa détection.

La phase est filtrée sous vide d'air à 0,45 μm et dégazée à l'hélium avant utilisation.

Les conditions de séparation sont les suivantes:

- le débit est fixé à 1 mL / minute,
- la température de la colonne est maintenue à 25°C par un four à effet Peltier,
- la détection se fait en UV à une longueur d'onde de 267 nm,
- le volume d'injection est de 20 μL .

Les chromatogrammes obtenus ont été comparés à ceux obtenus pour les solutions étalons de MDA. La quantité de MDA a été déterminée par rapport à une gamme étalon de 0,5 à 5 μM et, rapportée au taux de protéines totales de l'échantillon. Les figures 12 et 13 présentent des exemples de chromatogrammes obtenus pour les glandes digestives et les branchies.

Les étalons ont été obtenus par dilution d'une solution mère à 50 μM (dans le tampon phosphate de potassium, 50 mM, pH = 7,6) par un tampon constitué d'un volume de tampon d'homogénéisation contenant 50 % d'éthanol et de 3 volumes de tampon phosphate de sodium, 30 mM, pH 5,5, contenant 25 % d'éthanol.

c/ Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé suivant la méthode de Bradford (1976). Le principe de cette méthode colorimétrique repose sur l'utilisation d'un colorant, le bleu de Coomassie qui, initialement rouge, vire au bleu quand il se lie aux protéines. La couleur bleu résulte de l'interaction des groupements anioniques du colorant avec les groupements aminés des protéines. Le complexe formé est stable pendant environ 1 heure.

La densité optique (DO) lue à 595 nm est proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon biologique. La teneur en protéines est exprimée en se reportant à une gamme étalon de concentrations comprises entre 0,05 et 5 μM de sérum albumine bovine (SAB).

Les détails du protocole de dosage et des différentes solutions sont donnés en annexe 1.

C/ Préparation des échantillons pour le dosage de la 8-OHdG

La méthode de Shigenaga *et al.* (1994) a été choisie pour le dosage de la 8-OHdG au laboratoire en raison de sa qualité et de sa sensibilité. Elle associe une détection électrochimique à la technique HPLC (HPLC-EC) et permet la détection des niveaux de 8-OHdG simultanément à ceux de déoxyguanosine (dG) non modifiée quantifiés par détection UV. Le protocole initial de Shigenaga *et al.* (1994) a été optimisé au laboratoire par Doyotte (1998). Nous avons utilisé ce protocole lors de nos différentes études.

Afin d'éviter une augmentation des lésions liées au stress oxydant, toutes les étapes d'isolement et d'hydrolyse de l'ADN ont été réalisées sous atmosphère d'azote (N₂). L'ensemble des tampons utilisés et des milieux réactionnels a été dégazé sous azote. La composition des tampons utilisés est présentée en annexe 2.

a/ Isolement et hydrolyse de l'ADN des échantillons

- 150 à 200 mg de tissus sont homogénéisés à 4°C dans 1 mL de tampon d'homogénéisation pH 8, par un Potter Elvehjem par 2 et 6 tours de piston respectivement pour les glandes digestives et les branchies.

- Les échantillons sont centrifugés à 1000 g pendant 10 minutes à 4°C afin de sédimenter les noyaux. Le culot nucléaire est resuspendu et homogénéisé dans 1 mL de tampon d'extraction pH 8, puis centrifugé à 1000 g pendant 10 minutes à 4°C.

Le culot lavé est resuspendu dans 300 µL de tampon d'extraction pH 8

- L'ajout de 20 µL d'une solution contenant 50 U/mL RNAse A et 100 U/mL de RNAse T1 à chaque culot resuspendu et l'incubation du mélange pendant 1 heure à 50°C permet la digestion des ARN.

- La digestion par les RNAses est stoppée par l'ajout de 40 µL de sarcosyl à 10% (pds :v). Les protéines sont digérées par l'ajout de 40 µL de protéinase K à 5 mg/mL et laissées incubées pendant 1 heure à 50°C.

- Un volume de 400 µL de phénol ultra pur est ajouté à chaque échantillon, puis le mélange est vortexé pendant 1 minute. Le phénol piège les protéines et les acides nucléiques se retrouveront dans la phase aqueuse. L'échantillon est centrifugé à 12000 g pendant 10 minutes à température ambiante afin d'obtenir les deux phases : la phase aqueuse supérieure est récupérée et on y ajoute un volume de phénol et un volume de chloroforme pour la laver. Le mélange est vortexé pendant 1 minute et centrifugé à 12000 g pendant 10 minutes à température ambiante. La phase aqueuse supérieure est transférée dans un autre tube auquel on ajoute 400 µL de chloroforme afin d'extraire les traces de phénol résiduelles. Cette opération est répétée deux fois.

- La phase aqueuse est récupérée dans un microtube froid (type Eppendorf). 40 µL d'acétate de sodium 3 M, pH 5 et 800 µL d'éthanol froid (placé à - 20 °C) sont ajoutés à la phase aqueuse. Le mélange est placé à - 20°C pendant une nuit pour faire précipiter l'ADN.

- L'ADN précipité est centrifugé à 10000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et l'ajout de 1 mL d'éthanol à 70% permet de laver l'ADN et de le débarrasser des restes de sels. Le mélange est centrifugé à 10000 g pendant 15 minutes à 4°C et les culots sont séchés sous flux d'azote.

- Les culots d'ADN sont dissous dans une solution d'acétate de sodium 20 mM, pH 5, avec un volume final de 200 µL.

- L'ADN est hydrolysé en nucléotides par incubation pendant 10 minutes à 65°C avec 4 µL d'une suspension de nucléase P1 à 3,3 mg / mL.

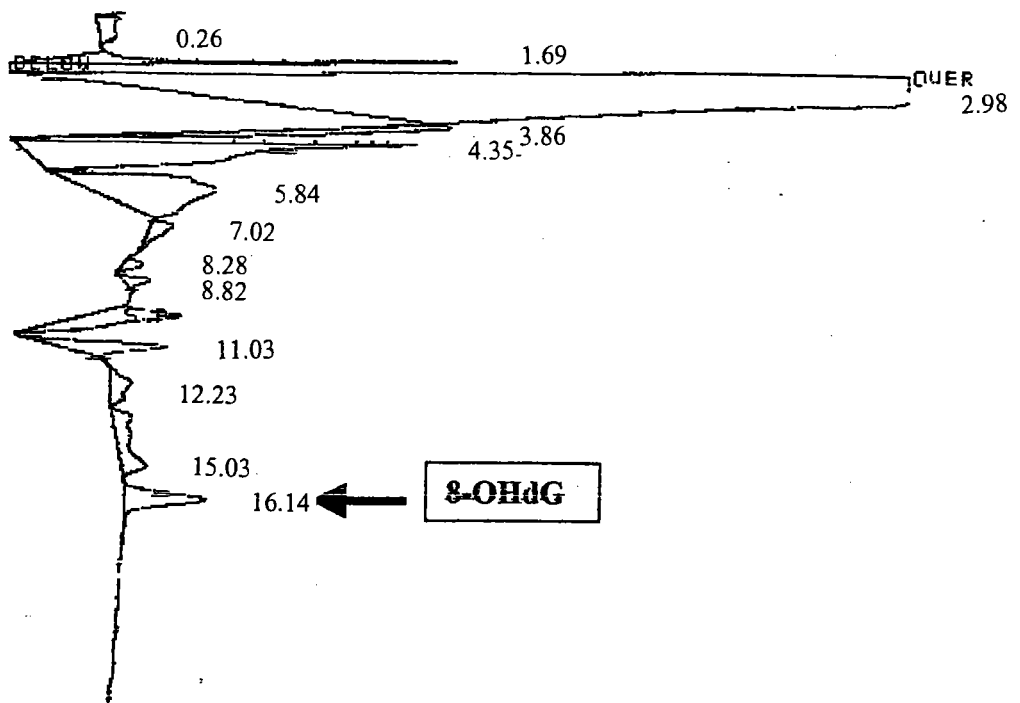


Figure 14 : Profil chromatographique de 8-OHdG obtenu après injection (100 μ L) d'un homogénat de glande digestive, la sensibilité est de 50 nA.

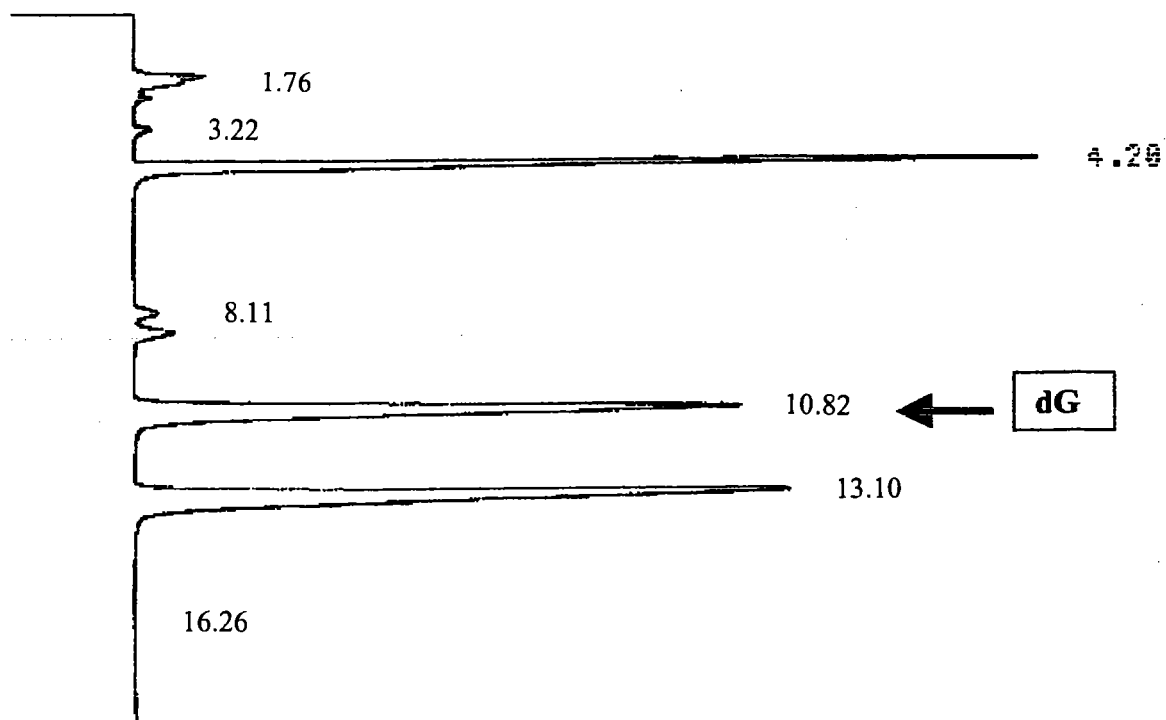


Figure 15 : Profil chromatographique de dG obtenu après injection (100 μ L) d'un homogénat de glande digestive, la détection s'effectue en UV à 290 nm.

- Le pH du mélange est ajusté à 8,5 par ajout de 20 μL de tampon Tris-HCl 1M. Les nucléotides sont ensuite hydrolysés en nucléosides après 1 heure d'incubation à 37°C avec de la Phosphatase alcaline à 1U/ μL . Le calcul de la quantité et de la pureté de l'ADN est présenté en annexe 3.

Au final, 114 μL de chloroforme sont ajoutés et le mélange est vortexé (30 secondes) puis centrifugé à 12000 g pendant 5 minutes à 4°C. La phase aqueuse est dégazée à l'azote et injectée directement dans le circuit HPLC. Les figures 14 et 15 présentent des exemples de chromatogrammes obtenus pour les mesures de 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine et de déoxyguanosine dans les glandes digestives.

La colonne utilisée est une colonne C18 Supelco LC-18 DB Supelcosil de 15cm de long avec un diamètre interne de 4,6 mm, et une porosité de 3 μm , équipée d'une pré-colonne LC-18 DB. La phase mobile se compose d'un tampon phosphate de sodium 50 mM à pH = 5,5 contenant 5 % méthanol ultrapur (qualité Chromanorm).

La phase est filtrée sur 0,20 μm , sous vide d'air, et dégazée à l'hélium avant son utilisation.

Les conditions de séparation sont les suivants :

- le débit de la phase mobile est de 1 mL / minute,
- la température de la colonne est maintenue à 25°C par un four à effet Peltier,
- la détection est réalisée par un détecteur UV à une longueur d'onde de 290 nm pour la déoxyguanosine ; la détection de la 8-OHdG est réalisée par un détecteur de type électrochimique Coulochem ESA (modèle 5100) équipé d'une cellule analytique 5010 avec les potentiels des électrodes 1 et 2 ajustés à 125 mV et 350 mV respectivement, la sensibilité est fixée à 50 nA sur les deux électrodes, le potentiel de la cellule de conditionnement est de 110 mV avec une sensibilité de 1 μA ,

Les détecteurs UV et électrochimique sont en série, le détecteur électrochimique précédant le détecteur UV.

- le volume d'injection est de 100 μL mais il peut être réduit à 50 μL lors des dosages HPLC lorsque le volume d'échantillon est insuffisant.

b/ Utilisation d'une méthode en kit pour isoler l'ADN

Nous avons testé une méthode en kit d'extraction de l'ADN génomique. Ce kit comprenait des colonnes QIAGEN 100/G avec une capacité de 100 mg de tissu pour extraire de 10-100 μg d'ADN. Les tampons utilisés ont été fournis par le kit.

- 19 μL d'une solution stock de RNase A à 100 mg/mL sont ajoutés à 9,5 mL de tampon G2.
- 100 mg de tissu sont homogénéisés au potter électrique (dans 9,5 mL de tampon G2 contenant la RNase A.
- l'homogénat est transféré dans un tube à bouchon de 50 mL. 0,5 mL d'une solution stock de protéinase K à 20 mg/mL préparé avec de l'eau distillé sont ajoutés à l'homogénat.

Le mélange est vortexé puis il est mis à incuber 2 heures à 50°C. le lisat doit être clair après incubation, si des particules sont visibles après 2 heures, le temps d'incubation est allongé.

- le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 5000 g à 4°C afin d'éliminer toute particule résiduelle avant l'utilisation de la colonne.

- la colonne QIAGEN est équilibrée avec 4 mL de tampon QBT, la colonne se vide par gravité.

- l'échantillon est vortexé 10 secondes à vitesse maximale puis il est versé dans la colonne.

- après le passage complet de l'échantillon, la colonne est lavée par passage de 7,5 mL de tampon QC, l'étape est renouvelée 1 fois.

- l'ADN est élué par passage de 5 mL de tampon QF préchauffé à 50°C, le mélange est récupéré dans un tube de 10 mL.

- l'ADN est précipité par ajout de 3,5 mL d'isopropanol à l'éluat.

- l'éluat est mélangé par inversion du tube 10 fois puis il est vortexé à 5000 g pendant 15 minutes à 4°C.

- le culot est lavé avec 2 mL d'éthanol à 70% froid puis remis en suspension par quelques coups rapides de vortex. Le mélange est centrifugé à 4°C pendant 10 minutes à 5000 g. Le culot est récupéré puis séché à l'azote.

L'ADN est resuspendu dans 100 µL de tampon Tris-Cl (10 mM, pH 8,5). La dissolution de l'ADN est réalisée en laissant le mélange 2 heures à 55 °C.

Pour la suite, le protocole est le même que pour la méthode classique avec extraction au phénol-chloroforme. L'ADN est hydrolysé en nucléotides par ajout de nucléase P1, puis en nucléosides par ajout de phosphatase alcaline. Le mélange est injecté dans le système HPLC.

Cette technique d'extraction sans utilisation de phénol a donné des résultats peu concluants, les quantités d'ADN extraites étaient beaucoup plus faibles qu'avec la méthode classique surtout au niveau des branchies, de plus on observait des variations importantes des taux de 8-OHdG. Les taux de base observés avec la méthode QIAGEN ne différaient pas beaucoup de ceux obtenus par la méthode classique d'extraction de l'ADN. Au vue de ces remarques, nous avons abandonné la méthode avec kit.

D/ Analyse statistique des résultats

a/ Calcul de la moyenne et des écart-types

La moyenne et l'écart-type ont été évalués lors des différentes études pour chaque lot de bivalves exposés. Pour chaque durée d'exposition, les valeurs moyennes mesurées dans les tissus des bivalves exposés ont été comparés avec les valeurs moyennes de référence. Pour l'analyse des résultats lors des essais en laboratoire, les groupes d'individus intoxiqués ont été comparés à leurs témoins respectifs (eau ou DMSO).

La différence statistique entre les contrôles et les bivalves exposés a été analysée par le test *t* de Student, la différence était acceptée pour une probabilité $p \leq 0,05$. La normalité de la distribution des données a été vérifiée auparavant.

b/ L'analyse en composantes principales (ACP)

Une ACP a été effectuée pour analyser le degré de corrélation entre les différentes variables étudiées, c'est-à-dire le MDA, la 8-OHdG et les données physico-chimiques. Les valeurs des variables correspondent aux colonnes de la matrice des données de l'ACP et, les stations correspondent aux lignes. L'ACP a été réalisée avec le logiciel Statgraphics Plus, et les corrélations ont été représentées en utilisant le logiciel UniWin Plus. Le degré de corrélation entre les différents paramètres est interprété par le degré de proximité entre les différents points dans le cercle des corrélations. Les 2 composantes utilisées lors des analyses de corrélation sont choisies dans le but d'expliquer le maximum de variation.

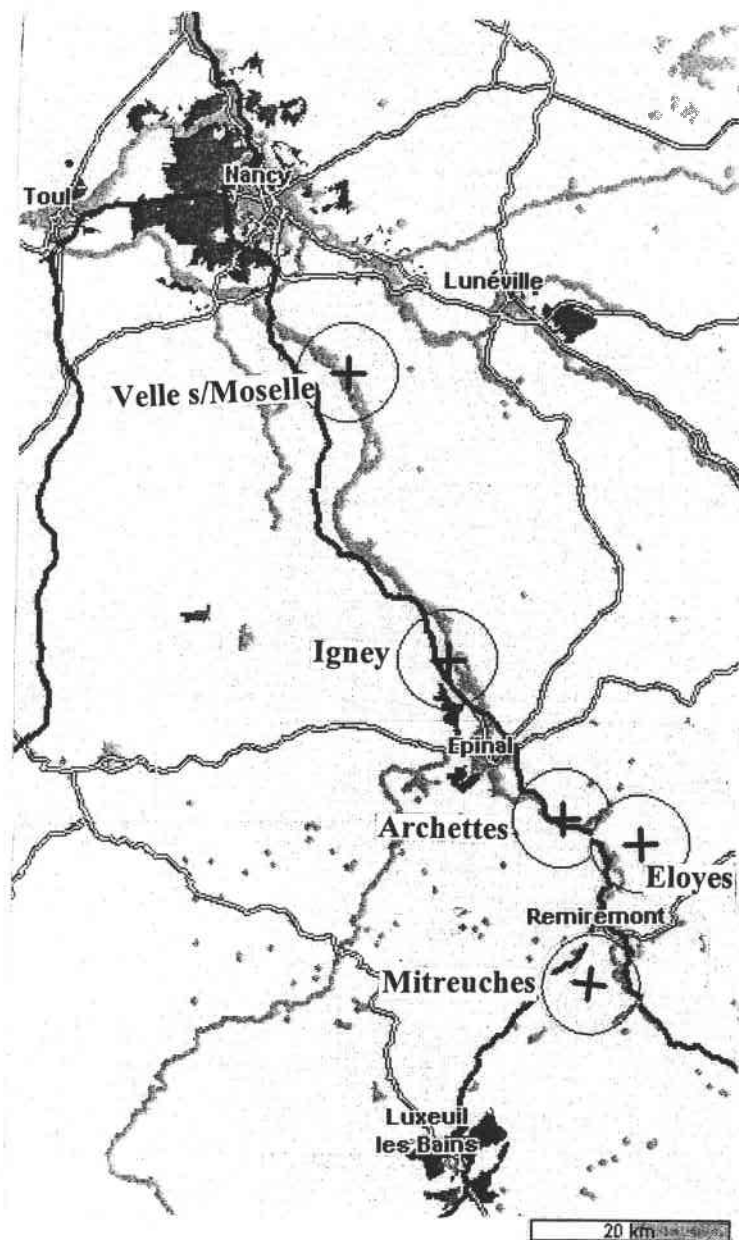


Figure 16 : Carte des 5 stations étudiées sur le site atelier de la rivière Moselle.

3/ LES ETUDES DE TERRAIN

Pour l'ensemble des opérations de transferts, les bivalves ont été mis dans des cages et laissés pendant 7 et 21 jours sur chacun des sites étudiés.

A/ Programme de recherche pour la validation d'indicateurs biologiques sur divers sites de la Moselle

La qualité biologique de 5 stations sur le cours d'eau de la Haute Moselle a été évaluée lors de deux campagnes d'études successives durant l'été 1998 et l'été 1999. Un tronçon d'une soixantaine de kilomètres a été sélectionné lors de la première campagne (1998). Il partait de la station d'Eloyes, à l'amont de la confluence de la Moselle avec la Vologne, jusqu'à la station la plus aval de Velle sur Moselle, à proximité de Toul. Deux stations intermédiaires ont été fixées à l'amont et à l'aval de l'agglomération d'Epinal. Les quatre stations couvraient donc une zone assez anthropisée et caractérisée par un gradient de perturbations d'origine agricole, domestique (agglomération d'Epinal en particulier) et industrielle (zone aval d'Epinal).

Lors de la deuxième campagne effectuée en 1999, la station des Mitreuches, située en amont d'Eloyes a été ajoutée, en guise de station témoin.

Deux lots de six bivalves ont été mis en cage et laissés sur le site témoin d'échantillonnage situé à Manom (Moselle). Quarante huit autres individus ont été répartis en 8 lots de 6 moules et placés sur les différents sites immédiatement après collecte. Deux cages de 6 individus chacune ont été placées sur chaque site. Six bivalves témoins ont été disséqués le jour de la mise en place des cages (T_0) en plus des 2 lots étudiés, afin d'évaluer toute modification des paramètres biologiques au cours de l'étude.

Le site témoin qui nous a servi de référence a été contrôlé en permanence. Les micropolluants minéraux et organiques ont été analysés dans l'eau interstitielle et les sédiments prélevés aux mêmes endroits que les bivalves et de manière synchrone.

La figure 16 présente la situation des cinq stations le long de la Moselle.

La station témoin : Manom

Elle est localisée à une vingtaine de kilomètres du laboratoire. L'échantillonnage des organismes lors des études de transfert a été réalisé sur ce site.

La station 1 : Les Mitreuches

La station est située en amont de la confluence de la Mosselotte avec la Moselle.

La station 2 : Eloyes

Ce site est localisé en amont de la ville d'Epinal et de la confluence avec la Vologne.

La station 3 : Archettes

Ce site est situé en amont de la ville d'Epinal, en aval de la confluence avec la Vologne. Il est également localisé en aval de la papeterie d'Arches.

La station 4 : Igney

La station est localisée en aval à proximité de la ville d'Epinal et de la papeterie de Golbey. Elle est située près d'une gravière.

La station 5 : Velle sur Moselle

C'est le site le plus en aval. Il se situe en aval de Charmes, à proximité de Toul.

Les sédiments ont été prélevés en juin 1999 par les soins Centre d'analyses et de recherches, Département Hydrologie et Environnement, de l'Université Louis Pasteur. Les eaux interstitielles ont été obtenues après décantation et centrifugation de ces sédiments. Les analyses physico-chimiques ont été réalisées sur la fraction fine des sédiments (< 1mm) et sur les eaux interstitielles afin de déterminer les niveaux de contamination des différents sites étudiés. Les micropolluants organiques sont analysés par des techniques chromatographiques couplées à des détecteurs spécifiques. Les micropolluants minéraux sont dosés par spectrométrie d'absorption atomique et par spectrométrie d'émission à plasma ou par couplage torche à plasma / spectrométrie de masse.

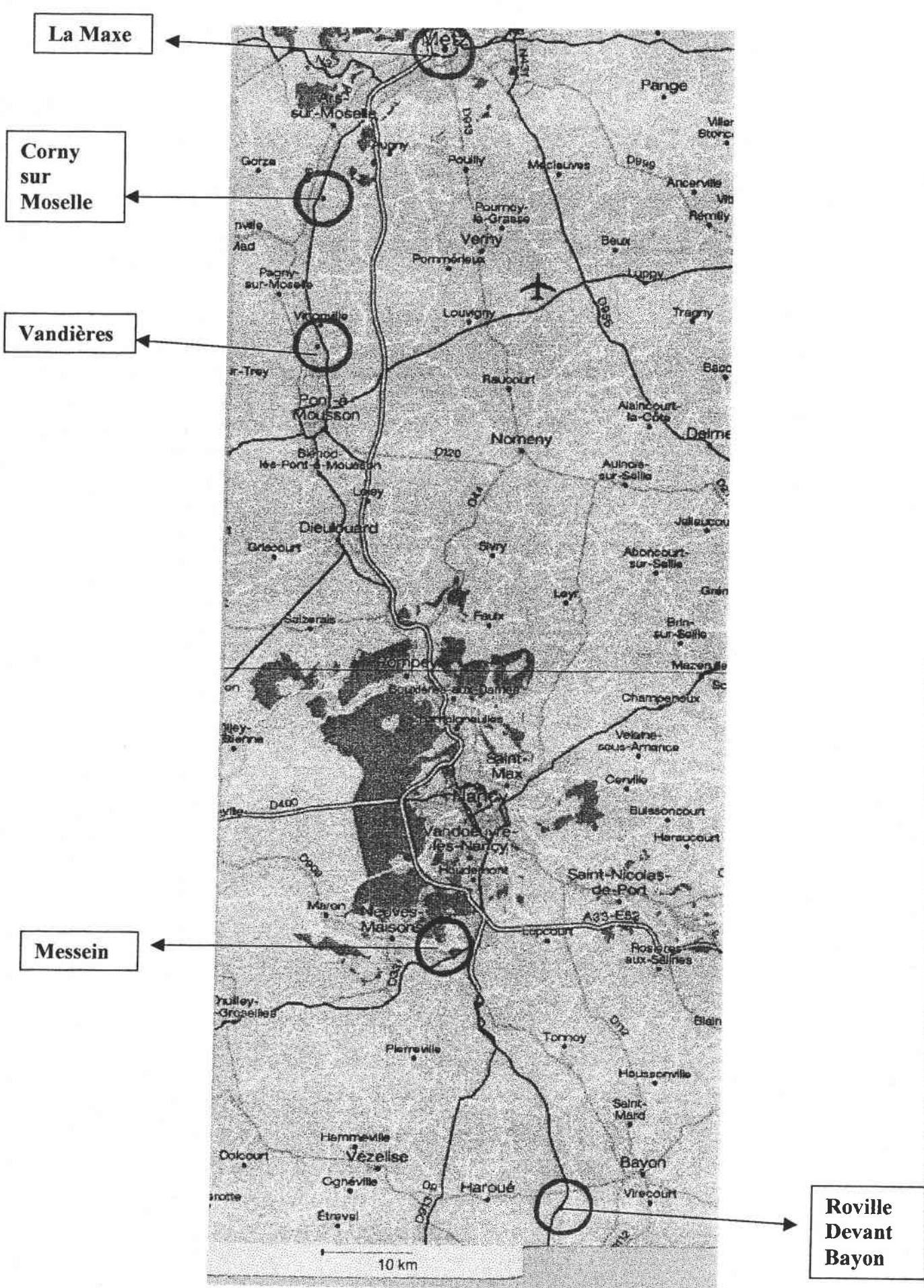


Figure 17 : Situation des 4 plans d'eau situés dans la vallée de la Moselle.

B/ Suivi de la qualité de plans d'eau en Lorraine

Ce programme concerne l'évaluation et le suivi de la qualité de plans d'eau lorrains issus de gravières et sablières anciennes ou toujours en activité, à la demande de l'UNICEM (Union Nationale des Industries de Carrières et Matériaux de construction).

L'étude menée sur deux années (1999 et 2000), intègre l'approche biologique dans l'étude des gravières et aborde la question des implications écologiques de ces ouvrages. Cette approche est donc complémentaire de l'analyse physico-chimique des eaux. Les deux années de recherche concernant la mesure des biomarqueurs sur les populations d'invertébrés benthiques ont fait l'objet de trois campagnes d'échantillonnage différentes : à l'automne 1999, au printemps et à l'automne 2000.

Les deux premières gravières pour lesquelles l'étude de la qualité a été évaluée par l'analyse des biomarqueurs de toxicité chez la moule d'eau douce, ont été choisies sur la base de l'étude de la diversité floristique et faunistique au cours de la période estivale de 1999 sur six plans d'eau de la vallée de la Moselle. Ces études nous ont amenés à choisir les sites de Roville devant Bayon et de Vandières. A la suite de la campagne conduite à l'automne 1999, nous avons décidé d'ajouter l'étude de deux gravières supplémentaires lors des campagnes de 2000, les sites de Corny et de Messein.

La figure 17 présente la situation des quatre plans d'eau dans la vallée de la Moselle.

Roville devant Bayon

Ce site qui n'est plus en exploitation, se situe en amont de Neuves Maisons.

Vandières

Ce plan d'eau se situe dans une gravière encore en exploitation à proximité de l'agglomération de Pont-à-Mousson.

Corny

Ce plan d'eau a été choisi selon les études effectuées par le laboratoire d'Ecologie de l'EBSE. Il s'agit d'un plan d'eau récent (5 ans) et la végétation n'est pas stabilisée, ce qui est expliquée par sa faible biodiversité floristique en hydrophytes. Le faible taux de recouvrement des algues en juin et en septembre et leur faible diversité reflètent un milieu de qualité. Il est situé en amont de Metz.

Messein

Ce site, qui n'est plus en activité, présentait un problème de prolifération d'une espèce végétale invasive, la Jussie. Il se situe à proximité de Neuves Maisons.

Les bivalves ont été prélevés sur le site témoin de Manom lors des campagnes d'automne 1999 et de printemps 2000. A l'automne 2000, les *Unios* provenaient de l'étang de la Maxe, notre second site d'échantillonnage.

L'impact au niveau des réponses des paramètres biologiques, après changement du site d'échantillonnage, a été suivi de manière à étudier la présence ou non de variation liée au site. L'utilisation de deux sites d'échantillonnage a permis la préservation de l'équilibre biologique à Manom en évitant la disparition par épuisement d'*Unio tumidus*.

4/ EXPERIMENTATIONS EN LABORATOIRE

A/ Choix des toxiques testés

Parallèlement aux essais de terrain, des expériences ont été conduites au laboratoire, afin de vérifier si l'exposition de bivalves à une contamination chimique, à l'origine d'un stress oxydant, avait des répercussions possibles au niveau génomique. Les objectifs visés par ces expérimentations consistaient à :

- déterminer si l'oxydation de la guanine était liée à la peroxydation lipidique, communément utilisée comme marqueur de stress oxydant,
- établir la relation entre la mesure des taux de 8-OHdG et les cassures à l'ADN après exposition à des polluants.

Une étude de Garçon *et al.* (2001b) réalisée sur les poumons de rongeurs intoxiqués par injection intratrachéale avait montré une synergie de toxicité entre le fer et le B(a)P. En effet, les auteurs observaient des augmentations des niveaux de MDA ($\times 2$) et de 8-OHdG ($\times 24$) pour le mélange fer-B(a)P. L'hypothèse qu'un stress oxydant à l'origine de cette toxicité a été émise par les auteurs, le fer *via* la réaction de Fenton favorisant la production d'espèces radicalaires réactives, et le B(a)P pouvant provoquer une déplétion du glutathion réduit et de l' α -tocophérol.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont des agents toxiques métabolisés en intermédiaires génotoxiques par les enzymes liées au cytochrome P450 chez les vertébrés. Ils sont susceptibles de former des adduits à l'ADN chez les mollusques aquatiques (Harvey et Parry, 1997) et les poissons (French *et al.*, 1996).

B/ Conditions d'expérimentation

Une intoxication préliminaire *in vivo* au B(a)P et au fer ferrique sur *Unio tumidus* a été effectuée afin de déterminer les concentrations expérimentales. Les concentrations choisies étaient de :

- 20 mg/L pour le fer (Fe^{3+}),
- 20 $\mu\text{g/L}$ pour le B(a)P.

Après l'analyse des résultats obtenus lors de l'intoxication préliminaire, nous avons décidé de retenir les concentrations suivantes pour l'intoxication finale :

- 20 et 40 mg/L pour le fer (Fe^{3+}), la CE_{50} du FeCl_3 (4 jours) pour divers crustacés aquatiques étant de 124 mg/L et 120 mg/L pour *Asellus aquaticus* et *Crangonyx pseudogracilis* respectivement (Gangolli, 1999)
- 50 et 100 $\mu\text{g/L}$ pour le B(a)P, des concentrations de 20 $\mu\text{g/L}$ n'induisant pas d'effet toxique lors de l'étude préliminaire.

Les bivalves ont été prélevés sur le site de la Maxe et placés en stabulation durant 24 heures. Des groupes de 5 bivalves ont été exposés pendant 6 jours aux toxiques seuls et en mélange. Un seul bivalve a été testé par toxique lors de l'étude préliminaire.

Nous avons préparé deux solutions témoins ne contenant aucune trace de xénobiotique : la première composée d'eau reconstituée et la seconde contenant du diméthyl sulfoxyde (DMSO), un solvant organique. L'eau reconstituée est préparée à partir d'eau déminéralisée et est stabilisée sous bullage 24 heures avant son utilisation. Sa composition est présentée en annexe 4. Le B(a)P a été préparé dans du DMSO. La solution de fer est réalisée à partir d'eau reconstituée et de sels de fer (FeCl_3).

Lors des essais, la température utilisée correspondait à 20°C. La photopériode était naturelle, il n'y avait pas de dispositif expérimental qui fixait la durée de la phase diurne. Le pH était de 7,5. Le volume des récipients en PVC contenant les organismes et les 700 mL de milieu était de 1,5 L.

Les glandes digestives et les branchies ont été disséquées et congelées à - 196°C jusqu'à analyse. Les dosages du MDA et de la 8-OHdG et l'essai des Comètes ont été réalisés sur les deux tissus. La mesure des cassures des brins d'ADN est évaluée par le test des Comètes (Singh et al., 1988 ; 1994) selon le principe d'une migration électrophorétique des molécules d'ADN.

Les animaux ont été nourris chaque jour avec 5 mL d'un mélange d'algues (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus*) provenant d'une culture issue du laboratoire réalisée selon la norme AFNOR T90-304. Le renouvellement de l'eau a été effectué tous les jours en fin de journée à la suite des repas.

Les détails des intoxications préliminaires et définitives sont présentées en annexe 5.

RESULTATS

La présente recherche s'inscrit dans le cadre de la validation de biomarqueurs de toxicité et de génotoxicité pouvant être utilisés pour la surveillance environnementale des populations exposées aux polluants dans les milieux naturels. Ses objectifs consistent à étudier (i) les relations éventuelles entre la peroxydation lipidique et les lésions oxydatives à l'ADN révélées par la guanine oxydée, et (ii) la validité de la guanine oxydée choisie comme indicateur de l'oxydation des bases de l'ADN, en tant que marqueur plus général des lésions structurales de l'ADN.

Les études *in situ* sur des populations d'invertébrés benthiques exposés à des sédiments pollués avaient pour but d'évaluer l'intérêt de la mesure des taux de malondialdéhyde (MDA) en tant que biomarqueur de cytotoxicité et celle des taux de 8-hydroxy-2'-hydroxy-déoxyguanosine (8-OHdG) de l'ADN comme marqueur de génotoxicité. La réponse biologique a été analysée par rapport à la typologie de la pollution et à son intensité. Des essais ont été réalisés en conditions contrôlées de laboratoire afin de discerner les relations pouvant exister entre les taux de 8-OHdG, la lipoperoxydation et les cassures à l'ADN (essai des Comètes), après exposition à des polluants.

Cette recherche a permis d'évaluer l'intérêt respectif des différents biomarqueurs étudiés, en terme de signification, sensibilité et applicabilité sur le terrain.

Les biomarqueurs sélectionnés peuvent être classés en trois catégories, indicatrices de :

- Toxicité cellulaire

La lipoperoxydation (LPO) est évaluée par la mesure des taux de MDA et reflète la cytotoxicité cellulaire consécutive à une activité insuffisante des systèmes antioxydants ;

- Génotoxicité

Les marqueurs de génotoxicité tels que la mesure des bases oxydées de l'ADN mettent en évidence les effets oxydatifs de polluants mutagènes dans les sites étudiés ;

- Détoxification

Les marqueurs de détoxification étudiés sont les activités des systèmes antioxydants qui comprennent les activités des systèmes antioxydants incluant les activités des glutathion-peroxydases, sélénium dépendantes et indépendantes (SeGPx et GPx Se-ind), de la glutathion réductase (GRd), les formes oxydée (GSSG) et réduite (GSH) du glutathion mesurées parallèlement aux activités enzymatiques.

Les paramètres antioxydants ont été mesurés par le docteur Carole Cossu-Leguille, ce qui a permis d'examiner les relations existant entre les systèmes de défense antioxydants et le développement du processus de lipoperoxydation. Le test des Comètes a été réalisé par Sébastien Lemièrre, étudiant en thèse, pour les expériences en laboratoire et lors de la campagne d'automne 2000 de l'étude des gravières.

Tableau XIII: Concentrations moyennes de malondialdéhyde (MDA) mesurés par HPLC dans les glandes digestives et les branchies des bivalves témoins prélevés dans les étangs de Manom et la Maxe, et moyennes sur l'ensemble des 2 sites, toute saison confondue. Les concentrations sont exprimés en ng MDA/mg de protéine (moyenne \pm écart-type).

	NIVEAUX DE BASE DU MDA	GLANDE DIGESTIVE	n	BRANCHIE	n
MANOM	Automne 1998	3,70 \pm 0,55	14	3,39 \pm 0,62	18
	Hiver 1998-1999	3,63 \pm 0,30	6	3,54 \pm 0,25	6
	Eté 1999	3,24 \pm 0,30	17	3,27 \pm 0,30	17
	Automne 1999	3,76 \pm 0,13	10	3,62 \pm 0,35	10
	Printemps 2000	3,43 \pm 0,27	10	3,56 \pm 0,52	10
	Moyenne	3,5 \pm 0,3		3,4 \pm 0,2	
LA MAXE	Automne 2000	3,59 \pm 0,25	10	3,49 \pm 0,33	10
	Eté 2001	3,71 \pm 0,50	5	3,90 \pm 0,30	5
	Moyenne	3,6 \pm 0,1		3,6 \pm 0,3	
LES 2 SITES	Moyenne	3,5 \pm 0,3	72	3,5 \pm 0,3	76

1/ NIVEAUX DE BASE DU MDA ET DE LA 8-OHDG

Préalablement à l'étude des dommages oxydatifs induits par les polluants, nous avons déterminé les niveaux de MDA et de 8-OHdG chez les organismes « témoins » vivant dans des sites de référence. Tout d'abord, nous nous sommes attachés à montrer qu'aucune variation des niveaux de base n'était liée au lieu de prélèvement, à la saison ou à l'année. Les niveaux de base calculés serviront de référence dans les études de transfert des bivalves d'un site contrôle aux différentes stations analysées.

A/ Niveaux de base du malondialdéhyde

Les taux de MDA des bivalves contrôles prélevés dans les sites de référence et ayant servi aux études de transfert et aux expérimentations en laboratoire sont présentés dans le tableau XIII.

Au niveau de la glande digestive

Les taux de MDA mesurés dans les glandes digestives sont en moyenne de $3,5 \pm 0,3$ ng MDA/mg protéine et de $3,6 \pm 0,1$ ng MDA/mg protéine, respectivement chez les bivalves prélevés dans l'étang de Manom et de la Maxe.

Les prélèvements des organismes ont été effectués pendant diverses saisons au cours des différentes années d'étude. Les teneurs en MDA enregistrées au printemps, en été, en automne et en hiver dans les bivalves prélevés à Manom ne diffèrent pas significativement entre elles. A la Maxe, les taux sont en moyenne de $3,6 \pm 0,2$ ng MDA/mg protéine pour les bivalves prélevés en automne 2000 et de $3,7 \pm 0,5$ ng MDA/mg protéine en été 2001, il n'y a pas de différence significative.

Nous remarquons qu'il n'y a pas de variation significative selon la période de prélèvement quel que soit le site d'échantillonnage de Manom ou la Maxe.

Au niveau branchial

Les taux de MDA mesurés sont en moyenne de $3,4 \pm 0,2$ ng MDA/mg protéine chez les bivalves prélevés dans l'étang de Manom et de $3,6 \pm 0,3$ ng MDA/mg protéine pour ceux issus de l'étang de la Maxe.

L'analyse des prélèvements à Manom montre des taux de MDA équivalents en 1998, en 1999 et en 2000. Les taux moyens de MDA des individus provenant de la Maxe sont à l'automne 2000 de $3,5 \pm 0,3$ ng MDA/mg protéine et en été 2001 de $3,9 \pm 0,3$ ng MDA/mg protéine. Aucune variation significative des taux de MDA n'a été relevée quel que soit le site d'échantillonnage et la période d'étude.

En résumé, les teneurs en MDA mesurées dans les bivalves prélevés dans les sites de référence sont équivalentes au niveau des branchies et des glandes digestives. Les niveaux de base moyens sont de $3,5 \pm 0,3$ ng MDA/mg protéine à Manom et de $3,6 \pm 0,1$ ng MDA/mg protéine à la Maxe dans les glandes digestives. Dans les branchies, les taux sont de $3,4 \pm 0,2$ ng MDA/mg protéine à Manom et de $3,6 \pm 0,3$ ng MDA/mg protéine à la Maxe. Cette constance des taux de MDA au niveau hépatique et branchial a également été montrée lors de précédents travaux par Doyotte (1998). Les comparaisons selon les années d'étude ou selon les saisons ne montrent pas de variation des taux de MDA dans les deux tissus étudiés.

Ainsi, la même espèce benthique *Unio tumidus* peut être prélevée sur différents sites d'une même région exempts de toute contamination, en effet, aucune différence des taux de base de MDA selon le site de prélèvement n'ayant été remarquée.

Tableau XIV: Concentrations moyennes de 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8OHdG) mesurées par HPLC dans les glandes digestives et les branchies des bivalves témoins prélevés dans les étangs de Manom et de la Maxe, et moyennes sur l'ensemble des 2 sites, toute saison confondue.

Les taux sont exprimés en 8OHdG/10⁵ dG (moyenne ± écart-type).

	NIVEAUX DE BASE DE 8- OHdG	GLANDE DIGESTIVE	n	BRANCHIE	n
MANOM	Méthode phénol (automne 1998)	4,41 ± 1,03	6	21,79 ± 1,17	6
		4,10 ± 1,03	5	20,15 ± 2,83	5
	Méthode avec kit (automne 1998)	4,49 ± 0,49	5	18,88 ± 1,39	5
		3,70 ± 0,87	6	16,63 ± 0,57	6
		3,20 ± 1,08	5	19,23 ± 0,92	5
	Eté 1999				
	Moyenne	4 ± 0,5		19,3 ± 1,9	
LA MAXE	Automne 2000	3,33 ± 0,28	5	16,90 ± 0,43	5
		3,09 ± 0,53	5	16,82 ± 1,16	5
	Eté 2001	3,48 ± 0,31	5	17,58 ± 0,67	5
		Moyenne	3,3 ± 0,2		17,1 ± 0,4
LES 2 SITES	Moyenne	3,7 ± 0,5	42	18,5 ± 1,7	42

La mesure du MDA comme marqueur de la lipoperoxydation est un paramètre intéressant et stable, nous n'avons relevé aucune variation inter-individuelle, temporelle ou saisonnière.

B/ Niveaux de base de 8-OHdG

Les taux de base de 8-OHdG mesurés dans l'ADN isolé des glandes digestives et des branchies d'*Unio tumidus*, issus des sites de référence, sont présentés dans le tableau XIV.

Au niveau de la glande digestive

L'hydroxylation en C8 de la guanine dans des conditions normales, hors des conditions d'exposition à des polluants correspond à des taux de $4 \pm 0,5$ 8-OHdG/ 10^5 dG, chez les individus issus de l'étang de Manom. Les taux sont de $3,3 \pm 0,2$ 8-OHdG/ 10^5 dG dans les glandes digestives des témoins prélevés dans l'étang de la Maxe. Les teneurs en 8-OHdG sont équivalentes au niveau hépatique quelle que soit le site d'échantillonnage. La variabilité entre individus a tendance néanmoins à être plus forte pour les bivalves issus de l'étang de Manom : elle s'explique par des taux de 8-OHdG augmentés ($\times 1,5$) dans l'un des bivalves parmi les six analysés. On note que durant la phase d'août à novembre 1998, les écart-types sont plus élevés.

Les prélèvements des organismes ont été effectués pendant plusieurs saisons. Les taux de 8-OHdG des bivalves prélevés à Manom sont équivalents, il n'existe pas de variation liée à l'année d'étude ou à la saison. Il en est de même pour les bivalves prélevés dans l'étang de la Maxe, il n'existe pas de variation saisonnière ou temporelle.

Le changement de lieu d'échantillonnage des bivalves n'a pas eu d'impact sur les taux de dommages à l'ADN mesurés dans les glandes digestives. Les taux obtenus restent semblables quel que soit l'étang de référence.

Au niveau branchial

Les taux observés dans les organismes issus de l'étang de Manom sont de $19,3 \pm 1,9$ 8-OHdG/ 10^5 dG. Les taux sont significativement ($p \leq 0,05$) plus faibles chez les organismes prélevés à la Maxe soit $17,1 \pm 0,4$ 8-OHdG/ 10^5 dG.

Aucune variabilité saisonnière ou temporelle des taux de bases oxydées n'a été remarquée chez les organismes prélevés à Manom ou à la Maxe.

L'ADN branchial d'*Unio tumidus* contient en moyenne cinq fois plus de résidus 8-OHdG que l'ADN de la glande digestive. Cette différence ne semble pas due à un problème méthodologique : elle a été mise en évidence lors de précédents travaux au laboratoire (Doyotte, 1998).

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette différence des taux entre les deux tissus étudiés :

- Il est possible que les capacités de réparation soient moins importantes au niveau branchial. Par ailleurs, les niveaux des activités antioxydantes sont globalement plus faibles dans les branchies par rapport aux glandes digestives chez *Unio tumidus*, en particulier la catalase, la glutathion peroxydase sélénium indépendante, et la glutathion réductase (Cossu, 1996).

- Il n'est pas exclu que l'origine de l'ADN soit impliquée dans cette variation des niveaux de base de 8-OHdG, l'ADN branchial, d'après nos études, semble être plus susceptible à l'oxydation que l'ADN de glande digestive en conditions physiologiques normales.

En effet, les échanges gazeux entre le milieu extérieur et le milieu interne ont lieu au niveau de l'épithélium branchial. L'oxygène moléculaire, présent sous forme dissoute dans l'eau, peut être réduit et produire des espèces réactives qui vont attaquer les biomolécules dont l'acide désoxyribonucléique. Nous n'avons pas pu rechercher de corrélation entre les concentrations en oxygène dissous des stations et les taux de 8-OHdG puisque les données concernant les teneurs en O₂ dissous pour les différentes stations n'ont pas été mesurées.

Tableau XV : Tableau récapitulatif des dates de mise sur site et de collecte des organismes lors du programme PNETOX

Sites étudiés	Mise sur site	Récupération	
		t ₇	t ₂₁
Les Mitreuches Eloyes Archettes Igney Velle sur Moselle	01/06/1999	08/06/1999	22/06/1999

2/ ETUDES DE TERRAIN : REPONSES DES PARAMETRES BIOLOGIQUES

Une étude de transfert *in situ* de bivalves témoins a été réalisée en juin 1999 au niveau de cinq sites caractérisés par différents profils de contamination, suivant un gradient de pollution amont-aval, et localisés sur le cours de la rivière la Moselle.

A/ Etudes en rivière des réponses biologiques des populations d'invertébrés benthiques

Cette étude était intégrée à un programme de recherche interdisciplinaire financé dans le cadre du PNETOX (Programme National de recherche en Ecotoxicologie) du Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement. Elle s'inscrivait dans le cadre de la validation de biomarqueurs pour le contrôle environnemental et la surveillance des populations exposées. La démarche mise en œuvre au sein de ce programme de recherche a été de coupler l'analyse des biomarqueurs à celle des indicateurs populationnels afin d'évaluer la qualité des milieux naturels soumis à une activité anthropique. Ces études en rivière ont eu pour objet de déterminer (i) la relation entre la contamination de l'eau et des sédiments et l'impact sur les organismes exposés ; (ii) le caractère persistant ou réversible des lésions.

L'étude a été réalisée sur un tronçon d'une soixantaine de kilomètres le long de la Moselle, depuis l'amont de la confluence de la Moselle avec la Vologne, soit la station des Mitreuches prise comme seconde station témoin en 1999, jusqu'à la station la plus aval de Velle sur Moselle proche de Toul. Trois stations intermédiaires ont été fixées à Eloyes en amont de la confluence de la Vologne et de la Moselle, puis à Archettes et Igney situées de part et d'autre de la ville d'Epinal. Ces stations couvrent une zone assez anthropisée et caractérisée par un gradient de perturbations d'origine agricole, domestique (agglomération d'Epinal en particulier) et industrielle (zone avale d'Epinal).

Les bivalves prélevés à Manom ont été transférés sur les 5 sites étudiés, après avoir vérifié la présence de sédiments sur les sites de dépôt. Les dates de mise sur sites et de récupération des organismes sont présentées dans le tableau XV.

Les *Unio* engagés ont été laissés pendant une (t_7) et trois semaines (t_{21}) au niveau des différentes stations étudiées.

a/ Teneurs en micropolluants des sites étudiés

Les résultats des analyses physico-chimiques des eaux interstitielles ne montrent pas de contamination préoccupante par les micropolluants organiques (annexe 6). Les teneurs en métaux restent faibles et équivalentes dans trois sites, témoin, Eloyes et Archettes. Les valeurs trouvées sont plus faibles à Igney et Velle sur Moselle. Les teneurs en HAPs sont basses, les concentrations les plus élevées ($0,15 \mu\text{g/L}$) sont relevées pour le fluoranthène à Archettes et Igney.

Tableau XVI : Classification des stations selon leurs concentrations en micropolluants organiques et minéraux dans les sédiments, selon les seuils de qualité des sédiments (Système d'évaluation de la qualité de l'eau, 1997)

* Benzo(a)Pyrène, Benzo(b)Fluoranthène, Benzo(ghi)Pérylène, Benzo(k)Fluoranthène

PS = poids sec ; ND = non détectable (inférieur à la limite de quantification)

Pour la station des Mitreuches, deux prélèvements de sédiments ont été réalisés, notés a (prélèvement du 22/06/99) et b (prélèvement du 20/07/99).

	SEUIL DE QUALITE µg/Kg PS		Manom	Les Mitreuches		Eloyes	Archettes	Igney	Velle sur Moselle
	1	2		a	b				
% C organique			1,6	4,2	0,12	1	0,63	0,19	0,51
* HAPs totaux	360	4600	22	2948	84	882	928	307	279
PCPs totaux	2	22	ND	13,8	ND	ND	ND	ND	ND
Cadmium	700	4200	ND	0,26	0,06	0,14	0,58	0,29	0,93
Mercure	130	700	ND	0,34	ND	0,05	0,17	0,20	0,06
Zinc	124000	271000	44,9	94,3	39,1	59,4	90,7	89,2	63,5
Arsenic	700	7000	9,6	30,1	14,6	7,1	10,9	7,6	4,6
Chrome	5200	52000	21,5	78,3	32,6	27,8	26,5	27,5	24,8
Cuivre	1900	19000	8,7	30,6	6,6	22,4	19,4	17,4	10,9
Nickel	1600	16000	16,4	15,8	8,6	8,7	12,2	10,5	11,4
Plomb	4100	41000	10,3	75,2	7,1	25,5	49,7	35,1	23,5

Les résultats obtenus pour les analyses physico-chimiques des sédiments sont regroupés dans le tableau XVI. Il faut préciser que deux prélèvements de sédiments ont été effectués sur le site des Mitreuches à un mois d'intervalle : le 22/06/99 (1999a) et le 20/07/99 (1999b).

L'analyse physico-chimique de ces prélèvements a montré des teneurs en micropolluants très différentes. Pour le deuxième prélèvement (1999b), le niveau de contamination est très faible et le site pourrait être considéré comme un site de référence. Il convient de rester prudent dans l'interprétation des niveaux de contamination mesurés en tenant compte des facteurs de biodisponibilité tels que la granulométrie, le carbone organique, les sulfures, les oxydes de fer et de manganèse. Ces paramètres peuvent notamment expliquer pourquoi un sédiment pollué peut être peu toxique car ces contaminants ne sont pas biodisponibles pour les organismes exposés.

Dans les sédiments, les concentrations en hydrocarbures aromatiques polycycliques ne sont pas très élevées à Igney et Velle sur Moselle (en moyenne 300 µg/kg matière sèche), stations aval. La contamination est plus marquée à Eloyes et Archettes (en moyenne 900 µg/kg matière sèche) et reste inférieure aux seuils de qualité des sédiments et des eaux superficielles. La situation est ambiguë aux Mitreuches car, si lors du premier prélèvement, on observe des taux importants en HAP totaux (soit 2948 µg/kg matière sèche), les teneurs en HAP sont négligeables pour le prélèvement effectué un mois après, ce qui peut s'expliquer par une teneur élevée en carbone organique du premier prélèvement.

Les concentrations en organochlorés dans les sédiments sont faibles pour l'ensemble des sites. Les contaminations métalliques des sédiments restent largement inférieures aux seuils de qualité. On note que pour les sédiments provenant de la station des Mitreuches, les teneurs en arsenic, chrome, plomb et zinc sont plus importantes lors du premier prélèvement que pour les autres sites. La teneur en micropolluants minéraux est comparable aux autres stations sur le second échantillon. Cette différence traduit la variabilité liée à l'échantillonnage, bien qu'une pollution transitoire ne puisse être exclue.

Globalement la pollution des sédiments semble relativement peu élevée voire faible. Les teneurs en HAP et métaux les plus notables ont été relevées aux Mitreuches lors du premier échantillonnage. Cependant, le second échantillon présentait des teneurs négligeables ce qui peut s'expliquer par une contamination temporaire. Il est possible que la forte teneur en carbone organique de la fraction de granulométrie supérieure à 63 µm de ces sédiments analysés explique la faible proportion des micropolluants accumulés, d'où une variabilité liée à l'échantillonnage.

Il faut rappeler que les analyses physico-chimiques ne sont pas exhaustives, tous les polluants présents dans les échantillons de sédiments ou dans l'eau n'ont pas été recherchés et dosés. Les résultats analytiques donnent une indication préliminaire du degré de contamination des stations étudiées.

Les concentrations en polluants n'ont pas été dosées dans les tissus des organismes. Il est certes clairement établi que les bivalves sont des organismes qui accumulent et concentrent les xénobiotiques dans les tissus, mais l'analyse des concentrations en polluants dans les tissus, dans le contexte de notre étude, aurait nécessité un nombre élevé d'organismes et nous avons préféré privilégier l'analyse multibiomarqueurs.

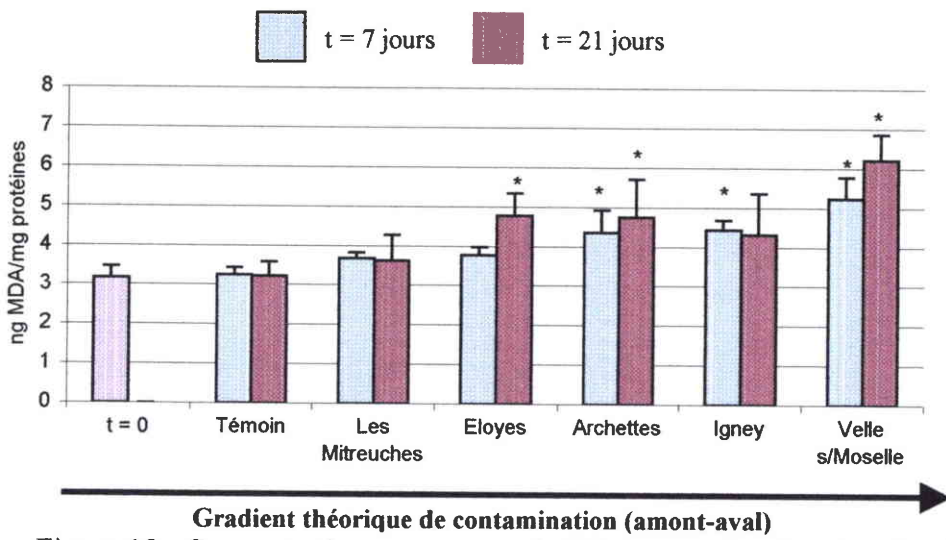


Figure 18 : Concentrations moyennes de MDA mesurées dans les **glandes digestives** des bivalves exposés pendant 7 et 21 jours sur la station témoin et les cinq stations de la Moselle (n=6)

* augmentation statistiquement significative par rapport aux niveaux de référence ($p \leq 0,05$)

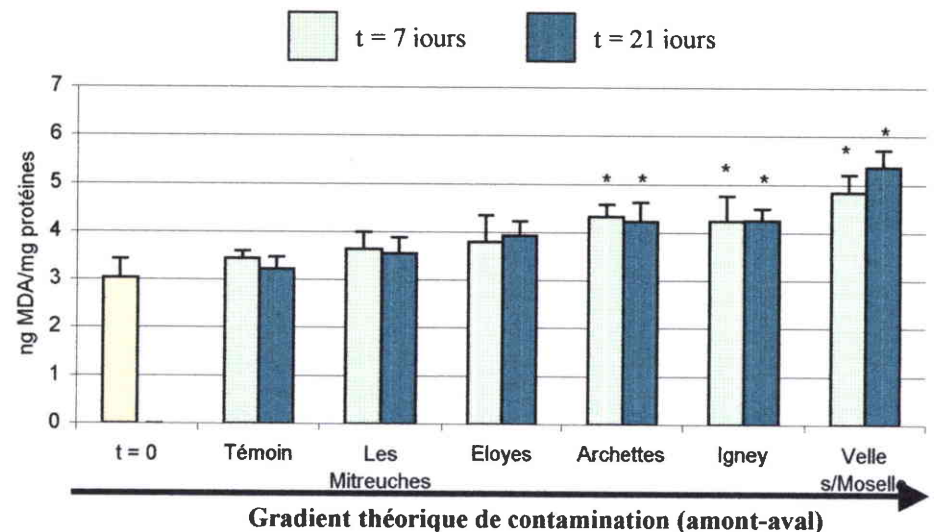


Figure 19 : Concentrations moyennes de MDA mesurées dans les **branchies** des bivalves exposés pendant 7 et 21 jours sur la station témoin et les cinq stations de la Moselle (n=6)

Tableau XVII : Récapitulatif des tendances des paramètres antioxydants chez les bivalves transférés sur les 5 sites le long de la Moselle (tout tissu et tout temps d'exposition confondus)

Se GPx : glutathion peroxydase sélénium-dépendante ; GPx Se-ind : glutathion peroxydase sélénium-indépendante ; GRd : glutathion réductase ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé

	Mitreuches	Eloyes	Archettes	Igney	Velle s/Moselle
SeGPx	=	=	=	↓	↓↓
GPx Se-ind	=	=	=	=	↑
GRd	=	=	=	↓	↓↓
GSH	=	=	=	=	↓
GSSG	=	=	=	=	↑

- = non significativement différent du témoin
- ↓↓ diminution par rapport au témoin ($\geq 50\%$)
- ↓ diminution par rapport au témoin ($\leq 30\%$)
- ↑ augmentation par rapport au témoin ($\leq 30\%$)

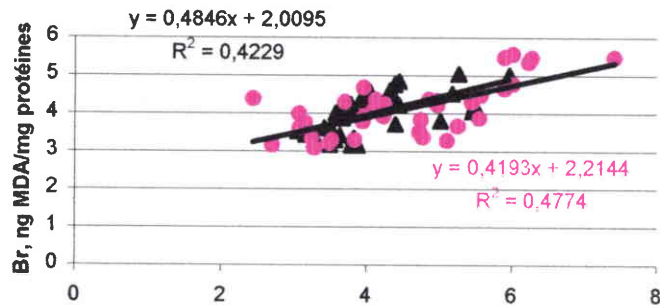


Figure 20: Représentation graphique des droites de corrélation et calcul du coefficient de régression des branchies en fonction des glandes digestives concernant les deux temps d'exposition des organismes

- ▲ t = 7 jours
- t = 21 jours

b/ Biomarqueurs de cytotoxicité : la lipoperoxydation et les systèmes antioxydants

Les résultats présentés correspondent à la valeur moyenne des paramètres mesurés en duplicats sur 6 individus témoins transférés à chacune des stations étudiées. L'écart-type indiqué correspond à la variabilité des résultats sur les 6 individus de chaque station.

Les résultats obtenus sont présentés sur les figures 18 et 19 pour les glandes digestives et les branchies respectivement ; les valeurs brutes sont données en annexe 7.

Les effets sont les plus marqués à Velle sur Moselle (station la plus en aval) quel que soit le tissu étudié et le temps d'exposition.

Dans les glandes digestives, le même profil de réponses du MDA a été obtenu pour les deux périodes d'exposition des bivalves : la lipoperoxydation chez les bivalves transférés en aval (Velle s/Moselle) est plus élevée que dans les organismes exposés sur les stations plus en amont (Mitreuches, Eloyes, Archettes et Igney). A Eloyes et Archettes, la lipoperoxydation varie en fonction de la durée d'exposition : après 21 jours d'exposition, les taux de MDA sont significativement augmentés par rapport aux valeurs des témoins. L'augmentation des taux de MDA est du même ordre de grandeur à Igney quel que soit le temps d'exposition des organismes. C'est à Velle sur Moselle, que les taux de MDA sont les plus significativement augmentés par rapport aux témoins : la lipoperoxydation s'accroît avec la durée d'exposition, après 7 jours, elle était augmentée d'un facteur 0,6 tandis qu'après 21 jours d'exposition, les taux de MDA étaient doublés par rapport aux niveaux de base.

Dans les branchies, les taux de MDA ne sont pas significativement différents des témoins chez les individus transférés en amont de la ville d'Epinal, sauf à Eloyes après 21 jours d'exposition où l'augmentation est à la limite de la significativité. Les augmentations des taux de MDA à Archettes et Igney sont du même ordre de grandeur et ne varient pas en fonction de la durée d'exposition. A Velle sur Moselle, le taux de MDA augmente de 40 % après 7 jours d'exposition et de 60 % après 21 jours d'exposition.

Aucune corrélation n'a été établie entre les réponses obtenues dans les glandes digestives et les branchies (Figure 20).

Une diminution des activités de certains systèmes enzymatiques antioxydants a été mise en évidence chez les bivalves exposés sur les deux sites aval d'Igney et de Velle sur Moselle après 7 et 21 jours, dans les glandes digestives et dans les branchies (tableau XVII). Les effets observés sont plus marqués à Velle sur Moselle qu'à Igney, surtout dans les branchies. Les diminutions sont en moyenne de 30% à Igney et dépassent les 50% à Velle sur Moselle, pour ce qui concerne les activités glutathion peroxydase sélénium-dépendante et glutathion réductase. A Velle sur Moselle, les taux de glutathion réduit sont diminués de 30% alors qu'on note une augmentation de la forme oxydée. Il n'y a pas de différences significatives entre les niveaux mesurés chez les témoins et ceux trouvés chez les bivalves transférés sur les sites amont.

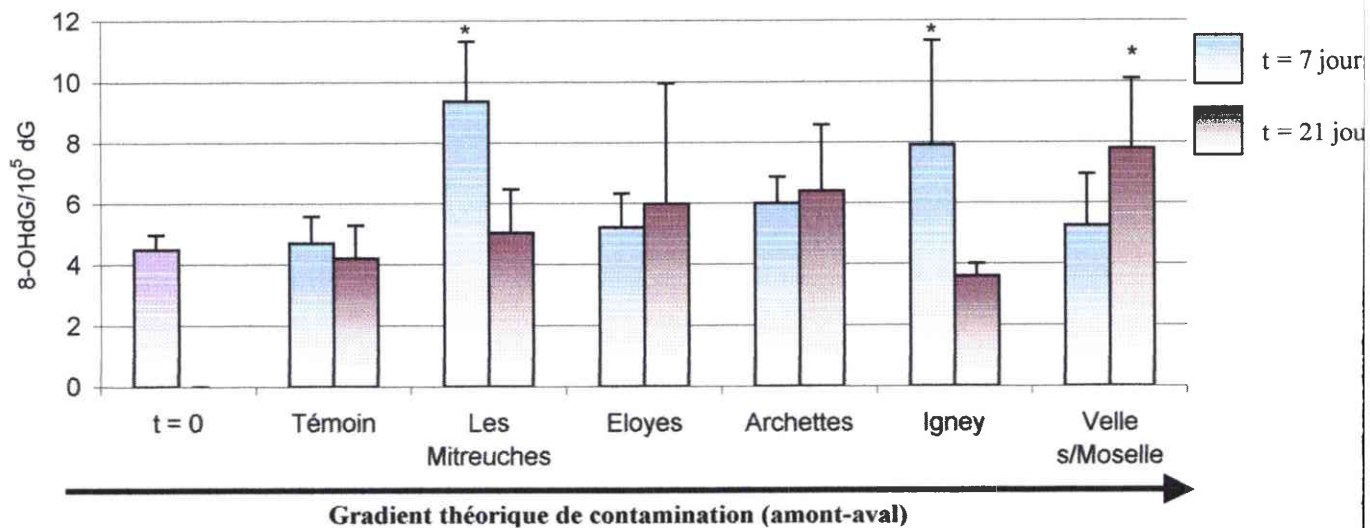


Figure 21 : Taux moyens de 8-OHdG mesurés dans les homogénats tissulaires des **glandes digestives** des bivalves exposés pendant 7 et 21 jours sur la station témoin et les 5 stations de la Moselle (n=6)

Les taux de 8-OHdG sont exprimés en 8-OHdG/10⁵ dG

* augmentation statistiquement significative par rapport aux niveaux de référence ($p \leq 0,05$)

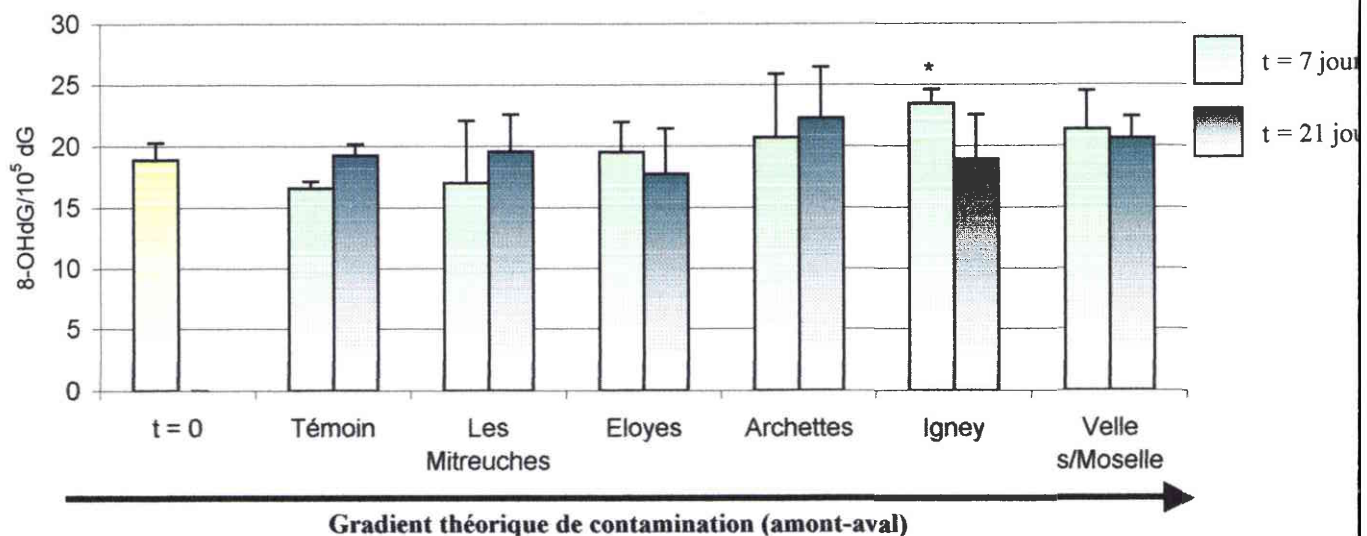


Figure 22 : Taux moyens de 8-OHdG mesurés dans les homogénats tissulaires des **branchies** des bivalves exposés pendant 7 et 21 jours sur la station témoin et les 5 stations de la Moselle (n=6)

Les taux de 8-OHdG sont exprimés en 8-OHdG/10⁵ dG

* augmentation statistiquement significative par rapport aux niveaux de référence ($p \leq 0,05$)

c/ Biomarqueur de génotoxicité : mesure des taux de 8-OHdG

Les résultats obtenus pour la 8-OHdG après 7 et 21 jours pour les deux tissus sont présentés sur les figures 21 et 22 ; les valeurs brutes sont regroupées dans l'annexe 8.

Dans les glandes digestives, les taux de 8-OHdG, marqueur de l'oxydation de l'ADN, ne sont pas significativement différents des témoins dans les stations situées en amont de la ville d'Epinal (hormis à les Mitreuches, après 7 jours d'exposition), et ne varient pas en fonction de la durée d'exposition. Les taux de 8-OHdG sont doublés par rapport aux niveaux de base de la station des Mitreuches après 7 jours d'exposition et retournent à des niveaux de référence après 21 jours. On note une augmentation des taux de lésions à l'ADN pour les stations en aval (Igney et Velle sur Moselle) par rapport aux niveaux de référence. A Igney, les taux de 8-OHdG sont augmentés de 70% comparés aux valeurs des organismes témoins après 7 jours d'exposition, les taux sont équivalents aux niveaux de base après 21 jours.

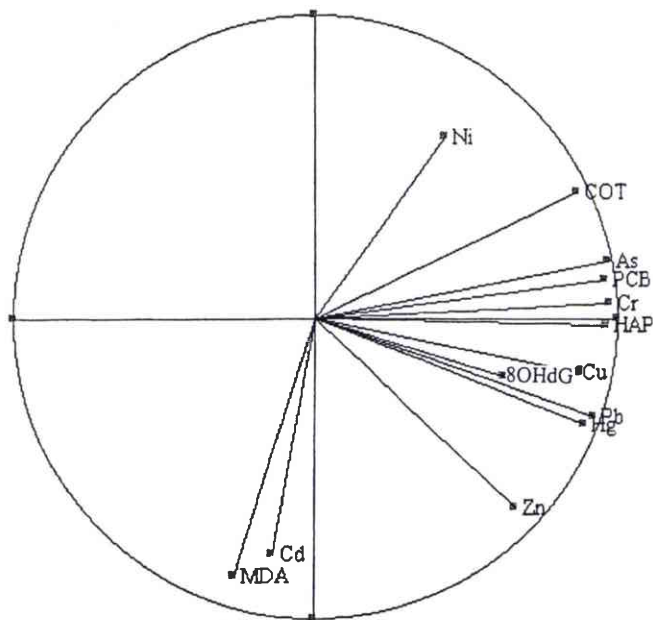
Il faut souligner que la variabilité entre les individus est importante à Igney, la moitié des organismes seulement a montré une induction des taux de 8-OHdG comparés aux niveaux de base (voir annexe 7).

A Velle sur Moselle, après 21 jours d'exposition, le taux de 8-OHdG a augmenté de plus de 50 % chez 3 individus, d'un facteur 2,5 et 3 pour deux organismes sur les 5 exposés.

Dans les branchies, on note qu'à Igney, l'augmentation est de 33% après 7 jours d'exposition, les taux retournent à des niveaux de base après 21 jours d'exposition. Dans les autres stations les variations ne sont pas significatives.

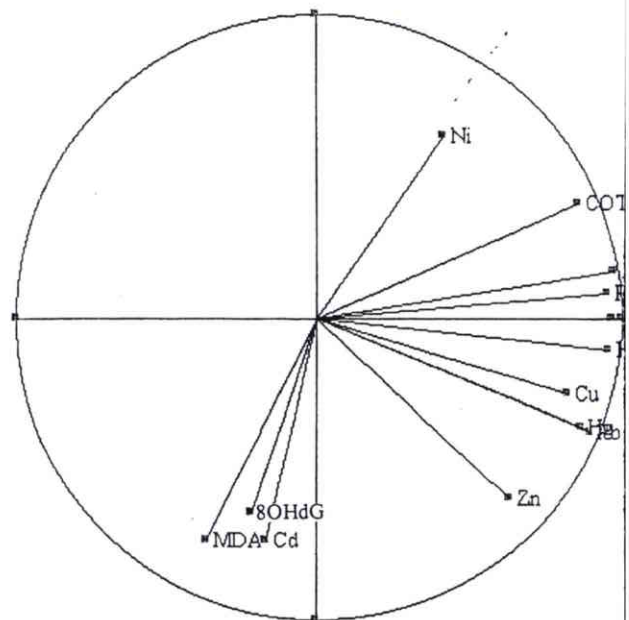
Composante 2 - Inertie: 20.27%

Cercle des corrélations
Variables de base



Composante 1 - Inertie: 61.7%
t = 7 jours

Cercle des corrélations
Variables de base

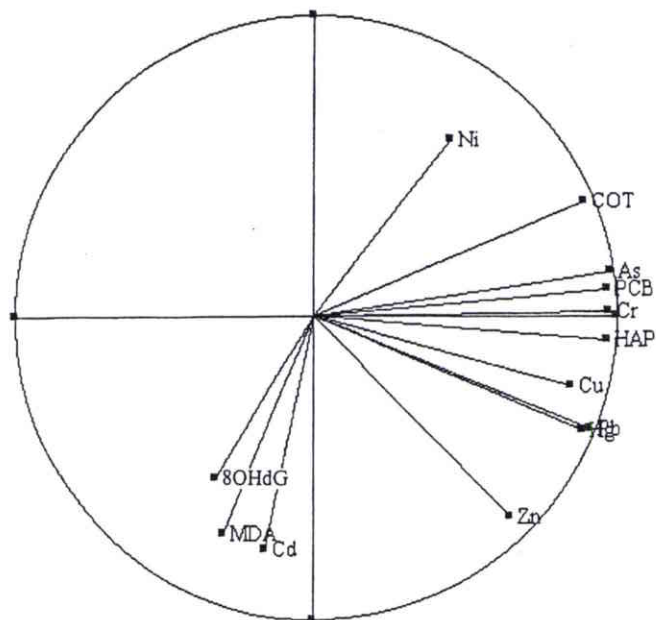


Composante 1 - Inertie: 57.5%
t = 21 jours

Figure 23 : Cercles des corrélations réalisés sur les données centrées réduites incluant les mesures du MDA, de la 8-OHdG et des analyses physico-chimiques dans les **glandes digestives** après 7 et 21 jours d'exposition

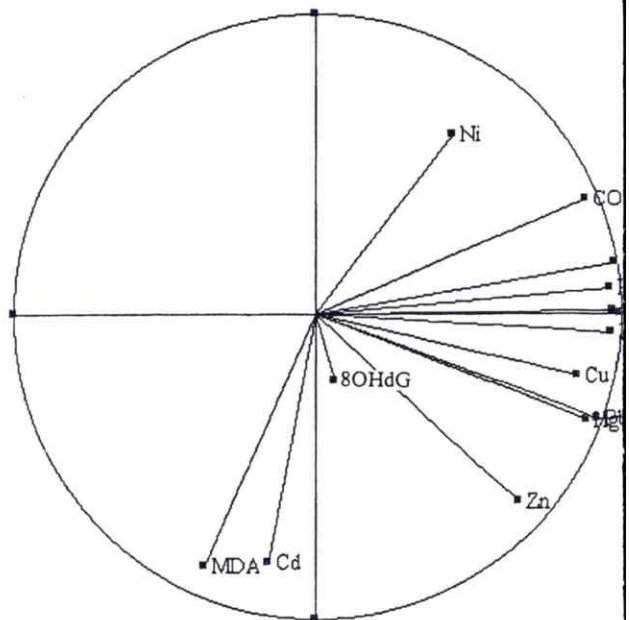
Composante 2 - Inertie: 20.3%

Cercle des corrélations
Variables de base



Composante 1 - Inertie: 60.1%
t = 7 jours

Cercle des corrélations
Variables de base



Composante 1 - Inertie: 59.7%
t = 21 jours

Figure 24 : Cercles des corrélations réalisés sur les données centrées réduites incluant les mesures du MDA, de la 8-OHdG et des analyses physico-chimiques dans les **branchies** après 7 et 21 jours d'exposition

d/ Analyse en composantes principales (ACP)

Une ACP a été réalisée sur les données centrées réduites des paramètres MDA, 8-OHdG et des analyses physico-chimiques pour les sites le long de la Moselle. Les cercles de corrélations sont présentés sur les figures 23 pour les glandes digestives et 24 pour les branchies avec les composantes 1 et 2.

L'analyse en composantes principales consiste à exprimer un ensemble de variables en un ensemble de combinaisons linéaires de facteurs non corrélés entre eux, ces facteurs rendant compte d'une fraction de plus en plus faible de la variabilité des données. Cette méthode permet de représenter les données originelles (individus et variables) dans un espace de dimension inférieure à l'espace originel, tout en limitant au maximum la perte d'information. L'utilisation de l'ACP est intéressante pour résumer la structure de données décrites par plusieurs variables quantitatives, tout en obtenant des facteurs non corrélés entre eux. Ces facteurs peuvent être utilisés comme de nouvelles variables permettant :

- d'éviter la multicolinéarité en régression multiple ou en analyse factorielle discriminante,
- d'effectuer une classification automatique en ne tenant compte que de l'information essentielle, c'est-à-dire en ne conservant que les premiers facteurs.

Certaines variables étaient mal représentées sur le cercle avec les composantes 1 et 2 c'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser également d'autres composantes (figures 25 et 26).

Les données physico-chimiques des sédiments de la station des Mitreuches utilisées pour l'analyse sont issues du prélèvement effectué le 22/06/99, les organismes ayant été transférés sur le site le 08/06/99 et laissés pendant 1 ou 3 semaines.

Dans les **glandes digestives** (figure 23), après **7 jours d'exposition**, le cercle des corrélations montre que les concentrations de MDA varient en même temps que les concentrations en cadmium dans les sédiments. Les teneurs en cadmium dans les sédiments de la station de Velle sur Moselle sont très supérieures à celles trouvées au niveau des autres points de transfert, soit 0,93 µg/Kg m.s. La concentration de 8-OHdG semble corrélée avec les teneurs en HAPs et en métaux (cuivre, plomb et mercure). Dans le plan factoriel (annexe 9), on note un effet station, la distribution des individus montre que la station des Mitreuches (G2), caractérisée par des sédiments contaminés en HAPs et en métaux, se détache des autres stations. La figure 25 (composantes 2 et 4) montre l'indépendance des deux paramètres étudiés (MDA et 8-OHdG).

Après **21 jours d'exposition**, l'analyse met en valeur la corrélation entre le MDA, la 8-OHdG et les concentrations en cadmium dans les sédiments. On note que les taux de HAPs sont corrélés aux concentrations en métaux et en PCBs des sédiments. La 8-OHdG n'apparaît plus corrélée aux taux de HAPs comme après 7 jours d'exposition. Par contre, la figure 25 (composantes 2 et 4) montre l'association existant entre le MDA et la 8-OHdG.

Si on remplace les données obtenues dans les glandes digestives par celles obtenues dans les **branchies** (figure 24), après **7 jours d'exposition**, le cercle des corrélations montre que les taux de MDA sont liés aux taux de 8-OHdG et aux contenus en cadmium des sédiments. Par contre, la figure 26 (composantes 2 et 4) montre l'indépendance entre le MDA et la 8-OHdG.

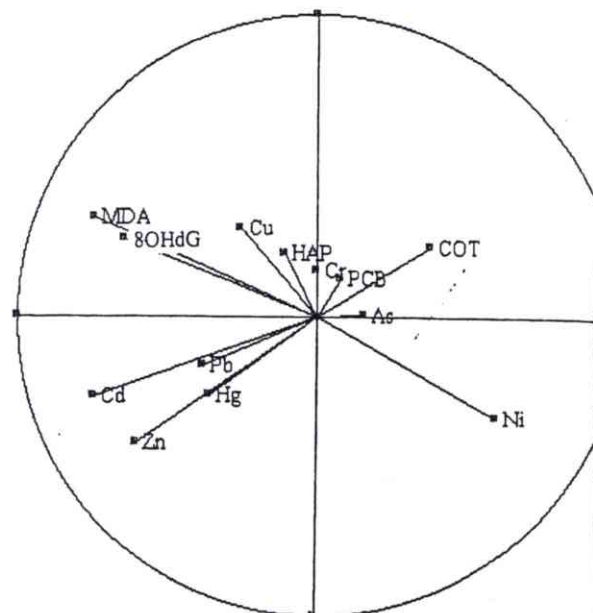
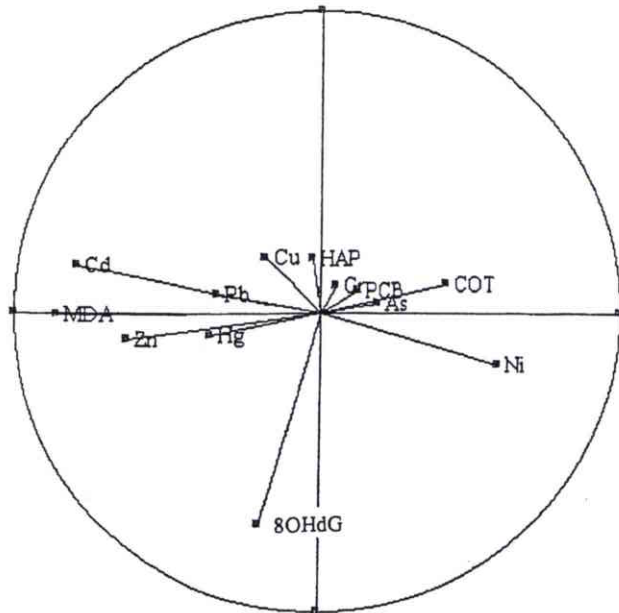
Après **21 jours d'exposition**, une corrélation entre le MDA et les concentrations en cadmium dans les sédiments est mise en évidence.

Cercle des corrélations
Variables de base

Cercle des corrélations
Variables de base

Composante 4 - Inertie: 5.0%

Composante 4 - Inertie: 6.4%



t = 7 jours Composante 2 - Inertie: 20.2%

t = 21 jours Composante 2 - Inertie: 21.0%

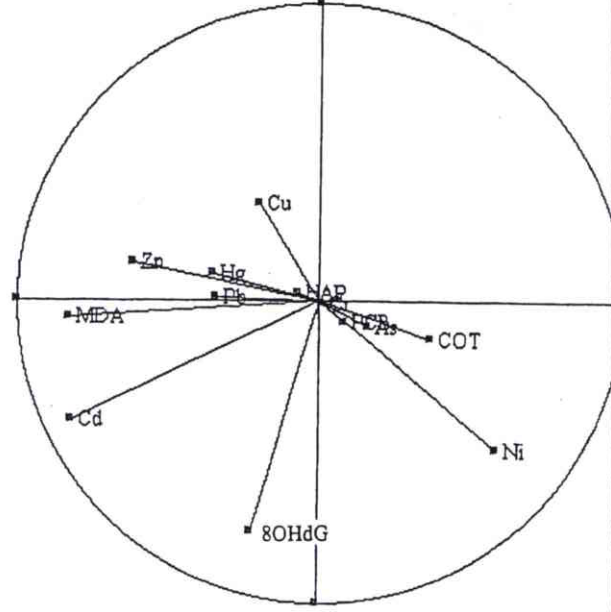
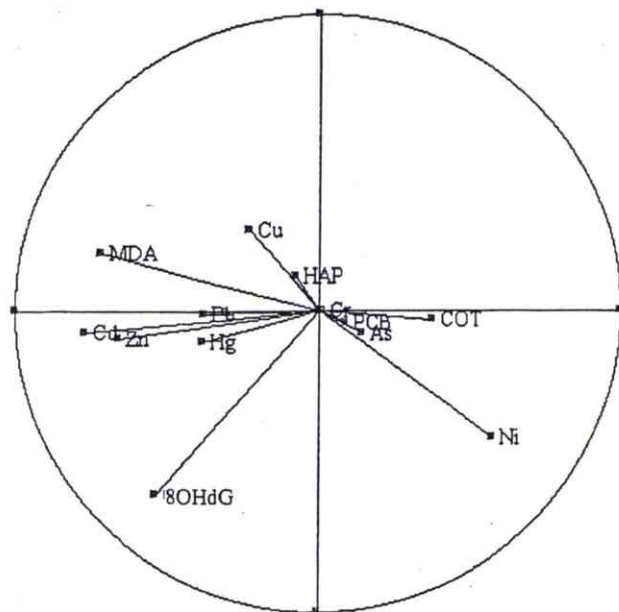
Figure 25 : Cercles des corrélations réalisés sur les données centrées réduites incluant les mesures du MDA, de la 8-OHdG et des analyses physico-chimiques dans les **glandes digestives** après 7 et 21 jours d'exposition (autres composantes) des stations de la Moselle lors de la campagne du PNETOX

Cercle des corrélations
Variables de base

Cercle des corrélations
Variables de base

Composante 4 - Inertie: 5.5%

Composante 3 - Inertie: 8.8%



t = 7 jours Composante 2 - Inertie: 20.5%

t = 21 jours Composante 2 - Inertie: 19.9%

Figure 26 : Cercles des corrélations réalisés sur les données centrées réduites incluant les mesures du MDA, de la 8-OHdG et des analyses physico-chimiques dans les **branchies** après 7 et 21 jours d'exposition (autres composantes) des stations de la Moselle lors de la campagne du PNETOX

La 8-OHdG est mieux représentée sur le cercle avec les composantes 2 et 3 (figure 26) que sur celui des composantes 1 et 2. Les deux paramètres MDA et 8-OHdG paraissent indépendants. La distribution des individus dans le plan factoriel sont présentés en annexe 10.

Les résultats des ACP n'ont montré aucune incidence des concentrations en HAP sur les niveaux de 8-OHdG. Dans les glandes digestives après 7 jours d'exposition, la représentation sur le cercle nous laisse penser que les variables HAPs et 8-OHdG sont liées. Après 21 jours d'exposition, les taux de 8-OHdG et de MDA apparaissent corrélés quelles que soient les composantes utilisées. L'existence d'une relation entre la lipoperoxydation et la formation de la 8-OHdG peut être soulignée.

En conclusion, l'étude de transfert réalisée le long de la Moselle a montré que :

- la lipoperoxydation, marqueur de stress oxydant, est induite chez les individus encagés au niveau des stations aval (Igney et Velle sur Moselle) par rapport aux témoins. Les effets sont moindres aux stations amont (Mitreuches et Eloyes). Ces variations ont été mises en évidence au niveau des glandes digestives et des branchies dans les organismes transférés sur les sites étudiés. Les effets sont plus marqués dans les glandes digestives et varient en fonction de la durée de l'exposition : la lipoperoxydation est augmentée de 60% après 7 jours d'exposition, et elle a doublé, par rapport aux témoins, après 21 jours d'exposition dans les organismes exposés à Velle sur Moselle.

Les diminutions des paramètres antioxydants tels que le taux de glutathion réduit et les activités glutathion peroxydase sélénium-dépendante et glutathion-réductase sont associées à l'induction de la lipoperoxydation dans les organismes transférés sur ces sites.

- les taux de 8-OHdG paraissent supérieurs aux stations d'Igney et Velle sur Moselle par rapport aux témoins. Toutefois, l'augmentation n'est significative que dans les glandes digestives pour les stations des Mitreuches et Igney après 7 jours, et à Velle sur Moselle après 21 jours. L'augmentation des taux de 8-OHdG aux Mitreuches et Igney est temporaire.

- Dans les branchies, l'augmentation des taux de 8-OHdG n'est significative qu'à Igney après 7 jours d'exposition.

- les résultats de l'analyse en composantes principales dans les glandes digestives a permis d'émettre l'hypothèse que la formation de 8-OHdG était liée aux concentrations de HAPs totaux à 7 jours. La mesure de la 8-OHdG semble être un marqueur représentatif d'une pollution par des HAPs d'après les résultats analytiques. L'existence d'une relation entre l'induction de la lipoperoxydation et la formation de la 8-OHdG a été montrée dans les deux tissus étudiés à 21 jours dans les glandes digestives et à 7 jours dans les branchies.

Table XVIII: Analyses physico-chimiques des eaux des 4 plans d'eau en Lorraine

<i>Paramètres</i>		<i>Roville devant Bayon</i>		<i>Vandières</i>		<i>Corny</i>	<i>Messein</i>
<i>Physico-chimiques</i>		<i>11/11/1999</i>	<i>17/05/2000</i>	<i>11/11/1999</i>	<i>17/05/2000</i>	<i>26/06/2000</i>	<i>26/06/2000</i>
pH		7,19	6,48	7,03	7,29	8,9	7,7
Conductivité	µs/cm	290	263	654	695	390	382
Sodium	mg/L Na	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	17	21
Ammoniaque total	mg/L NH4	0,3	0,046	0,59	0,036	0,02	0,074
Chlorures	mg/L Cl	10,7	11,40	116	129	72	23
Nitrates	mg/L NO3	2,03	1,48	1,2	0,24	0,16	0,1
Nitrites	mg/L NO2	0,022	0,042	0,017	0,025	<0,01	<0,01
Orthophosphates	mg/L PO4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,004	0,011
Phosphore	mg/L P	0,06	0,10	0,1	0,1	0,031	0,141
fer	mg/L	0,07	0,087	0,09	0,284	ND	ND
Manganese	mg/L	0,01	0,099	0,04	0,629	ND	ND
Cuivre	mg/L	0,02	0,01	0,025	0,01	ND	ND
Zinc	mg/L	0,01	0,02	0,01	0,02	ND	ND
plomb	mg/L	0,01	0,01	0,01	0,01	ND	ND
Chrome	mg/L	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	ND	ND
Atrazine	µg/L	<0,01	0,02	<0,01	0,02	ND	ND
Cyanazine	µg/L	<0,01	0,03	<0,01	0,03	ND	ND
Simazine	µg/L	<0,01	0,02	<0,01	0,02	ND	ND

ND: non déterminé

B/ Suivi de la qualité biologique de plans d'eau de la vallée de la Moselle

Ce programme concerne l'évaluation et le suivi de la qualité de l'eau d'étangs lorrains issus de gravières et sablières anciennes ou toujours en activité.

Les biomarqueurs étudiés lors des trois campagnes sont le MDA, marqueur de toxicité, les activités enzymatiques antioxydantes des glutathion peroxydases et glutathion réductase, et le glutathion, sous ses formes réduite et oxydée. Lors de la dernière campagne d'automne 2000, la mesure de paramètres de génotoxicité a été ajoutée à l'ensemble des biomarqueurs étudiés, les taux de 8-OHdG et les cassures à l'ADN (test des Comètes) ont été mesurés au niveau hépatique et branchial dans les bivalves transférés sur les 4 sites et dans la station témoin.

Les paramètres physico-chimiques mesurés par l'organisme gestionnaire des gravières ont été restreints à des paramètres globaux (tableau XVIII). Tous les métaux n'ont pas été recherchés, comme ce qui avait été fait précédemment sur les sédiments de la Moselle. Aucun polluant organique persistant, de type HAP ou PCB, n'a été mesuré dans l'eau ou les sédiments, ce que l'on peut regretter même si une contamination chimique des gravières par ces dérivés semblait peu probable. L'analyse des sédiments de la station témoin de la Maxe montre que l'étang est exempt de toute contamination (annexe 11). On peut déplorer l'absence d'analyses de l'eau de la Maxe.

A Roville devant Bayon et à Vandières, les concentrations en fer et en manganèse sont plus importantes lors de la campagne de printemps 2000 qu'en automne 1999, peut être par suite d'une solubilité accrue du métal avec la température. Les concentrations en herbicides restent inférieures aux limites de détection quel que soit le site étudié. A Corny et à Messein, les teneurs en sodium (20 mg/L en moyenne) sont plus importantes qu'à Roville et Vandières (<0,01 mg/L). Les concentrations en ions chlorures ne sont pas négligeables à Corny et à Vandières (>70 mg/L).

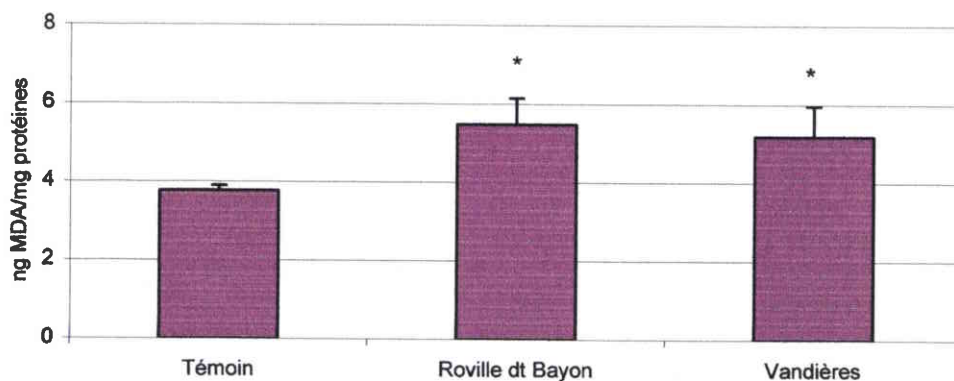


Figure 27 : Concentrations moyennes de MDA mesurées dans les homogénats tissulaires des **glandes digestives** des bivalves exposés pendant 21 jours sur les 2 plans d'eau issus de gravières au cours de la campagne d'automne 1999 (n=6)

La lipoperoxydation est exprimée en ng MDA/mg protéine

* augmentation statistiquement significative par rapport aux niveaux de référence ($p \leq 0,05$)

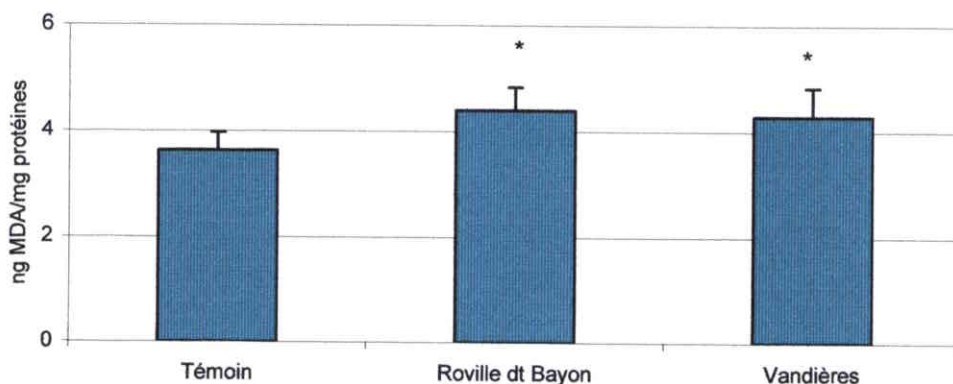


Figure 28 : Concentrations moyennes de MDA mesurés dans les homogénats tissulaires des **branchies** des bivalves exposés pendant 21 jours sur les 2 plans d'eau issus de gravières au cours de la campagne d'automne 1999 (n=6)

La lipoperoxydation est exprimée en ng MDA/mg protéine

* augmentation statistiquement significative par rapport aux niveaux de référence ($p \leq 0,05$)

Tableau XIX : Modifications des paramètres antioxydants observées dans les bivalves transférés sur les 2 plans d'eau de la vallée de la Moselle durant l'automne 1999 après 21 jours d'exposition
Gd = glande digestive ; Br = branchie ; SeGPx: glutathion peroxydase sélénium-dépendante ; GPx Se-ind : glutathion peroxydase sélénium-indépendante ; GRd : glutathion réductase ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé

	Roville dt Bayon		Vandières	
	Gd	Br	Gd	Br
SeGPx	=	=	=	=
GPx Se-ind	=	=	=	=
GRd	↓	=	↓	=
GSH	↓	=	↓	=
GSSG	↑	=	↑	=

= non significativement différent du témoin

↓ diminution par rapport au témoin ($\leq 30\%$)

↑ augmentation par rapport au témoin ($\leq 30\%$)

a/ Campagne d'automne 1999

Les résultats obtenus sur les biomarqueurs étudiés sont représentés sur les figures 27 et 28 pour les glandes digestives et les branchies respectivement ; les valeurs brutes des diverses campagnes sont données en annexe 12.

D'un point de vue général, on observe après 21 jours d'exposition des bivalves une augmentation de la peroxydation des lipides au niveau des glandes digestives sur les deux gravières de Roville et Vandières. Cette augmentation est de 45% au niveau de Roville devant Bayon et de 30% au niveau du site de Vandières, par rapport aux niveaux de base.

Ces modifications, par rapport aux bivalves témoins, sont faibles mais traduisent des conditions environnementales défavorables à l'origine d'une toxicité cellulaire.

Dans les branchies, les effets sont plus faibles que dans les glandes digestives mais, on note des effets significatifs dans les deux stations étudiées.

La diminution des activités antioxydantes (GPx, GRd et GSH) dans les glandes digestives montre une altération des capacités de détoxification des bivalves transférés au niveau des gravières (tableau XIX). On relève une diminution de 20% de l'activité GRd et de 10% des taux de GSH dans les glandes digestives des bivalves exposés à Roville devant Bayon. Ces diminutions semblent plus marquées à Vandières. Il n'y a aucune différence significative par rapport aux témoins pour l'ensemble des paramètres antioxydants dans les branchies.

L'ensemble des paramètres a été mesuré après une durée d'exposition unique de 21 jours, le caractère transitoire de ces modifications, n'a pu être mesuré car les cages n'ont pu être récupérées à t₇.

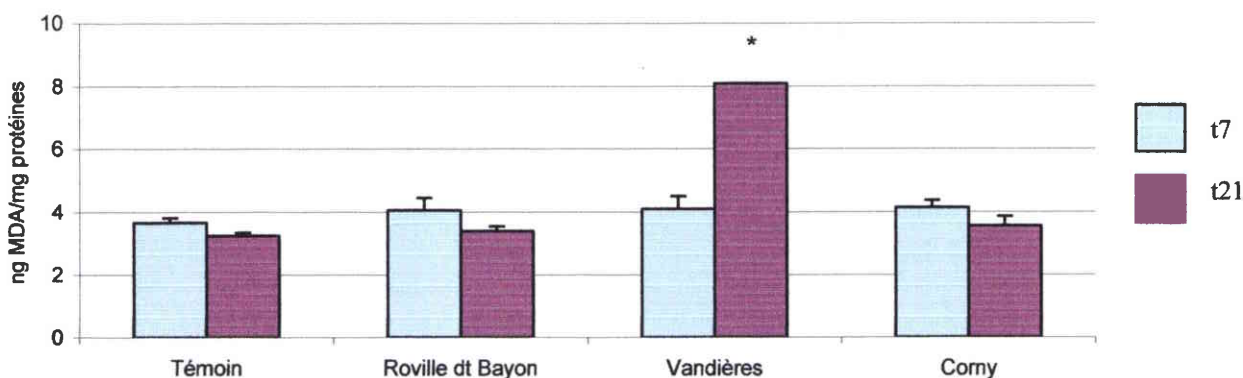


Figure 29 : Concentrations moyennes de MDA dans les homogénats tissulaires des **glandes digestives** des bivalves exposés pendant 7 et 21 jours sur les 3 plans d'eau issus de gravières au cours de la campagne de printemps 2000 (n=6)

La lipoperoxydation est exprimée en ng MDA/mg protéine

* augmentation statistiquement significative par rapport aux niveaux de référence ($p \leq 0,05$)

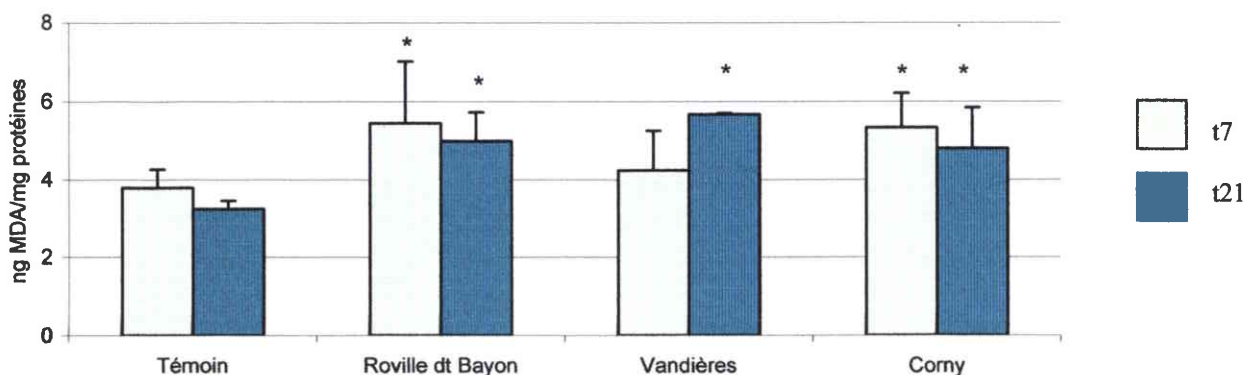


Figure 30 : Concentrations moyennes de MDA dans les homogénats tissulaires des **branchies** des bivalves exposés pendant 7 et 21 jours sur les 3 plans d'eau issus de gravières au cours de la campagne de printemps 2000 (n = 6)

* augmentation statistiquement significative par rapport aux niveaux de référence ($p \leq 0,05$)

Tableau XX : Modifications des paramètres antioxydants observées dans les bivalves transférés sur les 3 plans d'eau de la vallée de la Moselle durant le printemps 2000 après 7 et 21 jours d'exposition

Gd = glande digestive ; Br = branchie ; SeGPx: glutathion peroxydase sélénium-dépendante ; GPx Se-ind : glutathion peroxydase sélénium-indépendante ; GRd : glutathion réductase ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé

	Roville dt Bayon				Vandières				Corny			
	Gd		Br		Gd		Br		Gd		Br	
	t7	t21	t7	t21	t7	t21	t7	t21	t7	t21	t7	t21
SeGPx	=	=	=	=	=	↓	=	↓	=	=	=	↓
GPx Se-ind	=	=	=	=	=	↓	=	↓↓	=	=	=	=
GRd	↓	↓	↓	=	=	↓↓	=	↓↓	=	=	↓	↓
GSH	=	=	↓	=	=	↓	=	↓	=	=	↓	↓
GSSG	=	=	↑	↑	↑	↑↑	=	↑↑	=	=	↑	↑

= non significativement différent du témoin

↑ augmentation par rapport au témoin ($\leq 30\%$)

↓ diminution par rapport au témoin ($\leq 30\%$)

↑↑ augmentation par rapport au témoin ($> 50\%$)

b/ Campagne de printemps 2000

Les résultats obtenus après 7 et 21 jours pour les deux tissus sont présentés sur les figures 29 pour les glandes digestives et 30 pour les branchies.

Dans les glandes digestives, les effets observés sont plus marqués chez les bivalves exposés sur le site de Vandières à 21 jours ; les effets sont du même ordre de grandeur dans les branchies quel que soit le site étudié. Après 7 jours d'exposition, les effets de la lipoperoxydation sont moindres chez les organismes exposés dans les deux tissus étudiés. Après 21 jours, les taux de MDA des glandes digestives sont 2,5 fois plus élevés que ceux des témoins. Dans les branchies, l'augmentation des taux de MDA est moins marquée ($\times 1,7$). Sur ce site, un seul bivalve parmi ceux encagés avait été retrouvé vivant après 21 jours d'exposition. Les résultats obtenus chez cet organisme confirment une altération tissulaire, branchiale et digestive, et la déficience des systèmes de détoxification cellulaire.

Les modifications enregistrées apparaissent être le reflet d'un impact biologique des facteurs environnementaux sur l'organisme vivant, et de la détérioration de son état de santé.

Pour les autres sites étudiés, on note une augmentation, quoique faible, des niveaux de MDA ($\times 1,4$ et $\times 1,5$ respectivement pour t_7 et t_{21}) dans les branchies seulement.

Pour le site de Roville devant Bayon, la lipoperoxydation a été détectée après 7 jours et 21 jours dans les branchies, une hausse significative des taux de MDA est notée comparativement aux témoins ($\times 1,5$).

A Corny, le taux de peroxydation des lipides augmente de près de 40% après 7 jours et 21 jours d'exposition dans les branchies. Dans les glandes digestives, aucune modification n'est visible quelle que soit la durée d'exposition.

Les effets observés sur les paramètres antioxydants (tableau XX) sont plus marqués chez les bivalves exposés sur le site de Vandières après 21 jours d'exposition ; les effets sont du même ordre de grandeur dans les glandes digestives et les branchies. On remarque sur ce site, une diminution importante de tous les paramètres antioxydants étudiés (40% GPx, 61% GRd et 30% GSH), accompagnée d'une augmentation de 75% des taux de glutathion oxydé. Pour les deux autres sites étudiés, on note une faible diminution (environ 20%) des activités GRd et des taux de GSH dans les deux tissus, avec une tendance à un retour à des niveaux comparables aux témoins après 21 jours d'exposition.

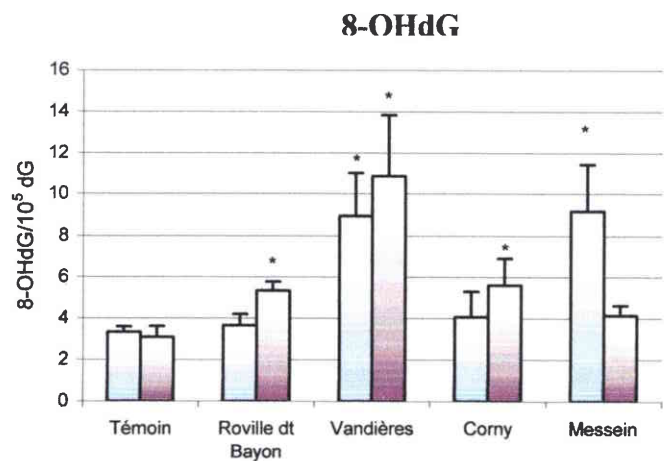
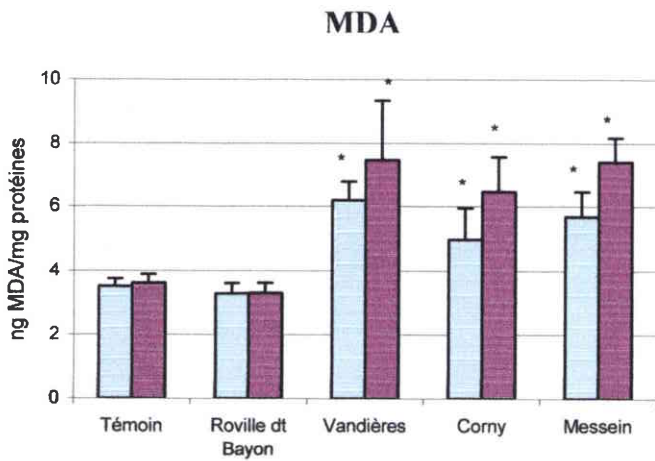


Figure 31 : Taux moyens de MDA et de 8-OHdG dans les homogénats tissulaires des **glandes digestives** des bivalves exposés pendant 7 et 21 jours sur les 4 plans d'eau issus de gravières au cours de la campagne d'automne 2000 (n=6).

* augmentation statistiquement significative par rapport aux niveaux de référence ($p \leq 0,05$)

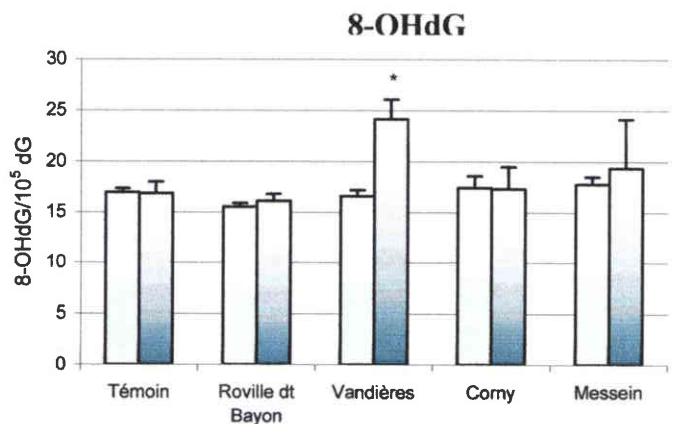
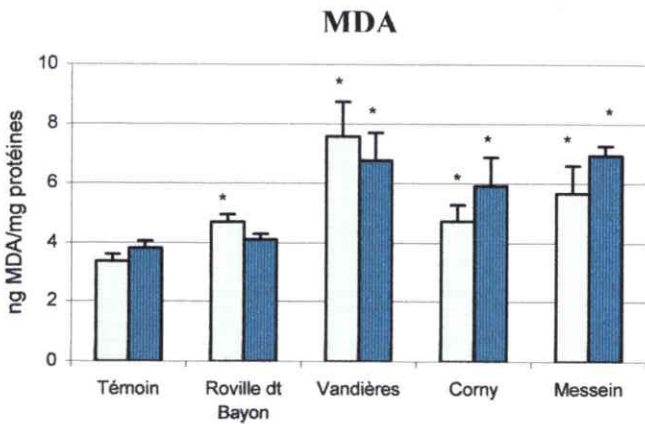


Figure 32 : Taux moyens de MDA et de 8-OHdG dans les homogénats tissulaires des **branchies** des bivalves exposés pendant 7 et 21 jours sur les 4 plans d'eau issus de gravières au cours de la campagne d'automne 2000 (n = 6).

* augmentation statistiquement significative par rapport aux niveaux de référence ($p \leq 0,05$)

c/ Campagne d'automne 2000

Les résultats obtenus après 7 et 21 jours pour les deux tissus sont présentés sur les figures 31 et 32.

Peroxydation lipidique

Lors de la campagne d'automne 2000, les réponses mesurées sont différentes selon le tissu étudié.

Dans les glandes digestives, aucune modification de la lipoperoxydation n'a été enregistrée chez les bivalves exposés à Roville devant Bayon, après 7 et 21 jours d'exposition.

A Vandières, les niveaux de MDA ont doublé par rapport aux niveaux de base, les effets sont du même ordre de grandeur quelle que soit la durée d'exposition.

A Corny, on observe une augmentation des concentrations en MDA de 40% après 7 jours d'exposition et de 70% après 21 jours.

Chez les bivalves exposés à Messein (il en est de même à Vandières et Corny), la peroxydation lipidique s'accroît avec la durée d'exposition. Après 7 jours, on note une augmentation du MDA de 40%. A 21 jours, les modifications sont environ deux fois plus marquées, avec une augmentation de 80% du MDA par rapport aux niveaux de base.

Au niveau branchial, les effets sont parallèles à ceux notés dans les glandes digestives après 7 jours d'exposition des bivalves à Roville devant Bayon (taux MDA augmenté de 40%). Après 21 jours d'exposition, on observe un retour de la lipoperoxydation à un niveau basal identique aux témoins, preuve de l'adaptation des bivalves aux conditions environnementales.

A Vandières, on note un doublement de la peroxydation des lipides après 7 et 21 jours ; les effets sont en accord avec ceux observés en 1999 sur ce site.

Sur le site de Corny, la peroxydation des lipides est caractérisée par une augmentation de l'ordre de 40% du taux de MDA à 7 jours et de 50% à 21 jours.

A Messein, l'augmentation du MDA est de 65% à 21 jours.

Les tendances des systèmes antioxydants sont présentées dans le tableau XXI. Aucune modification de ces paramètres n'a été mesurée chez les bivalves exposés à Roville devant Bayon, quelle que soit la durée d'exposition. A Vandières, l'ensemble des paramètres mesurés est modifié, mais les effets sont du même ordre de grandeur après 7 et 21 jours d'exposition : on observe des diminutions très marquées des systèmes antioxydants (30% GPx, 50% GRd et 30% GSH) et l'augmentation du taux de glutathion oxydé (35%). Sur le site de Corny, une diminution de 20% de l'activité du GRd et de 15% du glutathion réduit après 7 et 21 jours d'exposition est relevée dans les deux tissus étudiés. A Messein, une accentuation des effets est notée dans les glandes digestives en fonction de la durée d'exposition concernant les activités glutathion peroxydases, la glutathion réductase et le glutathion réduit.

Génotoxicité

Dans les glandes digestives, une augmentation de 70 % des taux de 8-OHdG après 21 jours d'exposition est observée à Roville devant Bayon. Aucune modification n'est visible après 7 jours d'exposition.

A Vandières, les effets sont du même ordre de grandeur quelle que soit la durée d'exposition : les taux de 8-OHdG ont triplé comparés aux niveaux de base.

A Corny, on note seulement des effets à 21 jours, le taux de 8-OHdG étant doublé.

Tableau XXI : Modifications des paramètres antioxydants et du test des comètes observées dans les bivalves transférés sur les 4 plans d'eau de la vallée de la Moselle durant l'automne 2000 après 7 et 21 jours d'exposition

Gd = glande digestive ; Br = branchie

	Roville dt Bayon				Vandières				Corny				Messein			
	Gd		Br		Gd		Br		Gd		Br		Gd		Br	
	t7	t21	t7	t21	t7	t21	t7	t21	t7	t21	t7	t21	t7	t21	t7	t21
SeGPx	=	=	=	=	↓	↓	↓	↓	=	↓	=	↓	=	↓	↓	↓
GPx Se-ind	=	=	=	=	↓	↓	=	↓	=	=	=	↓	=	↓	=	↓
GRd	=	=	↓	=	↓↓	↓↓	↓	↓	↓	↓	↓↓	↓	↓	↓	↓	↓
GSH	=	=	↓	=	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
GSSG	=	=	=	=	↑	↑	↑	↑	=	↑	=	=	↑	↑	↑	=
Test des comètes (hémolymph)	t7		t21		t7		t21		t7		t21		t7		t21	
	↑		=		=		=		=		↑		=		↑	

= non significativement différent du témoin
 ↓ diminution par rapport au témoin (≤ 30%)

↑ augmentation par rapport au témoin (≤ 30%)
 ↑↑ augmentation par rapport au témoin (> 30%)

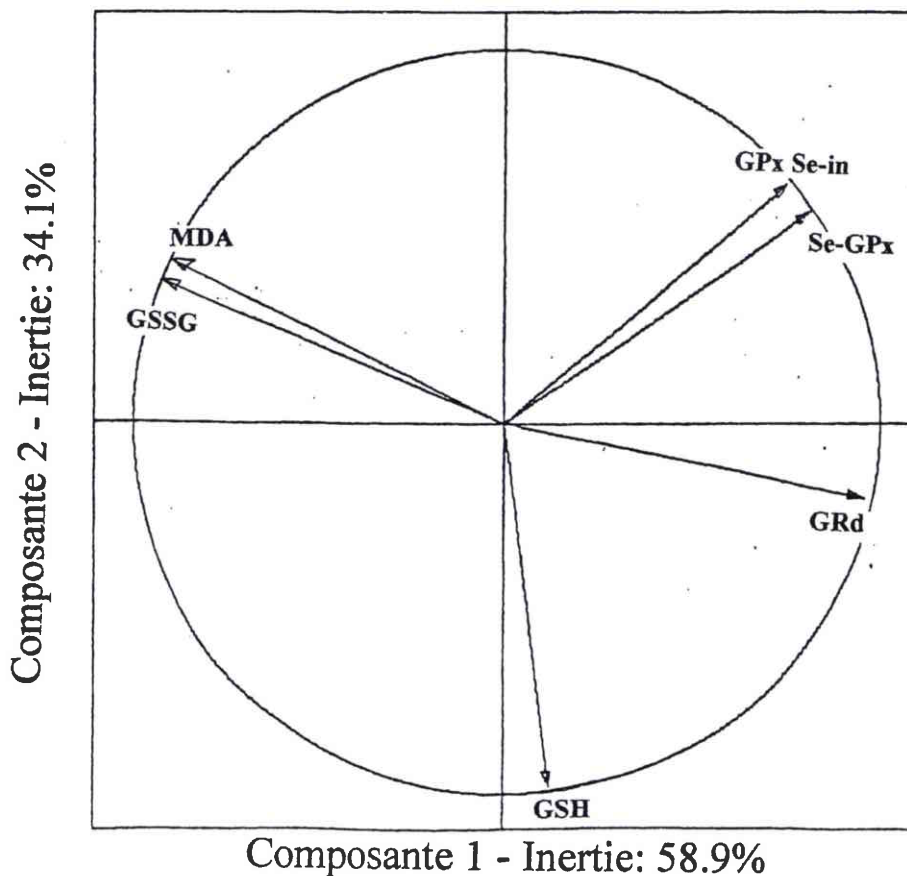


Figure 33 : Cercle des corrélations des données centrées réduites de l'ensemble des paramètres biologiques (sans la 8-OHdG) pour l'étude des gravières, toutes campagnes et tous tissus confondus

A Messein, les taux de 8-OHdG ont triplé après 7 jours comparés aux niveaux de base. Au niveau branchial, aucune modification des niveaux de résidus 8-OHdG n'est observée quelle que soit la durée d'exposition à Roville devant Bayon, à Corny et à Messein. A Vandières, le taux de 8-OHdG est augmenté de 45 % après 21 jours seulement.

Le test des Comètes (tableau XXI) a été effectué avec l'hémolymphe (hémocytes) des bivalves lors de cette campagne. Les résultats des taux moyens des dommages à l'ADN montrent une augmentation des lésions génomiques dans les hémocytes des Unio exposées pendant 21 jours à Messein et à Corny. Aucune modification n'est visible sur les autres sites testés quelle que soit la durée d'exposition.

d/ Analyse en composantes principales (ACP)

Une ACP a été réalisée sur les données centrées réduites de l'ensemble des paramètres biologiques étudiés- MDA, systèmes antioxydants, 8-OHdG- des sites issus de gravières durant les deux années d'études. Le paramètre 8-OHdG n'intervenant que lors de la campagne d'automne 2000, deux analyses ont été effectuées : l'une prenant en compte tous les sites, les mesures de la lipoperoxydation et des systèmes antioxydants, mais pas la 8-OHdG, et la seconde portant seulement sur les résultats d'automne 2000 et incluant les mesures des taux de 8-OHdG.

ACP des résultats de toutes les campagnes

Comme le montre le cercle des corrélations de la figure 33, on remarque que le MDA est corrélé à la GSSG. En effet, nous avons observé que l'induction du MDA s'accompagnait d'une augmentation des contenus en glutathion oxydé. Ces deux variables varient en sens inverse de la glutathion réductase. Les deux variables GPx Se-ind. et SeGPx sont corrélées entre elles. Ces résultats traduisent l'induction de la lipoperoxydation qui résulte d'une déplétion des paramètres antioxydants.

La glutathion réductase est impliquée dans le processus de régénération du glutathion réduit à partir du glutathion oxydé : quand l'activité de l'enzyme diminue, ce processus est ralenti et le GSSG s'accumule. Sur le cercle, on note que les variables GSH et GRd ne sont pas corrélés cependant il faut rappeler que la première analyse concernait l'ensemble des données regroupées des branchies et des glandes digestives. Cette ACP devait nous fournir une tendance générale des corrélations entre variables.

La composante principale 1 qui contient les informations relatives à la variance maximale peut être liée au gradient de perturbation des plans d'eau qui dépend des niveaux de MDA et de GSSG.

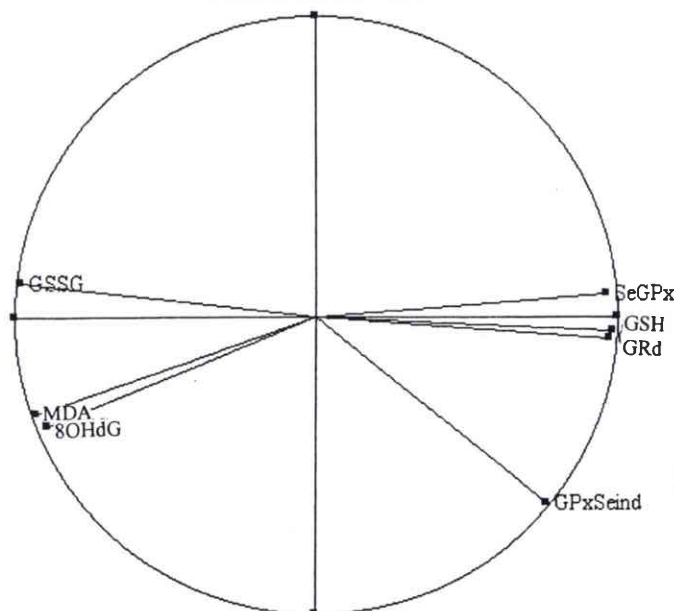
ACP des résultats d'automne 2000

La seconde analyse a été réalisée avec les données d'automne 2000 incluant les mesures de la 8-OHdG. Nous avons séparé les deux tissus afin de mieux cerner les rapports entre les différentes variables (figure 34 et 35).

Dans les **glandes digestives**, on note que la 8-OHdG est liée au MDA selon la composante 1 après 7 jours d'exposition. La composante 1 peut être interprétée comme un gradient de toxicité, avec les paramètres de toxicité (GSSG, MDA et 8-OHdG) s'opposant aux systèmes antioxydants (GPx, GRd et GSH).

Composante 2 - Inertie: 9.4%

Cercle des corrélations
Variables de base

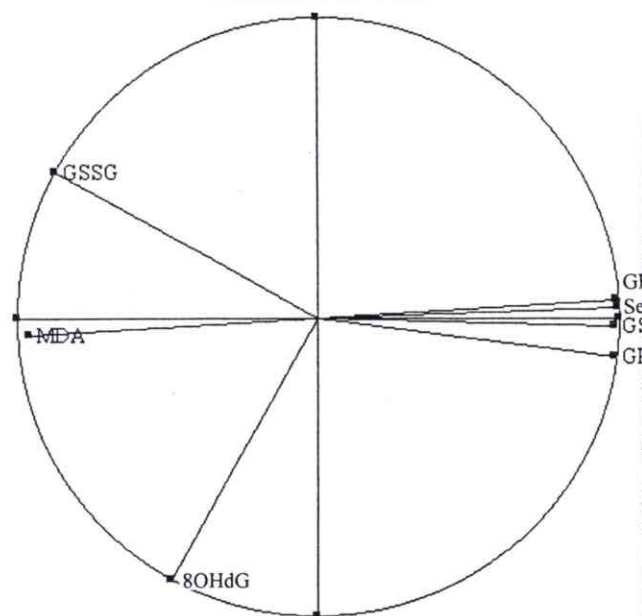


Composante 1 - Inertie: 86.3%

t = 7 jours

Composante 2 - Inertie: 14.7%

Cercle des corrélations
Variables de base



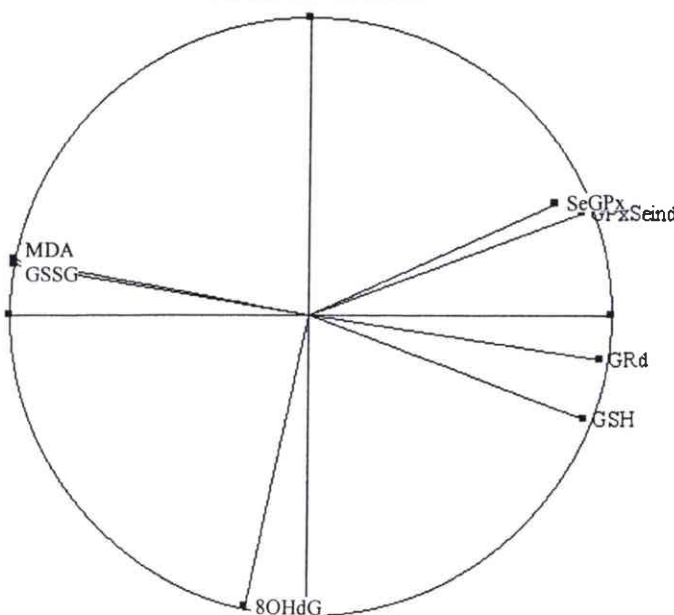
Composante 1 - Inertie: 83.3%

t = 21 jours

Figure 34 : Cercles des corrélations sur les données centrées réduites incluant les mesures du MDA, de la 8-OHdG et des paramètres antioxydants dans les **glandes digestives** après 7 et 21 jours d'exposition pour les sites des gravières lors de la campagne d'automne 2000

Composante 2 - inertie: 20.0%

Cercle des corrélations
Variables de base

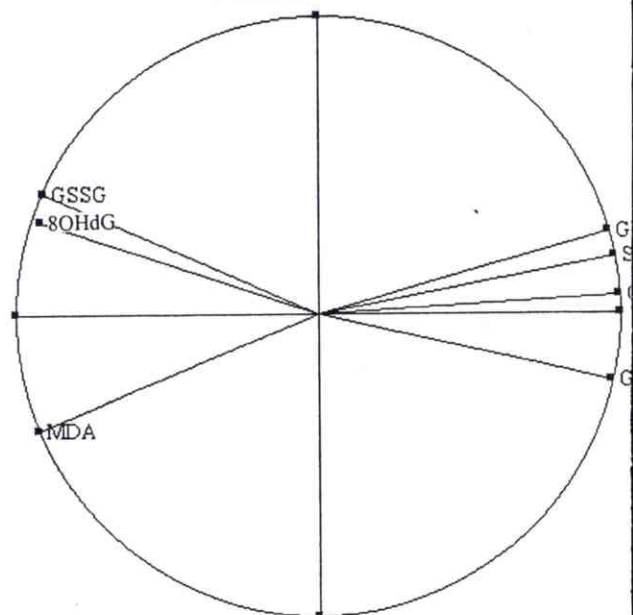


Composante 1 - Inertie: 74.5%

t = 7 jours

Composante 2 - Inertie: 8.2%

Cercle des corrélations
Variables de base



Composante 1 - Inertie: 90.3%

t = 21 jours

Figure 35 : Cercles des corrélations sur les données centrées réduites incluant les mesures du MDA, de la 8-OHdG et des paramètres antioxydants dans les **branchies** après 7 et 21 jours d'exposition pour les sites des gravières lors de la campagne d'automne 2000

La corrélation entre les deux variables 8-OHdG et MDA disparaît après 21 jours d'exposition, les taux de 8-OHdG semblent alors indépendants de la lipoperoxydation et de l'activité des systèmes antioxydants.

Dans les **branchies**, les taux de MDA et GSSG sont fortement associés entre eux et sont inversement liés aux activités enzymatiques antioxydantes et au glutathion réduit après 7 jours d'exposition. La 8-OHdG n'est corrélée à aucun paramètre ; les taux de 8-OHdG mesurés dans les branchies des individus transférés sur les 4 plans d'eau sont effectivement similaires à ceux reportés chez les contrôles. On note qu'après 21 jours d'exposition, les variables GSSG et 8-OHdG sont corrélées. Le MDA qui n'est plus lié aux taux de GSSG s'oppose à la 8-OHdG selon la composante 2.

En résumé, les études de transfert réalisées sur les plans d'eau en Lorraine ont montré que :

- *les effets apparaissent d'abord au niveau des glandes digestives et sont toujours plus intenses dans ce tissu que dans les branchies.*
- *les effets enregistrés à Roville devant Bayon sont modérés et traduisent une faible dégradation du milieu en 1999. L'amélioration de la qualité du milieu est nette en fin 2000.*
- *le site de Corny, qualifié de témoin initialement, n'a entraîné aucune réponse des biomarqueurs de toxicité lors de la campagne de printemps 2000, mais il semble que le milieu se soit légèrement dégradé à l'automne.*
- *l'amplification des effets de la lipoperoxydation à 21 jours par rapport à ceux relevés après 7 jours sur le site de Messein lors de l'automne 2000 s'accompagne d'une déplétion des systèmes antioxydants : elle dénote la difficulté des organismes à surmonter le stress environnemental sur ce site. Cette accentuation des effets dans le temps suscite des interrogations quant aux conséquences à long terme d'une exposition prolongée.*
- *le site de Vandières est certainement le plus perturbé des quatre plans d'eau étudiés. La situation notée en 2000 pose la question de l'origine de la dégradation enregistrée et à laquelle il est nécessaire de remédier. On note une forte minéralisation sur ce site avec des concentrations importantes en ions chlorures (environ 120 mg Cl/L), en manganèse (0,63 mg/L) et une conductivité élevée (695 µs/cm)*
- *les résultats des ACP ont confirmé l'existence d'une corrélation entre le MDA et la 8-OHdG dans les glandes digestives dans les premiers jours de l'exposition, mais celle-ci disparaît à 21 jours. Dans les branchies, aucune relation entre la lipoperoxydation et la formation de 8-OHdG n'a pu être mise en évidence.*

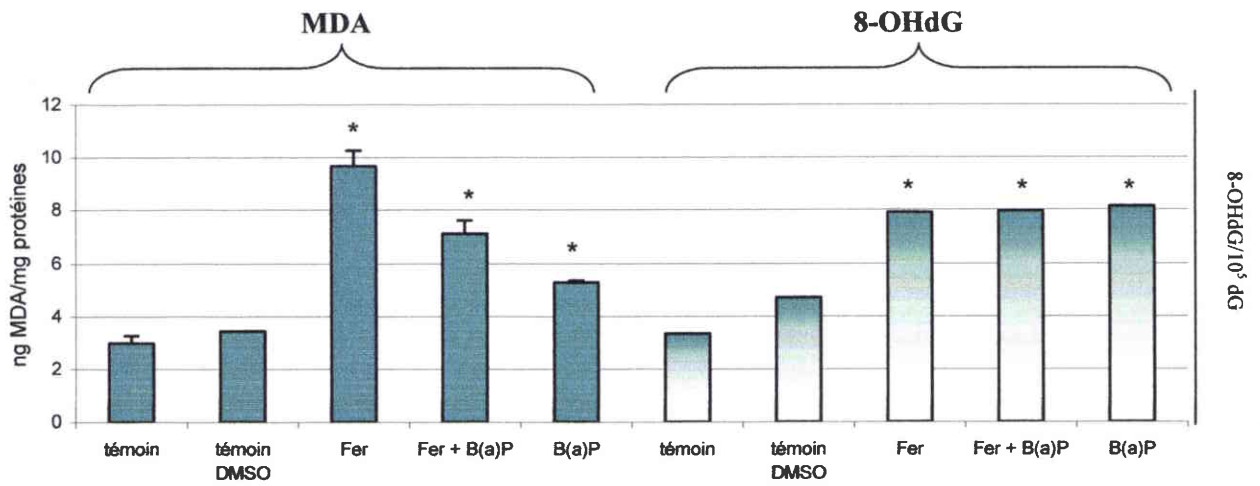


Figure 36 : Taux de MDA et de 8-OHdG mesurés dans les homogénats tissulaires des **glandes digestives** des bivalves exposés en laboratoire au fer ferrique (20 mg/L) et au Benzo(a)Pyrene (20 µg/L) lors d'une étude préliminaire (n=1). Les écart-types sont calculés sur les duplicats. La lipoperoxydation est exprimée en ng/mg protéine et les taux de 8-OHdG sont exprimés en 8-OHdG/10⁵ dG
 * Augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins (p ≤ 0,05)

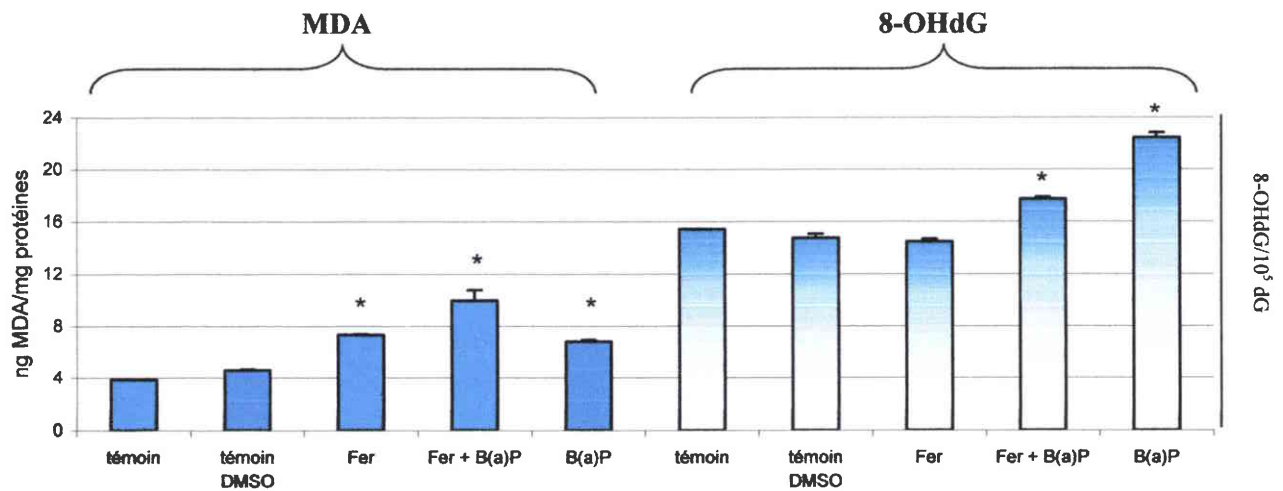


Figure 37 : Taux de MDA et de 8-OHdG mesurés dans les homogénats tissulaires des **branchies** des bivalves exposés en laboratoire au fer ferrique (20 mg/L) et au Benzo(a)Pyrene (20 µg/L) lors d'une étude préliminaire (n=1). Les écart-types sont calculés sur les duplicats. La lipoperoxydation est exprimée en ng/mg protéine et les taux de 8-OHdG sont exprimés en 8-OHdG/10⁵ dG
 * Augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins (p ≤ 0,05)

3/ INTOXICATIONS EN LABORATOIRE

Des intoxications ont été conduites en conditions contrôlées de laboratoire afin de vérifier si l'exposition des bivalves à des contaminants induisant un stress oxydant, pouvait entraîner également des lésions oxydatives à l'ADN. Nous souhaitons étudier les relations existantes entre l'induction de la lipoperoxydation et la formation de la 8-OHdG, marqueur de génotoxicité. Les résultats bruts des essais préliminaires et définitifs sont donnés en annexe 13.

Deux études de Garçon *et al.* (2001a, b) réalisées sur des rongeurs avaient montré une synergie de la toxicité du fer et du B(a)P. L'hypothèse d'un stress oxydant à l'origine de cette toxicité avait été émise par les auteurs, le fer pouvant favoriser la production du radical hydroxyle *via* la réaction de Fenton, et le B(a)P pouvant provoquer une induction d'oxyradicaux (Livingstone *et al.*, 1988) et d'adduits à l'ADN (Xu *et al.*, 1999).

Le test des Comètes a été réalisé par Sébastien Lemièrre sur les glandes digestives et les branchies afin de mettre en évidence les lésions à l'ADN autres que la déoxyguanosine oxydée.

A/ Résultats

(1) Essai préliminaire

Les deux groupes contrôles (avec ou sans DMSO) présentent des contenus en MDA comparables (figures 36 et 37) quel que soit le tissu étudié. **Dans les glandes digestives**, une augmentation des taux de MDA a été observée chez les bivalves exposés au fer et au B(a)P seuls ou en mélange. Les effets de la lipoperoxydation sont plus marqués pour les essais réalisés avec le fer : les taux de MDA ont été multipliés par trois après exposition au fer seul et par deux après exposition au mélange fer-B(a)P par rapport aux valeurs des contrôles.

Une augmentation des niveaux de 8-OHdG a été observée avec le fer ($\times 2,4$), le B(a)P et les deux en mélange ($\times 1,7$) par rapport aux témoins.

Dans les branchies, une augmentation significative des taux de MDA est notée après exposition aux substances étudiées seules ou en mélange. L'induction des taux de MDA est moins importante en présence de B(a)P seul ($\times 1,5$). Une augmentation des niveaux de 8-OHdG a été observée dans les organismes exposés au B(a)P, comparés aux contrôles : les effets sont plus marqués avec le B(a)P seul ($\times 1,4$) qu'en présence de fer.

Au cours de l'intoxication préliminaire, les résultats obtenus au niveau hépatique et branchial, après exposition des *Unios* au fer, confirment l'altération tissulaire. En effet, les effets de la lipoperoxydation sont plus marqués chez les bivalves exposés au fer seul et au mélange fer-B(a)P. Une évaluation des effets génotoxiques des toxiques testés a été réalisée par la mesure de la 8-OHdG et des cassures à l'ADN. Les résultats ont montré des effets significatifs dans les glandes digestives reflétant l'altération de l'ADN et la génération de bases mutées après exposition aux toxiques. Les effets ont été dans l'ensemble plus accentués au niveau des glandes digestives et notamment pour l'intoxication par le fer, en accord avec les augmentations significatives des contenus en MDA et en 8-OHdG dans ce tissu.

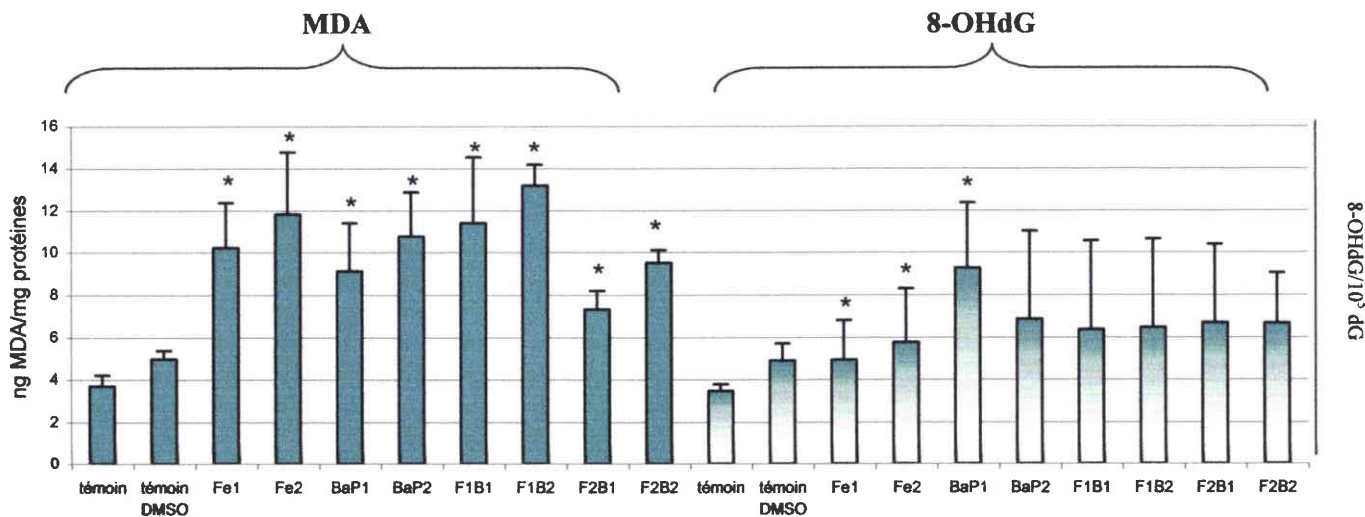


Figure 38 : Taux de MDA et de 8-OHdG mesurés dans les homogénats tissulaires des **glandes digestives** des bivalves (n=5) exposés en laboratoire au fer ferrique et au Benzo(a)Pyrène seuls et en mélange

* Augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins ($p \leq 0,05$)
 Fer 1 = 20 mg/L ; Fer 2 = 40 mg/L ; BaP 1 = 50 µg/L ; BaP 2 = 100 µg/L

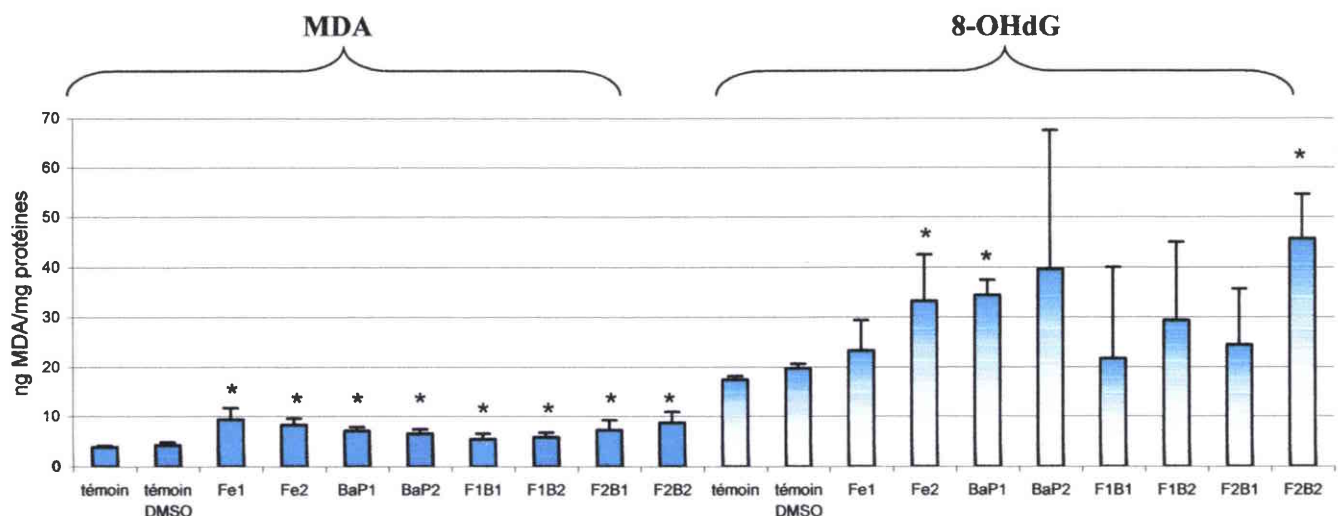


Figure 39 : Taux de MDA et de 8-OHdG mesurés dans les homogénats tissulaires des **branchies** des bivalves (n=5) exposés en laboratoire au fer ferrique et au Benzo(a)Pyrène seuls et en mélange

* Augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins ($p \leq 0,05$)
 Fer 1 = 20 mg/L ; Fer 2 = 40 mg/L ; BaP 1 = 50 µg/L ; BaP 2 = 100 µg/L

Tableau XXII : Récapitulatif des résultats du test des comètes après 6 jours d'exposition des organismes au fer et/ou au BaP lors de l'essai définitif

	Glande digestive	Branchie
Fer 1 (20 mg/L)	=	=
Fer 2 (40 mg/L)	↑	=
B(a)P 1 (50 µg/L)	↑↑	=
B(a)P 2 (100 µg/L)	↑	=
Fer 1 + B(a)P 1	↑	=
Fer 1 + B(a)P 2	↑	=
Fer 2 + B(a)P 1	↑	↑
Fer 2 + B(a)P 2	↑	=

= non différent des témoins ↑ augmentation par rapport aux témoins (<30%) ↑↑ augmentation par rapport aux témoins (>40%)

(2) Essai définitif

Les résultats de l'essai définitif montrent une augmentation de la peroxydation des lipides pour les deux tissus étudiés (figures 38 et 39) quel que soit la substance testée. Ces modifications, par rapport aux bivalves témoins, sont plus marquées au niveau des glandes digestives et traduisent une toxicité cellulaire supérieure à celles observées pour les branchies.

Dans les glandes digestives, on remarque que les augmentations les plus importantes de la lipoperoxydation sont observées avec les concentrations les plus fortes en fer ou BaP :

Après exposition au fer seul, la peroxydation des lipides augmente avec les concentrations en fer ($\times 2,8$ avec 20 mg fer/L et $\times 3,2$ avec 40 mg fer/L).

L'induction de la lipoperoxydation varie également avec la concentration en B(a)P : les valeurs de MDA observées sont respectivement multipliées d'un facteur de 1,8 et 2,2 par rapport aux témoins pour les concentrations de 50 $\mu\text{g/L}$ et 100 $\mu\text{g/L}$ respectivement.

Au niveau branchial, les augmentations des taux de MDA sont plus marquées avec le fer seul. On note un doublement des taux de MDA par rapport aux témoins dans les organismes exposés. Chez les bivalves exposés au B(a)P seul, les taux de MDA n'augmentent pas avec les teneurs en BaP. La lipoperoxydation est augmentée avec le mélange fer-B(a)P quelle que soit la concentration. L'augmentation des taux de 8-OHdG est observée avec le fer à 40 mg/L, le B(a)P à 50 $\mu\text{g/L}$ et le mélange fer (40mg/L)-B(a)P (100 $\mu\text{g/L}$).

Les altérations génomiques mesurées par le test des Comètes (tableau XXII) mettent en évidence des effets génotoxiques dans les glandes digestives en présence de B(a)P seul ou en mélange.

Les cassures à l'ADN dans les glandes digestives sont plus marquées en présence de B(a)P seul et en mélange. Aucun effet n'est noté à 20 mg/L de fer, alors qu'une augmentation de 8-OHdG était observée. Les effets clastogènes sont plus importants à 50 $\mu\text{g/L}$ de BaP qu'à 100 $\mu\text{g/L}$, comme les taux de 8-OHdG.

Dans les branchies, les résultats montrent une faible induction des cassures à l'ADN, seul le mélange fer/BaP1 a un effet significatif.

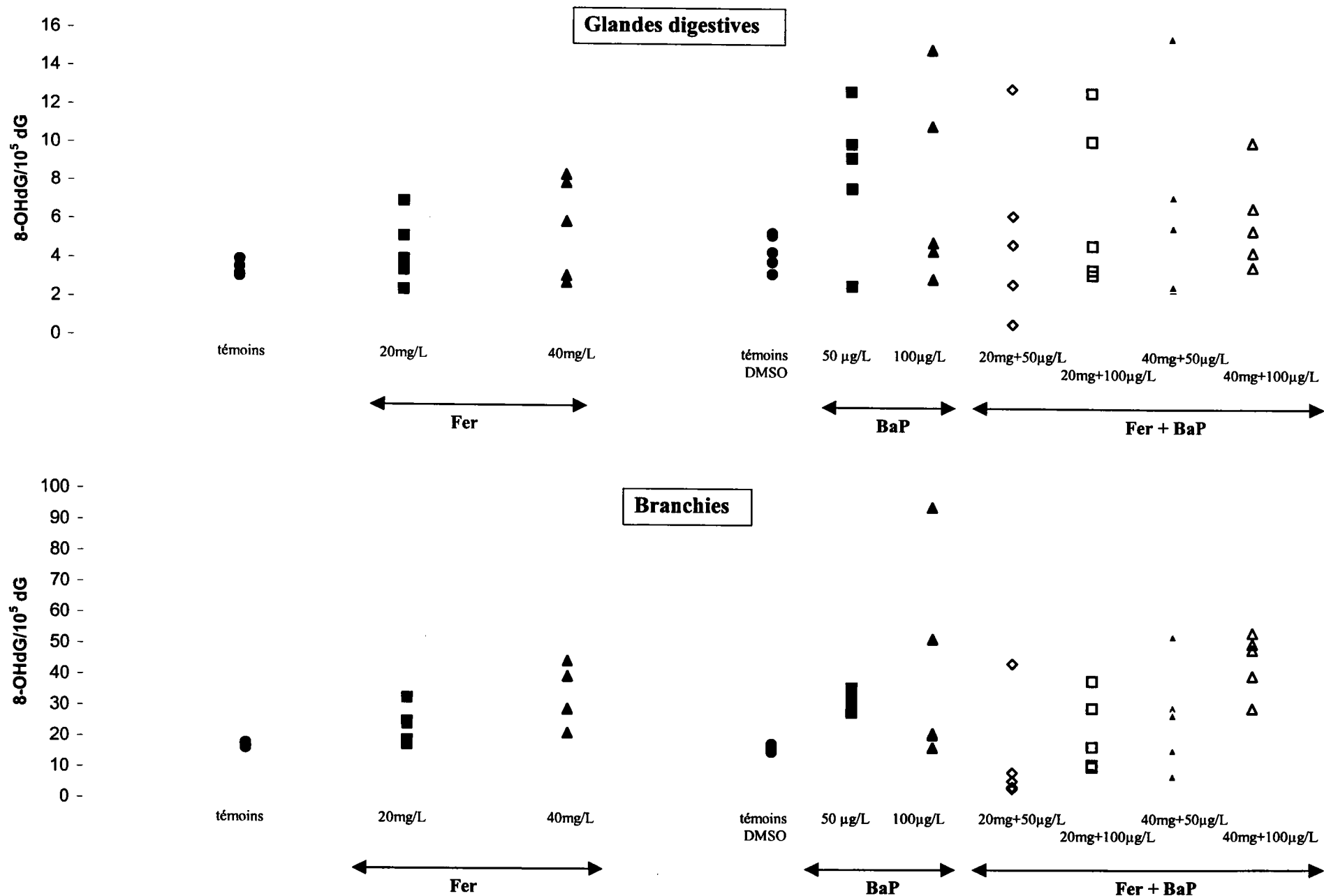


Figure 40 : Variabilité interindividuelle des taux de 8-OHdG dans les glandes digestives et les branchies des bivalves intoxiqués pendant 6 jours par le fer et le B(a)P seuls ou en combinaison.

Des différences interindividuelles ont été observées lors des mesures de 8-OHdG (figure 40) :

- dans les glandes digestives, on note également une variabilité individuelle importante des réponses chez les organismes exposés. Après exposition à 50 µg/L de B(a)P, aucune réponse n'est enregistrée chez un individu alors que les 4 autres présentent des inductions de 8-OHdG de l'ordre de 2 à 3 par rapport aux témoins. Deux individus sur les cinq exposés au B(a)P (100µg/L) ont une induction des taux de bases oxydées de $\times 2,2$ à $\times 3$ alors qu'aucune différence significative par rapport aux témoins n'était notée pour les trois autres organismes. La variabilité individuelle n'est pas accentuée lors des co-expositions au fer et au B(a)P.

- dans les branchies, les expositions au B(a)P seul ou en mélange ont montré des variations dans les réponses des organismes exposés. Deux individus sur les cinq exposés au B(a)P seul (100µg/L) ont vu leurs taux de 8-OHdG augmentés de $\times 2,6$ à $\times 4,6$. De même, un individu sur les 5 exposés au mélange B(a)P et fer (20 mg/L) a montré une induction des taux de 8-OHdG par rapport aux contrôles ($\times 2,3$ avec 50 µg B(a)P/L et $\times 2,7$ avec 100 µg B(a)P/L) alors que les niveaux des 4 autres individus n'avaient pas changé, présentant même des taux inférieurs à ceux des témoins.

Le calcul du coefficient de variation (CV) a été effectué sur les données concernant la 8-OHdG lors de l'essai définitif (annexe 13).

Dans les glandes digestives, on note pour les témoins un faible pourcentage, ce qui reflète la faible dispersion des résultats (9% pour le témoin et 15% pour le témoin DMSO). La dispersion des résultats est importante pour le B(a)P à 100 µg/L soit 60% et pour le mélange fer-B(a)P (60%) excepté pour les plus fortes concentrations (35%).

Dans les branchies, on remarque la faible dispersion des résultats des témoins. Les CV les plus importants sont obtenus avec le B(a)P à 100 µg/L (70%) et pour le mélange fer-B(a)P aux plus faibles concentrations (84%).

De manière générale, la dispersion des résultats est plus importante avec le B(a)P qu'avec le fer. De même, chez les bivalves exposés au B(a)P seul, les CV augmentent de manière dose-dépendants. On note une dispersion importante pour les mélanges fer-B(a)P excepté pour les plus fortes concentrations où les taux sont moindres.

A l'issue de ces essais au laboratoire, nous retiendrons que :

- *l'exposition au fer et/ou au B(a)P a entraîné une peroxydation lipidique statistiquement significative dans les glandes digestives et les branchies,*

- *une exposition simultanée au fer et au BaP n'augmente pas les taux des lésions à l'ADN, comparée aux effets des substances seules. Peu de différences ont été enregistrées entre 50 et 100 µg/L de BaP, les lésions à l'ADN apparaissent plus intenses à 50 µg BaP/L,*

- *l'intensité des réponses varie selon les individus : certains bivalves se sont montrés plus sensibles à l'exposition au BaP alors que d'autres n'ont manifesté aucune réponse.*

DISCUSSION

Tableau XXIII : Modifications observées des taux de MDA et de 8-OHdG chez les bivalves transférés au niveau des sites contaminés par rapport aux organismes engagés dans le site de référence.

Sites	Paramètres	Tissus			
		Glande digestive		Branchie	
		t7	t21	t7	t21
Les Mitreuches	MDA	-	-	-	-
	8-OHdG	× 2	-	-	-
Eloyes	MDA	-	× 1,4	-	-
	8-OHdG	-	-	-	-
Archettes	MDA	× 1,3	× 1,4	× 1,4	× 1,3
	8-OHdG	× 1,3	-	-	-
Igney	MDA	× 1,4	-	× 1,4	× 1,4
	8-OHdG	× 1,7	-	× 1,4	-
Velle s/Moselle	MDA	× 1,6	× 2	× 1,4	× 1,6
	8-OHdG	-	× 1,7	-	-

		1999				2000p				2000a			
		Gd		Br		Gd		Br		Gd		Br	
		t7	t21	t7	t21	t7	t21	t7	t21	t7	t21	t7	t21
Roville dt Bayon	MDA		×1,4		×1,3	×1,2	-	×1,4	×1,5	-	-	×1,2	-
	8OHdG									×1,7			
Vandières	MDA		×1,3		×1,3	×1,2	× 2	-	×1,7	× 2	× 2	× 2	× 2
	8OHdG									× 3	× 3	-	×1,4
Corny	MDA					×1,2	-	×1,4	×1,5	×1,4	×1,7	×1,4	×1,4
	8OHdG									-	×1,8	-	-
Messein	MDA									×1,4	×1,8	×1,6	×1,65
	8OHdG									×2,5	×1,3	-	-

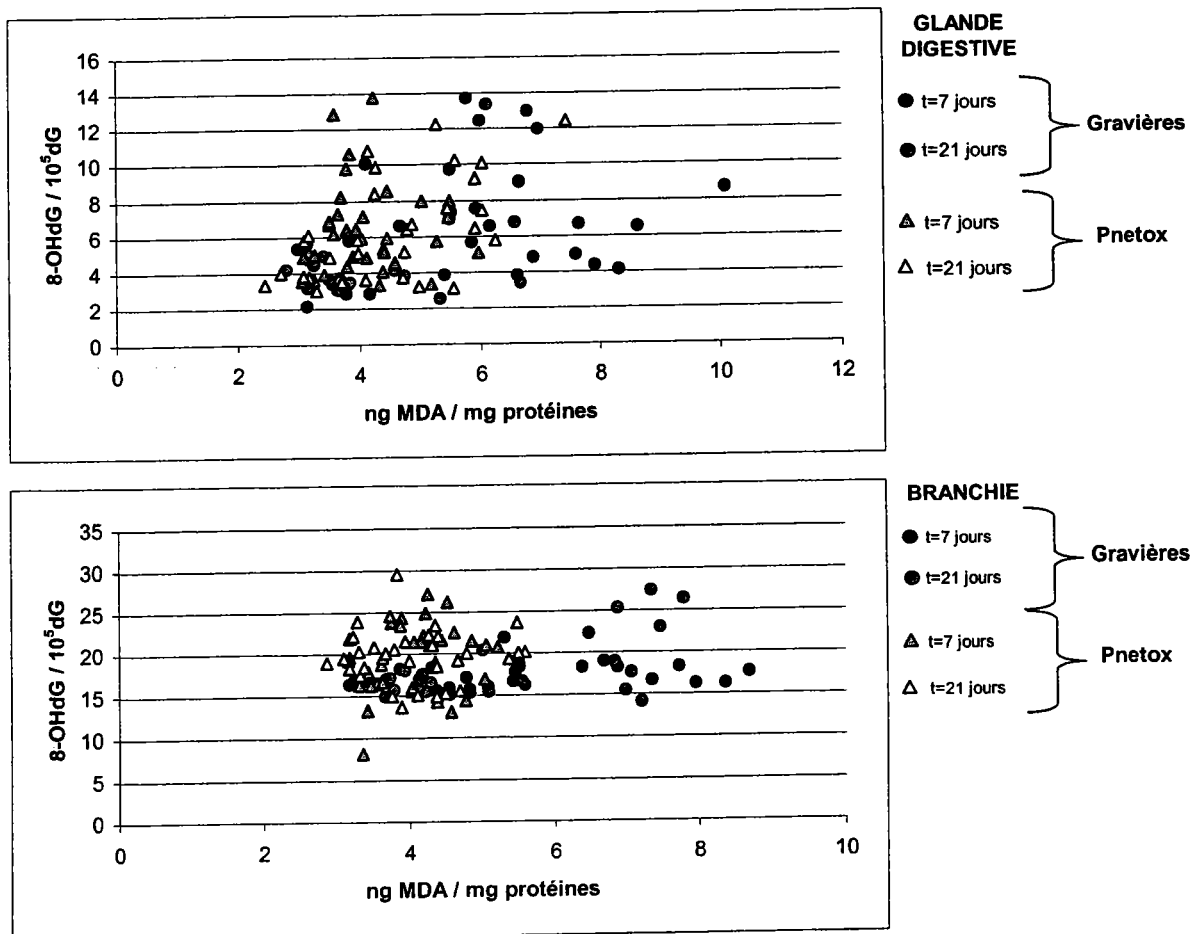


Figure 41 : Distribution des taux de 8-OHdG en fonction des taux de MDA dans les glandes digestives et les branchies des bivalves exposés lors des campagnes *in situ*

Etudes de terrain et intoxications en laboratoire : réponses des biomarqueurs de toxicité et de génotoxicité

Nos résultats ont montré que le transfert de bivalves, issus de sites non contaminés, sur diverses stations perturbées, pouvait provoquer une induction du processus de lipoperoxydation et une stimulation de la formation de la 8-OHdG (tableau XXIII et figure 41). Ces modifications ont été enregistrées à l'issue des deux temps d'exposition d'une et trois semaines dans les bivalves exposés aux sédiments contaminés.

- Les expérimentations de terrain ont révélé des différences de sensibilité entre les glandes digestives et les branchies en fonction des sites au niveau desquels les organismes ont été transférés.

Lors des études sur la Moselle, les inductions de la lipoperoxydation ont été relevées dans les deux tissus chez les individus transférés dans les sites les plus en aval (Igney et Velle sur Moselle). Dans les branchies, les taux de 8-OHdG ont augmenté significativement par rapport aux témoins pour les sites les plus en aval (Eloyes, Archettes, Igney et Velle). A l'inverse, de fortes inductions des taux de bases oxydées ont été relevées dans les glandes digestives chez les individus transférés dans la station amont des Mitreuches après 7 jours d'exposition.

Dans le cadre de cette étude de la rivière Moselle, les augmentations des taux de MDA au niveau des sites d'Igney et Velle sur Moselle peuvent s'expliquer par la situation géographique de ces deux sites à l'aval de l'agglomération d'Epinal. Ces stations sont soumises à des perturbations d'origine domestique et industrielle. La réponse des indicateurs biologiques de stress oxydant est difficilement expliquée par les analyses physico-chimiques réalisées sur les sédiments prélevés parallèlement à la collecte des bivalves. Les résultats d'analyse des sédiments dénotent une contamination chimique de l'ensemble des stations, qui peut être considérée comme relativement moyenne voire faible. Le sédiment le plus contaminé est celui des Mitreuches pour ce qui concerne les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Cette contamination par les HAPs peut expliquer la génotoxicité dans les glandes digestives chez les bivalves transférés sur ce site amont. En effet, les taux moyens de 8-OHdG sont doublés après 7 jours d'exposition des organismes. Cette augmentation est la plus importante pour l'ensemble des stations étudiées. Aucun effet n'est observé dans les branchies dans la station des Mitreuches. On note que cette contamination aux Mitreuches est transitoire car au bout d'un mois les analyses chimiques ne révèlent plus de traces de polluants sur ce site, à moins que la différence enregistrée résulte de l'hétérogénéité de la qualité des sédiments. L'augmentation de 8-OHdG à 7 jours qui disparaît à 21 jours nous fait opter pour l'hypothèse d'une pollution épisodique, plus qu'un problème d'échantillonnage. Cette augmentation temporaire des taux de 8-OHdG souligne également l'existence d'un système de réparation de cette lésion qui se manifesterait au cours des 7 premiers jours d'exposition.

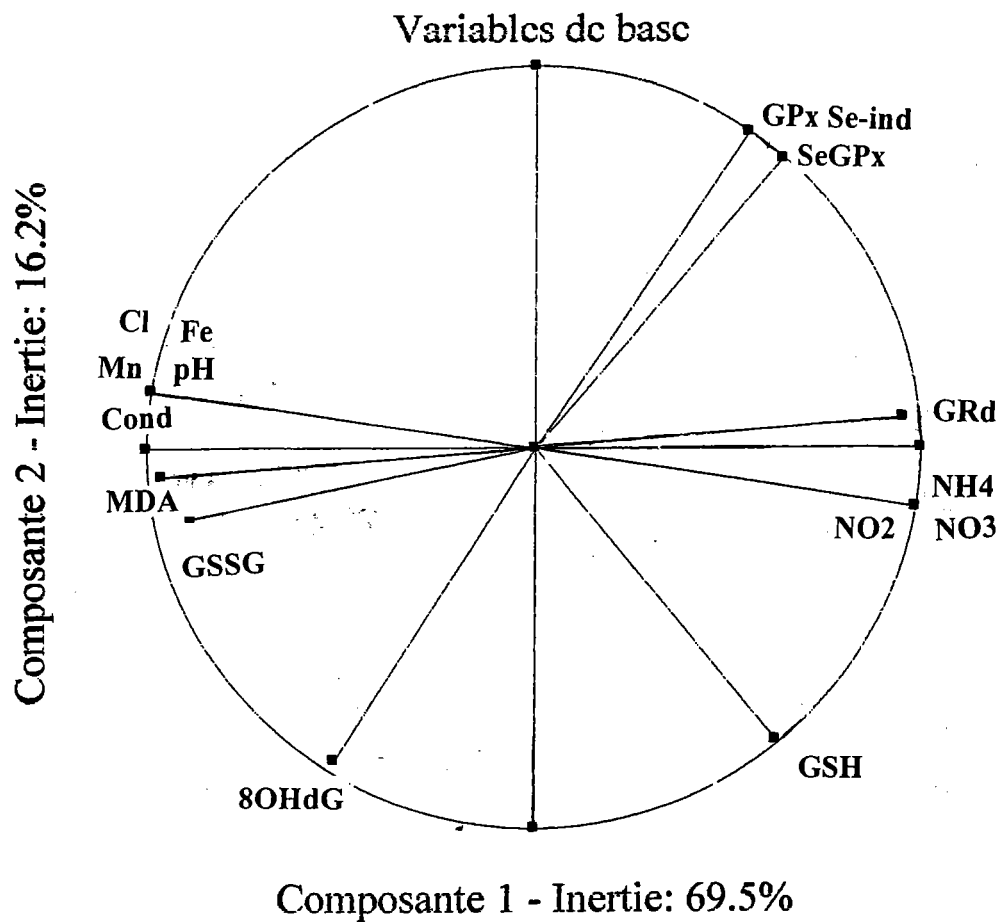


Figure 42 : Cercle des corrélations réalisé sur les données centrées réduites des stations de Roville devant Bayon et de Vandières incluant les mesures du MDA, de la 8-OHdG et des analyses physico-chimiques des deux tissus étudiés

Au cours des études des plans d'eau issus de gravières (1999-2000), les effets apparaissent d'abord au niveau des glandes digestives, et sont toujours plus intenses dans ce tissu que dans les branchies.

Le site pour lequel les effets génotoxiques sont les plus marqués est celui de Vandières où les niveaux de bases oxydées sont triplés par rapport aux organismes témoins dans les glandes digestives. Ces résultats issus de l'analyse d'un seul individu doivent être pris en considération avec précaution.

Les augmentations des concentrations de MDA dans les glandes digestives sont peut être liées à la présence de métaux dans les eaux interstitielles de Vandières. En effet, les analyses physico-chimiques ont montré la présence de fer (0,284 mg/L) et de manganèse (0,629 mg/L) au niveau de cette station excepté à l'automne 1999 où les concentrations sont proches de celles mesurées à Roville. On peut aussi rapprocher les effets de stress à une minéralisation élevée sur le site de vandières. L'ACP des résultats obtenus pour le MDA, la 8-OHdG, les paramètres antioxydants dans les organismes exposés à Roville devant Bayon et à Vandières et les teneurs en métaux des eaux interstitielles montre que le MDA est corrélé aux concentrations en fer et en manganèse (figure 42). Ces deux métaux participent aux réactions de transfert d'électrons par passage d'un état oxydé à un état réduit via la réaction de Fenton. Les espèces réactives de l'oxygène produites pourront attaquer les lipides membranaires et créer un état de stress oxydant.

La glande digestive représente le site majeur d'assimilation des métaux liés aux matières en suspension (Livingstone et Pipe, 1992 ; George et Pirie, 1980). La grande sensibilité des glandes digestives au stress oxydant provient également de la forte inhibition des paramètres antioxydants, qui est plus prononcée dans ce tissu que dans les branchies.

Au cours de l'intoxication au fer et/ou au B(a)P, les augmentations du MDA les plus significatives ont été mesurées dans les glandes digestives des individus exposés, sans doute en raison d'une assimilation préférentielle des toxiques présents dans l'eau au niveau hépatique.

- Les expérimentations en laboratoire ont mis en évidence des variations interindividuelles pour des organismes soumis aux mêmes conditions de stress.

Au cours des intoxications par le fer et/ou le B(a)P réalisées au laboratoire : un individu sur les cinq exposés au fer (40 mg/L) a vu ses taux de MDA hépatiques augmenter 2 fois plus que les quatre autres, en association avec de fortes inductions des taux de 8-OHdG branchiaux. La même observation a été faite avec le B(a)P (100 µg/L) : un organisme sur les cinq exposés a montré des taux de 8-OHdG augmentés d'un facteur 5 et 3 par rapport aux témoins pour les branchies et les glandes digestives respectivement, alors que les taux des quatre autres individus n'ont pas été fortement induits. Ces différences peuvent s'expliquer par des variations de sensibilité individuelle. Lors de l'exposition à un polluant, l'animal peut stopper toute activité et se fermer afin de limiter les échanges avec l'extérieur. Les diverses sensibilités peuvent être liées à des différences dans l'assimilation des polluants. La formation de la 8-OHdG observée a été plus ou moins augmentée chez les bivalves exposés au fer et au B(a)P. Des capacités de réparation inégales vis à vis de cette lésion oxydative pourraient expliquer ces différences. D'autres études ont mis en évidence de manière similaire une variation interindividuelle importante dans la production de 8-OHdG après exposition à divers toxiques. L'exposition *in vivo* d'*Ictalurus punctatus* au tert-butylhydroperoxyde (40 mg/Kg i.p.) montre une augmentation de la 8-OHdG dans l'ADN hépatique :

les taux de base sont de $2,67 \pm 0,67$ 8-OHdG/ 10^5 dG et augmentent pour atteindre $9,78 \pm 14,67$ 8-OHdG/ 10^5 dG après 48 heures d'exposition (Ploch *et al.*, 1999).

On note que l'écart-type est important après l'exposition ce qui montre la variabilité des réponses des individus exposés. Rodriguez-Ariza *et al.* (1999) ont montré que l'exposition *in vivo* de *S. aurata* à la dieldrine (0,6 mg/Kg i.p.) provoque une variabilité des taux de 8-OHdG dans l'ADN hépatique. Les taux de base sont de $7,2 \pm 1,6$ 8-OHdG/ 10^5 dG et passent à $19,7 \pm 9,4$ 8-OHdG/ 10^5 dG, un individu sur les 3 exposés montre des taux de l'ordre de $30,5$ 8-OHdG/ 10^5 dG après l'exposition à la dieldrine.

- *Evolution dans le temps des conditions environnementales et des réponses biologiques.*

A Roville devant Bayon, une induction de 45 % de la lipoperoxydation a été notée au niveau hépatique des bivalves exposés 3 semaines durant l'automne 1999. Dès le printemps 2000, on observe un retour à des niveaux de MDA proches de ceux des bivalves témoins sur ce site. En automne de cette même année, les teneurs en MDA sont restées identiques aux contrôles chez les individus transférés à Roville. A l'inverse, c'est à Vandières que l'on observe une intensification des effets au cours du temps. En effet, les concentrations en MDA, qui sont identiques à celles de Roville devant Bayon en 1999, augmentent en 2000 au niveau hépatique et branchial.

L'induction de la lipoperoxydation est plus marquée dans les bivalves exposés pendant 3 semaines par rapport à ceux exposés pendant 1 semaine.

Par exemple, au printemps 2000, les taux de MDA sont de $4,10 \pm 0,41$ ng/mg protéine et $4,24 \pm 1,01$ ng/mg protéine dans les glandes digestives et les branchies respectivement, après 7 jours d'exposition, et passent à $8,09 \pm 0,13$ ng/mg protéine dans les glandes digestives et $5,67 \pm 0,03$ dans les branchies après 3 semaines. Les effets sont les mêmes en automne, on observe une intensification des effets en fonction du temps d'exposition. Des modifications identiques des taux de 8-OHdG ont été notées à Vandières durant l'automne 2000. Les taux de bases de l'ADN oxydées sont plus importants après 3 semaines d'exposition par rapport aux valeurs observées dans les bivalves exposés 1 semaine.

Il aurait été intéressant de vérifier si l'induction de la lipoperoxydation et des taux de 8-OHdG aurait été maintenue voire augmentée après plus de 3 semaines d'exposition à Vandières.

Des modifications transitoires des niveaux de MDA et de 8-OHdG ont été reportées dans la littérature chez des vertébrés ou invertébrés aquatiques exposés au laboratoire à des toxiques ou à des sédiments contaminés. Il peut s'agir d'une accentuation des effets dans le temps qui traduit l'incapacité des systèmes de détoxification à surmonter les effets des facteurs de stress quand l'exposition se prolonge (Di Giulio *et al.*, 1993 ; Pedrajas *et al.*, 1995 ; Roméo et Gnassia-Barelli, 1997 ; Fatima *et al.*, 2000) ou d'une atténuation voire un retour à des niveaux de base (MDA : Livingstone *et al.*, 1990 ; Livingstone *et al.*, 1993 ; Pedrajas *et al.*, 1995 ; 8-OHdG : Nishimoto *et al.*, 1991 ; Canova *et al.*, 1998). Une diminution des effets dans le temps traduit au contraire l'adaptation des individus au stress environnemental et l'implication des systèmes de défense antioxydants qui vont limiter les attaques des biomolécules par les radicaux libres.

Existe-il une relation entre la stimulation de la lipoperoxydation et la formation de 8-OHdG?

Nous avons observé lors de nos travaux que l'exposition à des contaminants induisant une peroxydation lipidique consécutive à un stress oxydant pouvait entraîner des lésions oxydatives de l'ADN.

Les fortes inductions de la lipoperoxydation obtenues durant la campagne de printemps 2000 sur les gravières avaient justifié la mesure d'un paramètre de génotoxicité afin de comparer la réponse des biomarqueurs de toxicité (MDA et systèmes antioxydants) et de génotoxicité (8-OHdG). Une des conséquences du stress oxydant peut être l'attaque de l'ADN avec l'induction de mutations et d'adduits.

A l'automne 2000, l'induction des taux de MDA a été mesurée chez les individus encagés sur les sites de Vandières et Messein : des taux de 8-OHdG plus élevés, par rapport aux bivalves du site de référence, ont été observés sur ces 2 sites. On note une augmentation des taux de déoxyguanosine oxydée dans les deux tissus à Vandières, avec des effets plus marqués au niveau des glandes digestives où les taux de 8-OHdG sont triplés. Concernant le site de Messein, des effets significatifs sont observés seulement dans les glandes digestives : l'induction de la 8-OHdG est du même ordre de grandeur qu'à Vandières après 7 jours d'exposition ($\times 2$).

Lors de la campagne du PNETOX sur la Moselle, aucun changement n'a été mis en évidence pour les taux de MDA mesurés chez les individus encagés sur le site amont de Mitreuches. Des taux de 8-OHdG plus élevés à 7 jours, par rapport aux témoins, ont pourtant été observés au point amont ($\times 2$) avec un retour à la normale après 21 jours, ce qui témoignerait de la sensibilité de l'induction de la 8-OHdG, reflet d'une atteinte de l'ADN, indépendamment d'une cytotoxicité.

Les intoxications en laboratoire ont montré une induction de la lipoperoxydation chez les individus exposés aux contaminants par rapport aux bivalves de référence quel que soit le type de substance testée. Des taux de 8-OHdG plus élevés par rapport aux témoins ont été notés pour deux contaminants seulement (le fer à 40 mg/L et le BaP à 50 μ g/L).

Divers travaux ont suggéré que la lipoperoxydation, la génotoxicité et la cancérogénèse étaient corrélées (Halliwell et Aruoma, 1991 ; Kasai, 1997 ; Marnett, 2000). Les intermédiaires réactifs (comme les hydroperoxydes lipidiques ou les aldéhydes) formés durant les étapes de propagation et de terminaison de la lipoperoxydation peuvent réagir avec les différents composés présents dans la cellule. Ainsi, la formation de dommages à l'ADN pourrait être liée à l'induction de la peroxydation lipidique :

a) l'incubation d'ADN avec des intermédiaires réactifs issus de la lipoperoxydation induit des cassures et des mutations de l'ADN. Shi *et al.* (1995) ont indiqué que les hydroperoxydes lipidiques étaient capables de réagir avec les ions nickel en présence de glutathion *in vitro* et de causer la formation de 8-OHdG et de cassures à l'ADN.

De même, Blair (2001) a indiqué que les aldéhydes issus de la décomposition homolytique des hydroperoxydes lipidiques étaient capables de réagir avec l'ADN *in vitro* et de causer la formation d'adduits.

b) le malondialdéhyde, marqueur de la lipoperoxydation, forme des liaisons covalentes avec l'adénine et la guanine, et donne des adduits à l'ADN (Marnett, 2000).

c) la lipoperoxydation induit la formation de 8-OHdG. Dans divers systèmes isolés tels que les cellules hépatiques ou l'ADN mitochondrial, la formation de 8-OHdG a été détectée quand la lipoperoxydation a été induite. Wang et Hu (2000) ont montré une induction simultanée de la formation de 8-OHdG et de MDA dans des coupes de foie de rats après traitement *in vitro* avec des agents chimiques (le bromotrichlorométhane, le bromobenzène et le 2-nitropropane). Lu *et al.* (1999) ont démontré une augmentation significative des espèces réactives de l'oxygène, de la 8-OHdG et du malondialdéhyde dans les mitochondries provenant de l'épiderme de sujets âgés comparés à des sujets plus jeunes (<60 ans).

Une étude *in vivo* sur la toxicité du bromate de potassium (KBrO_3) a attribué la formation de 8-OHdG dans l'ADN rénal de rat à l'augmentation de la lipoperoxydation et non à un mécanisme d'activation du KBrO_3 médié par le glutathion, car cette lésion de l'ADN n'apparaissait qu'avec l'augmentation de malondialdéhyde (Chipman *et al.*, 1998). Liu *et al.* (1999) ont reporté que la lipoperoxydation est stimulée après le traitement de rats par le saffrole, un hépatocarcinogène inducteur de la 8-OHdG. L'exposition d'hépatocytes de rats à 0,4 mM de *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP), un agent oxydant type inducteur de la lipoperoxydation, stimule la formation de 8-OHdG, de MDA et l'apoptose (Haidara *et al.*, 2002).

Ces travaux ont clairement indiqué le potentiel de la lipoperoxydation à altérer l'ADN avec la production d'adduits, de cassures et de mutations. La majorité de ces dommages semble provenir des produits de la décomposition des hydroperoxydes lipidiques (Blair, 2001).

Les travaux de Zastawny *et al.* (1995) ont montré que le nombre de résidus 8-OHdG formés dans des cellules de rongeurs exposées à des concentrations croissantes de fer ferreux (10 à 1000 μM) était dépendant de la concentration en ions métalliques. Ce traitement des cellules par le fer induisait la formation des hydroperoxydes lipidiques et augmentait la perméabilité membranaire. Ceci implique que les dommages oxydatifs à l'ADN soient un résultat de la lipoperoxydation. Les radicaux peroxy et alkoxy, qui sont générés lors de la réaction des ions métalliques (fer ou cuivre) avec les hydroperoxydes lipidiques, sont incapables d'atteindre l'ADN nucléaire même s'il sont formés à partir de la membrane nucléaire (Cheeseman, 1993). D'autres produits issus de la lipoperoxydation tels que les composés carbonyles, sont capables de diffuser dans la cellule et de se combiner avec les groupes amino-nucléophiles des bases de l'ADN (Cheeseman, 1993). Les hydroxyalkénals, comme le 4-hydroxynonéal (4-HNE), sont des composés très électrophiles et des mutagènes connus (Karlhuber *et al.*, 1997).

Cependant, de nombreux exemples issus de la littérature montrent que la relation entre la lipoperoxydation et la formation de la 8-OHdG n'est pas encore établie. Nous avons montré, lors de nos travaux, que ces deux paramètres biologiques ne sont pas nécessairement dépendants l'un de l'autre : c'est le cas à les Mitreuches après 7 jours d'exposition. Ainsi, bien que l'induction de la lipoperoxydation par le *tert*-butylhydroperoxyde a été rapportée dans les hépatocytes de rats (Haidara *et al.*, 2002), aucune modification des taux de 8-OHdG n'a été mise en évidence dans l'ADN hépatique après deux heures d'exposition des cellules au toxique (Latour *et al.*, 1995). Shih et Hu (1999) ont conclu que les lésions à l'ADN n'étaient pas nécessairement le résultat de la lipoperoxydation des membranes cellulaires : cette étude montre que la formation de dommages oxydants dans des cellules hépatiques de rats par les UVA est stimulée par la présence de fer.

Sites	Paramètres	Gd			Br		
		1999	2000p	2000a	1999	2000p	2000a
Mitreuches	SeGPx	=	=	=	=	=	=
	GPx Se-ind	=	=	=	=	=	=
	GRd	=	=	=	=	=	=
	GSH	=	=	=	=	=	=
	GSSG	=	=	=	=	=	=
Eloyes	SeGPx	=	=	=	=	=	=
	GPx Se-ind	=	=	=	=	=	=
	GRd	=	=	=	=	=	=
	GSH	=	=	=	=	=	=
	GSSG	=	=	=	=	=	=
Archettes	SeGPx	=	=	=	=	=	=
	GPx Se-ind	=	=	=	=	=	=
	GRd	=	=	=	=	=	=
	GSH	=	=	=	=	=	=
	GSSG	=	=	=	=	=	=
Igney	SeGPx	↓	=	=	↓	=	=
	GPx Se-ind	=	=	=	=	=	=
	GRd	↓	=	=	↓	=	=
	GSH	=	=	=	=	=	=
	GSSG	=	=	=	=	=	=
Velle sur Moselle	SeGPx	↓↓	↑	=	↓↓	↑	=
	GPx Se-ind	↑	=	=	↑	=	=
	GRd	↓↓	=	=	↓↓	=	=
	GSH	↓	=	=	↓	=	=
	GSSG	↑	=	=	↑	=	=
Roville dt Bayon	SeGPx	=	=	=	=	=	=
	GPx Se-ind	=	=	=	=	=	=
	GRd	=	↓	=	=	=	=
	GSH	=	=	=	=	=	=
	GSSG	=	=	=	=	=	=
Vandières	SeGPx	=	↓	↓	=	↓	↓
	GPx Se-ind	=	↓	↓	=	↓	↓
	GRd	=	↓↓	↓↓	=	↓↓	↓↓
	GSH	=	↓	↓	=	↓	↓
	GSSG	=	↑	↑	=	↑	↑
Corny	SeGPx	=	=	=	=	=	=
	GPx Se-ind	=	=	=	=	=	=
	GRd	=	=	↓	=	=	↓
	GSH	=	=	↓	=	=	↓
	GSSG	=	=	=	=	=	=
Messein	SeGPx	=	=	↓	=	=	↓
	GPx Se-ind	=	=	↓	=	=	↓
	GRd	=	=	↓↓	=	=	↓↓
	GSH	=	=	↓	=	=	↓
	GSSG	=	=	↑	=	=	=

Tableau XXIV: Modifications des paramètres antioxydants enregistrés chez les bivalves transférés au sein des divers sites contaminés.

2000p : printemps 2000 ; 2000a : automne 2000

= non significativement différent du témoin

↑ augmentation significative par rapport au témoin (≤ 30%)

↓ diminution significative par rapport au témoin (≤ 30%)

↓↓ diminution significative par rapport au témoin (> 50%)

La formation de 8-OHdG ne provient pas de l'irradiation des cellules mais est issue de la liaison du fer ferreux avec l'ADN. De plus, l'induction des dommages à l'ADN ne dépend pas de la lipoperoxydation car la présence de piègeurs de radicaux (hydroxytoluène butylé et diphénylamine) inhibe la peroxydation lipidique mais non la formation de 8-OHdG. Les travaux de Klaunig *et al.* (1995) ont indiqué des profils différents de courbes dose-réponse obtenues pour le MDA et la 8-OHdG après exposition chronique de rats et de souris à des doses croissantes de dieldrine, un composé organochloré, et ont suggéré que ces deux paramètres étaient générés par des mécanismes différents.

La mesure de la lipoperoxydation est importante non seulement à cause de la corrélation entre le stress oxydant et l'induction de l'oxydation des lipides membranaires mais également pour son implication dans d'autres mécanismes tels que les dommages à l'ADN (Blair, 2001).

Bien que, la réaction des peroxydes lipidiques avec l'ADN ainsi que la formation de 8-OHdG ont été rapportés, la discrimination entre les dommages à l'ADN issus de l'action directe des radicaux libres ou des produits de la peroxydation lipidique reste difficile.

Les résultats de nos études et les exemples rapportés de la littérature montrent que la formation de la 8-OHdG n'est pas nécessairement une conséquence directe de la lipoperoxydation.

Existe-il une relation entre les stimulations de la lipoperoxydation et de la 8-OHdG et les variations des systèmes antioxydants ?

Les résultats obtenus lors des études de terrain mettent en évidence la relation entre le degré de déplétion des systèmes antioxydants, mesurés chez les organismes exposés, et l'augmentation de la lipoperoxydation (tableau XXIV).

Il apparaît que l'activité de la glutathion réductase (GRd) et les taux de glutathion réduit (GSH) doivent être particulièrement diminués pour que la lipoperoxydation soit stimulée. Dans le site de Vandières, les déplétions ont atteint 62 % et 40 % respectivement pour la GRd et le GSH dans les deux tissus lors de la campagne de printemps 2000. De même, pour le site de Messein, l'activité la GRd et les taux de GSH ont diminué de 50 % et de 30 % par rapport aux valeurs des contrôles dans les glandes digestives des organismes transférés. Pour l'ensemble des sites étudiés, on note que l'activité de la GRd était très diminuée lorsque les taux de MDA ont augmenté. On observe une déplétion moins intense des taux de GSH comparés aux témoins mais, la chute du contenu en GSH est associée au phénomène de lipoperoxydation, cet effet se confirme dans les sites de Velle sur Moselle, Corny, Vandières et Messein.

Bien que la diminution de l'activité glutathion peroxydase sélénium-indépendante ait atteint 50 % lorsque la lipoperoxydation était stimulée, cette enzyme ne semble pas aussi déterminante dans le développement de ce processus destructif. Dans les glandes digestives des bivalves encagés à Roville et à Vandières notamment (campagne d'automne 1999), l'activité de cette enzyme n'a pas été modifiée malgré une augmentation de plus de 30 % du malonaldéhyde par rapport aux contrôles.

L'inhibition de l'activité glutathion réductase a pour conséquence une diminution des capacités de détoxication cellulaire, puisque le glutathion réduit, forme active, sera plus difficilement régénéré à partir de sa forme oxydée.

L'augmentation du taux de malondialdéhyde qui traduit la peroxydation des lipides membranaires et la toxicité cellulaire, s'est révélée être associée à l'inhibition de la GRd qui peut effectivement être à l'origine de la dégradation membranaire. Les concentrations en glutathion réduit et l'activité des glutathion peroxydases ont été diminués lorsque la dégradation du milieu était plus marquée.

La baisse des systèmes antioxydant n'est pas suffisante pour induire les augmentations des taux de MDA. Cependant, les résultats de nos études montrent que la déplétion des activités de la GRd et des GPx et la chute des taux de GSH ont une incidence sur la lipoperoxydation.

Les GPx vont catalyser la détoxification des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène. La GRd assure le maintien du glutathion sous sa forme réduite active. Le GSH est un piègeur des espèces réactives de l'oxygène qui limite les dommages cellulaires. La réduction des activités antioxydantes engendre des cascades de réactions des radicaux libres et une accumulation des peroxydes, des hydroperoxydes et d'autres espèces réactives.

Les résultats des études *in situ* montrent que les augmentations des taux de 8-OHdG dans les organismes transférés s'accompagnent d'une déplétion des systèmes antioxydants. En effet, l'analyse des organismes issus des sites de Velle sur Moselle montre l'induction des dommages à l'ADN (80%) alors que les activités sont réduites de 50% et 30% respectivement pour les GPx et la GRd d'une part, et le contenu en GSH d'autre part.

De même, lors des campagnes concernant les gravières, les taux de 8-OHdG ont triplé dans les glandes digestives des bivalves exposés à Vandières et on observe la diminution de 30% des GPx et du GSH et de 50% pour la GRd.

Cependant, les données concernant la station amont des Mitreuches lors de la campagne du PNETOX montrent des taux de 8-OHdG doublés après 7 jours, par rapport aux contrôles, alors que les paramètres antioxydants n'ont pas été perturbés. A Roville devant Bayon, on note l'augmentation de 70% des taux de 8-OHdG dans les glandes digestives, après 21 jours d'exposition, alors que les niveaux étaient identiques à ceux des témoins après 7 jours d'exposition. Aucune modification des systèmes antioxydants n'est observée sur ce site quel que soit la durée d'exposition. Ces remarques pourraient nous laisser penser que la formation de la 8-OHdG serait plus précoce et plus spécifique que la stimulation de la lipoperoxydation d'un stress oxydatif induit par des génotoxiques. L'augmentation des taux de 8-OHdG à les Mitreuches après 7 jours d'exposition sont corrélés avec la pollution par les HAPs des sédiments. Le retour rapide à la normale laisserait supposer une activité de réparation efficace de ces lésions à l'ADN. Des études *in situ* supplémentaires seraient nécessaires afin de confirmer cette tendance et de mieux connaître les réponses de ce marqueur de génotoxicité en fonction de différents profils de pollution. Il est important de pouvoir estimer le degré de réversibilité de la production accrue de la 8-OHdG en prolongeant les durées d'exposition.

Importance des systèmes de réparation des lésions à l'ADN

Les résidus de 8-OHdG sont mutagènes : ils induisent des mésappariements pendant la synthèse d'ADN *in vitro* (Cheng *et al.*, 1992), elle représente un risque cancérigène si elle n'est pas éliminée. Les études de Nishimoto *et al.* (1991) ont montré que la 8-OHdG était rapidement réparée (5 jours après exposition) avec un retour aux valeurs contrôles dans l'ADN hépatique de *Parophrys vetulus* après une exposition intramusculaire à des doses de 0,1-10 mg nitrofurantoïne/Kg.

De même, Canova *et al.* (1998) ont observé une diminution rapide des taux de 8-OHdG dans l'ADN branchial et hépatique de bivalves marins (*M. galloprovincialis*) après 72 heures d'exposition au B(a)P (0,5 à 100 ppb). Les effets génotoxiques du paraquat chez *S. aurata* sont temporaires : on note une augmentation des taux de 8-OHdG après 8 et 24 heures d'exposition, mais les taux baissent pour atteindre des valeurs de base après 48 heures (Rodriguez-Ariza *et al.*, 1999). La stimulation de la production de la 8-OHdG observée chez les bivalves transférés à les Mitreuches était transitoire. En effet, après 21 jours d'exposition, les taux de 8-OHdG sont retournés à des valeurs contrôles. Afin de confirmer si l'augmentation de la formation de 8-OHdG est consécutive à un stress oxydant dans les cellules vivantes, il serait judicieux de mesurer les capacités de réparation de cette lésion. Kasai (1997) a montré que l'activité de réparation de la 8-OHdG augmentait lors du stress oxydant cellulaire. Il serait donc intéressant d'ajouter la mesure des systèmes de réparation de la 8-OHdG lors de futures études *in situ*.

Est-ce que la 8-OHdG est représentative d'autres lésions structurales et fonctionnelles de l'ADN ?

Lors de la campagne d'automne 2000 et au cours des expérimentations en laboratoire, un paramètre supplémentaire de génotoxicité a été ajouté aux autres paramètres biologiques. Nous souhaitons étudier la capacité des taux de 8-OHdG à prédire d'autres types de lésions structurales de l'ADN telles que les cassures de l'ADN.

Les résultats de la campagne d'automne montrent une augmentation importante des niveaux de 8-OHdG à Vandières comparés aux témoins : aucune modification significative des niveaux de cassures à l'ADN n'a été observée dans l'hémolymphe des bivalves provenant de cette station quelle que soit la durée d'exposition. A Messein, on observe les augmentations significatives des taux de 8-OHdG et des cassures à l'ADN comparés aux témoins. Le test des Comètes montre des hausses significatives des cassures dans l'ADN provenant de l'hémolymphe des bivalves de Corny : les taux de 8-OHdG sont augmentés dans les glandes digestives après 21 jours d'exposition seulement. A la suite de cette campagne, on note que globalement l'induction de la 8-OHdG est le reflet d'autres lésions structurales comme les coupures à l'ADN.

Durant les expérimentations en laboratoire, on note que les cassures à l'ADN dans les glandes digestives sont plus marquées en présence de B(a)P seul et en mélange alors qu'on observe des hausses de la formation de 8-OHdG avec le fer seul (40 mg/L) et avec le B(a)P seul (50 µg/L). Dans les branchies, les résultats montrent une faible induction des cassures à l'ADN, seul le mélange fer2/BaP1 a un effet significatif.

Le B(a)P qui est un agent mutagène a des effets génotoxiques chez les moules traitées ; on note une augmentation des taux de 8-OHdG et des cassures à l'ADN. Par contre, le fer n'induit que la formation de 8-OHdG, aucune hausse significative des cassures n'est visible. Il aurait été intéressant de prolonger la durée de l'exposition afin d'observer si on a une amplification des effets génotoxiques ou bien une réversibilité avec un retour à des niveaux de base. Les résultats de l'exposition au fer montrent que la stimulation de la formation de la 8-OHdG serait plus précoce que l'induction de cassures à l'ADN.

En effet, des taux de 8-OHdG plus élevés par rapport aux contrôles ont été obtenus, bien qu'il n'y avait pas de signe d'autres lésions de l'ADN.

Toyokuni et Sagripanti (1996) ont étudié l'association entre la formation de 8-OHdG et de cassures à l'ADN induites par les ions ferriques et cuivriques dans l'ADN bactérien. Ils ont montré que le nombre de cassures simple brin produites était lié linéairement au nombre de résidus 8-OHdG présents ; cette relation est exprimée par l'équation :

$$[\text{cassures simple brin}] = b \times [8\text{-OHdG}]$$

où $b = 1,7$; 2 ; 2 ; 7 ; et $9,4$ pour le cuivre en présence d'agents réducteurs tels que le peroxyde d'hydrogène, la L-cystéine et le L-ascorbate et pour le fer en présence de peroxyde d'hydrogène et de L-ascorbate, respectivement, avec un taux de cassure beaucoup plus importante que les lésions oxydatives pour le fer associé au peroxyde d'hydrogène et de L-ascorbate.

La corrélation linéaire observée entre la production de cassures à l'ADN et de 8-OHdG médiatée par des métaux de transition suggère que ces altérations résultent d'un mécanisme chimique commun. De même, les travaux de Lloyd et Phillips (1999) sur l'ADN issu du sperme de saumon traité par du cuivre ($250 \mu\text{M}$), du fer ($150 \mu\text{M}$) ou du nickel (5mM) ont suggéré l'existence d'un mécanisme similaire régissant la formation de 8-OHdG et de cassures à l'ADN. Mikhailova *et al.* (1997) ont démontré que l'exposition de cellules lymphoblastoïdes à des concentrations inférieures à $50 \mu\text{M}$ de cadmium induisait des augmentations des taux de 8-OHdG et des cassures à l'ADN, ce qui indique que les sites de formation de la 8-OHdG semblent corrélés avec les sites générant des cassures du brin d'ADN. De plus, les auteurs précisent qu'avec des concentrations supérieures à $50 \mu\text{M}$ de Cd, les deux paramètres ne sont plus corrélés, suggérant que des concentrations élevées en métaux peuvent saturer les sites de formation de la 8-OHdG et déstabiliser l'ADN. D'autres facteurs tels que l'induction des systèmes de réparation, l'effet d'autres éléments comme le zinc ou le magnésium, ou les activités des systèmes antioxydants, stimulés par les fortes concentrations en ions métalliques ne sont pas à exclure.

Des études supplémentaires seraient essentielles pour confirmer cette tendance et pour mieux connaître les réponses de ces marqueurs de génotoxicité en fonction de diverses contaminations. Concernant les intoxications en laboratoire, comme le suggère l'étude de Mikhailova *et al.* (1997), les concentrations en fer étaient trop élevées, il faudrait renouveler l'expérience en diminuant les concentrations en fer.

Nous avons montré que les informations fournies par la lipoperoxydation, la formation de la 8-OHdG et les réponses des paramètres antioxydants sont plus complémentaires qu'elles ne sont redondantes. Les exemples rapportés de la littérature montrent que la formation de la 8-OHdG n'est pas nécessairement une conséquence directe de la lipoperoxydation. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour conclure sur les relations entre la lipoperoxydation et la formation de 8-OHdG. L'analyse des indicateurs de génotoxicité est indispensable car les indicateurs de toxicité cellulaire comme la mesure du MDA ou des systèmes antioxydants telles qu'effectuée dans ce travail, ne sont pas suffisantes à elles seules pour informer sur les effets biologiques des contaminants. La 8-OHdG est un bon marqueur de génotoxicité, elle est représentative d'autres lésions structurales comme les cassures à l'ADN.

CONCLUSION

Les études, réalisées en laboratoire et sur le terrain ont montré que le malondialdéhyde et la 8-OHdG se révèlent être des indicateurs intéressants, capables de traduire les effets cytotoxiques et génotoxiques de substances chimiques et de sédiments contaminés par des HAP et des métaux. Ce travail confirme la nécessité de mettre en œuvre une approche biologique pour évaluer l'impact des activités anthropiques sur les écosystèmes. Les analyses physico-chimiques des milieux et le dosage des contaminants dans les compartiments des systèmes aquatiques, bien que nécessaires au plan réglementaire, ne suffisent pas à prévoir les effets biologiques sur les espèces vivantes. Le peu d'adéquation entre les profils de contamination et l'intensité des réponses biologiques relevées au cours des analyses des stations situées sur la Haute Moselle en est une preuve supplémentaire. Cette disjonction entre les analyses chimiques et biologiques peut provenir de la biodisponibilité des polluants présents, il aurait été intéressant de doser les concentrations des toxiques dans les tissus des bivalves exposés.

Le suivi de la 8-OHdG a indiqué que l'induction de la lipoperoxydation et la stimulation de l'hydroxylation en C8 de la guanine peuvent se développer de manière dépendante, cependant nous n'avons pas pu démontrer de manière générale cette hypothèse. La stimulation de l'hydroxylation en C8 de la guanine pourrait être consécutive à la lipoperoxydation, mais elle pourrait avoir lieu indépendamment de la lipoperoxydation, lors d'une exposition à des agents génotoxiques. Bien que, la réaction des peroxydes lipidiques avec l'ADN ainsi que la formation de 8-OHdG aient été rapportées dans la littérature, la discrimination entre les dommages à l'ADN issus de l'action directe des radicaux libres ou des produits de la peroxydation lipidique reste difficile. D'autres études seraient nécessaires afin de mieux comprendre les relations entre la formation de la 8-OHdG et le développement de la peroxydation lipidique.

La 8-OHdG est un bon marqueur de génotoxicité, elle est représentative d'autres lésions structurales. Nos études ont montré l'existence d'une corrélation entre la formation de la 8-OHdG et les cassures à l'ADN, ce qui suggère que ces altérations pourraient résulter d'un mécanisme chimique commun.

L'évaluation simultanée des paramètres antioxydants chez les bivalves intoxiqués a montré que la déplétion des activités antioxydantes a une incidence sur la lipoperoxydation. Les perturbations des systèmes antioxydants ne sont pas des conditions suffisantes pour induire les augmentations des taux de 8-OHdG. La réduction des activités antioxydantes dans la cellule va engendrer des cascades de réactions des radicaux libres et une accumulation des peroxydes, des hydroperoxydes et d'autres espèces réactives. Des inductions de la lipoperoxydation comme celles observées dans les stations de Vandières et de Messein peuvent laisser présager des répercussions au niveau des populations. De même, l'augmentation de la 8-OHdG en raison de son caractère mutagène représente un risque potentiel pour l'intégrité génétique si elle n'est pas réparée. Afin de confirmer si l'augmentation de la formation de 8-OHdG est consécutive à un stress oxydant dans les cellules vivantes, il serait judicieux de mesurer les capacités de réparation de cette lésion. Il serait donc intéressant d'ajouter la mesure des systèmes de réparation de la 8-OHdG lors de futures études *in situ* et de connaître les capacités de réparation de cette lésion chez *Unio tumidus* afin d'estimer sa validité en tant qu'indicateur d'effets génotoxiques.

Les études, menées sur le terrain ou en conditions contrôlées, ont mis en évidence des différences de sensibilité selon l'organe considéré.

En fonction des profils de contamination, les effets apparaissent d'abord au niveau des glandes digestives, et sont en effet toujours plus intenses que dans les branchies.

Ces résultats soulignent l'importance de doser simultanément les paramètres étudiés dans les deux tissus car les informations fournies peuvent différer. Il serait intéressant d'utiliser un autre tissu lors des expérimentations afin de comprendre les mécanismes d'action des attaques radicalaires dans les organismes vivants. Des différences interindividuelles marquées ont été notées à la fois pour les taux de MDA et les niveaux de 8-OHdG chez les bivalves exposés à des conditions de stress identique. Ces différences intra-espèce peuvent s'expliquer par le fait que la réaction de chaque animal face à un polluant chimique va pouvoir se diversifier. Il aurait fallu augmenter le nombre d'organismes analysés afin de mieux apprécier les changements observés entre les différents groupes d'individus.

Au cours de ces dernières années, le biomonitoring environnemental s'est enrichi des approches écotoxicologiques appliquées à la préservation des milieux naturels. La connaissance des mécanismes d'action des polluants au niveau biologique a ouvert la voie au développement des biomarqueurs, qui figurent parmi les outils prometteurs du diagnostic environnemental. Ces nouveaux outils, caractérisés par leur sensibilité et leur réponse précoce, sont les compléments des études écologiques, utilisées de longue date pour l'analyse des populations animales et végétales au sein des écosystèmes.

Les résultats obtenus valident l'utilisation du MDA et de la 8-OHdG en tant que biomarqueurs de toxicité, éléments prospectifs et prédictifs de la qualité des systèmes hydriques sur le long terme. Nous avons montré que les informations fournies par la lipoperoxydation, la formation de la 8-OHdG et les réponses des paramètres antioxydants sont plus complémentaires qu'elles ne sont redondantes. Les exemples rapportés de la littérature montrent que la formation de la 8-OHdG n'est pas nécessairement une conséquence directe de la lipoperoxydation. L'analyse des indicateurs de génotoxicité est indispensable car les indicateurs de toxicité cellulaire comme la mesure du MDA ou des systèmes antioxydants telles qu'effectuée dans ce travail, ne sont pas suffisantes à elles seules pour informer sur les effets biologiques des contaminants.

Il est certain que des études complémentaires sur d'autres sites, caractérisés par des typologies et des intensités de perturbations différentes, sont nécessaires pour préciser notre démarche. L'ajout de nouveaux paramètres biologiques comme la mesure des systèmes de réparation des lésions à l'ADN semble être indispensable afin de confirmer si l'augmentation de la formation de 8-OHdG est consécutive à un stress oxydant. De même, les durées d'exposition devrait être plus longues afin de percevoir la réversibilité ou non des effets dans les organismes exposés. Il est important de pouvoir estimer le degré de réparation de la 8-OHdG dans le temps.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdi S. et Ali A., 1999, Role of ROS modified human DNA in the pathogenesis and etiology of cancer, *Cancer lett*, **142**, 1-9.
- Abele D., Burlando B., Viarengo A. et Portner H.O., 1998, Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*, *Comp Biochem Physiol Part B*, **120**, 425-435.
- Accomando R., Viarengo A., Moore M.N. et Marchi B., 1999, Effects of ageing on nuclear DNA integrity and metabolism in mussel cells (*Mytilus edulis* L.), *Int J Biochem Cell Bio*, **31**, 443-450.
- Adachi S., Zeisig M. Et Moller L., 1995, Improvements in the analytical method for 8-OHdG in nuclear DNA, *Carcinogenesis*, **16**, 253-258.
- Agar E., Bosnak M., Amanvermez R., Demir S., Ayyildiz M. et Celik C., 1999, The effect of ethanol on lipid peroxidation and glutathione level in the brain stem of rat, *Neuro Report*, **10**, 1799-1801.
- Ahmad I., Hamid T., Fatima M., Chand H.S., Jain S.K., Athar M. et Raisuddin S., 2000, Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish is a biomarker of paper mill effluent exposure, *Biochim Biophys Acta*, **1519**, 37-48.
- Akbulut G. K., Gonul B. et Akbulut H., 1998, Differential effects of pharmacological doses of melatonin on malondialdehyde et glutathione levels in young and old rats, *Gerontology*, **45**, 67-71.
- Akerboom T.P.M. et Sies H., 1990, Glutathione transport and its significance in oxidative stress, in *Glutathione: metabolism and physiological functions*, Vina J. (eds), 45-54, CRC Press Publisher, Boston.
- Almar M., Otero L., Santos C. et Gallego J.G., 1998, Liver glutathione content and glutathione-dependent enzymes of two species of freshwater fish as bioindicators of chemical pollution, *J Environ Sci Health*, **33** (6), 769-783.
- Altman S A., Zastawny T H., Randers L., Lin Z, Lumpkin J A., Remacle J., Dizdaroglu M. et Rao G., 1994, tert.-butyl hydroperoxide-mediated DNA base damage in cultured mammalian cells, *Mutat Res*, **306**, 35-44.
- Amador F.C., Santos M.S. et Oliveira C.R., 1999, Lipid peroxidation facilitates aluminium accumulation in rat brain synaptosomes, *J Toxicol Environ Health, Part A*, **58**, 427-435.
- Ames B N, Cathcart R, Schwiers E et Hochstein P, 1981, Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis, *Proc Natl Acad Sci USA*, **78**(11), 6858-6862.
- Ames B N., 1988, Measuring oxidative damage in humans: relation to cancer and ageing, *IARC Scientific Publications*, **89**, 407-416.
- Andersen L F., Solvoll K. et Drevon C A., 1996, Very-long-chain n-3 fatty acids as biomarkers for intake of fish and n-3 fatty acid concentrates, *Am J Clin Nutr*, **64**, 305-311

- Aruoma O I., Halliwell B., Gajewski E. et Dizdaroglu M., 1989a, Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates, *J Biol Chem*, **264** (34), 20509-20512.
- Aruoma O I., Halliwell B. et Dizdaroglu M., 1989b, Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase, *J Biol Chem*, **264** (22), 13024-13028.
- Avery E L., Dunstan R H. et Nell J A., 1996, The detection of pollutant impact in marine environments: condition index, oxidative DNA damage, and their associations with metal bioaccumulation in the Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis*, *Arch Environ Contam Toxicol*, **31**, 192-198.
- Babior B.M., 1978, Oxygen dependent microbial killing by phagocytes, *N Engl J Med*, **298**, 659-721.
- Baeza-Squiban A., Delcher L., Kukreti R., Joly A.C., Guennou C., Houcine O. et Marano F., 2000, Responses of the rabbit tracheal epithelium *in vitro* to H₂O₂-induced oxidative stress, *Toxicol in vitro*, **14**, 159-167.
- Barceloux D.G., 1999, Nickel, *Clin Toxicol*, **37** (2), 239-258.
- Bartoli C.G., Simontacchi M., Tambussi E., Beltrano J., Montaldi E. et Puntarulo S., 1999, Drought and watering-dependent oxidative stress : effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. Leaves, *J Exp Bot*, **50** (332), 375-383.
- Baschir S., Harris G., Denman M.A., Blake D.R. et Winyard P.G., 1993, Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases, *Ann Rheum dis*, **52**, 659-666.
- Bast A., Haenen G., Van der Berg R. et Van der Berg H., 1998, Antioxidant effects of carotenoids, *Interna. J. Vit. Nutr. Res.*, **68**, 399-403.
- Beckman K.B., Saljoughi S., Mashiyama S.T. et Ames B.N., 2000, A simpler, more robust method for the anlysis of 8-oxoguanine in DNA, *Free Radic Biol Med*, **29**, 357-367.
- Belleville-Nabet F., 1995, Introduction au thème des radicaux libres, *Annales médicales de Nancy*, tome XXXIV (2), 53-55.
- Behrens W A. et Madere R., 1991, Malonaldehyde determination in tissues and biological fluids by ion-pairing high-performance liquid chromatography, *Lipids*, **26** (3), 232-236
- Biaglow J.E. et Kachur A.V., 1997, The generation of hydroxyl radicals in the reaction of molecular oxygen with polyphosphate complexes of ferrous ion, *Radiat Res*, **148**, 181-187.
- Bianchi G., Marchesini G., Fabbri A., Ronchi M., Chianese R. et Grossi G., 1997, Lipoperoxide plasma levels in patients with liver cirrhosis, *Hepatogastroenterology*, **44**, 784-788.
- Blair I.A., 2001, Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage, *Exp Gerontol*, **36**, 1473-1481.

- Boiteux S. et Radicella J.P., 1999, Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress, *Biochimie*, **81**, 59-67.
- Borek C., 1997, Antioxidants and cancer, *Sci Med*, nov/dec, 52-61.
- Bradford M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Breimer L.H., 1991, Repair of DNA damage induced by reactive oxygen species, *Free Radic Res Commun*, **14**, 159-171.
- Buege J.A. et Aust S.D., 1978, Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol*, **52**, 302-310.
- Bulat P., Dujjié I., Potkonjak B. et Vidaković A., 1998, Activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in workers occupationally exposed to mercury, *Int Arch Occup Environmental Health*, **71**, 37-39.
- Burney S., Niles J.C., Dedon P.C. et Tannenbaum S.R., 1999, DNA damage in deoxynucleosides and oligonucleotides treated with peroxyntirite, *Chem Res Toxicol*, **12** (6), 513-520.
- Cadet J., D'Ham C., Douki T., Pouget J.P., Ravanat J.L. et Sauvaigo S., 1998, Facts and artefacts in the measurement of oxidative base damage to DNA, *Free Radic Res*, **29**, 541-550.
- Cadenas E., 1989, Biochemistry of oxygen toxicity, *Annu Rev Biochem*, **58**, 79-110.
- Canova S., Degan P., Peters L.D., Livingstone D.R., Voltan R. et Venier P., 1998, Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne (B(a)P, *Mutat Res*, **399**, 17-30.
- Cardoso S.M., Pereira C. et Oliveira C.R., 1999, Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress, *Free Radic Biol Med*, **26** (1/2), 3-13.
- Castilho R.F., Meinicke A.R., Vercesi A.E. et Hermes-Lima M., 1999, Role of Fe(III) in Fe(II)citrate-mediated peroxidation of mitochondrial membrane lipids, *Mol Cell Biochem*, **196**, 163-168.
- Chanock S J, Faust L R, Barrett D, Bizal C, Maly F E, Newburger P E, Ruedi J M, Smith R M et Babior B M, 1992, O₂- production by B lymphocytes lacking the respiratory burst oxidase subunit p47phox after transfection with an expression vector containing a p47phox cDNA, *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 10174-10177.
- Chatterjee P.K., Cuzzocrea S., Brown P., Zacharowski K., Stewart K.N., Mota-Filipe H. et Thiernemann C., 2000, Tempol, a membrane permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat, *Kidney Int*, **58**, 658-673.
- Cheeseman H., 1993, Lipid peroxydation and cancer, *DNA and free radicals*, Halliwell B. et Aruoma O.I. (ed.), Ellis Horwood Limited, England, 109-144.

- Chen C.Y., Sheu J.Y. et Lin T.H., 1999, Oxidative effects of nickel on bone marrow and blood of rats, *J Toxicol Environ Health A*, **58**, 475-483.
- Cheng K C., Cahill D S., Kasai H., Nishimura S et Loeb L A., 1992, 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions, *J Biol Chem*, **267** (1), 166-172.
- Cheung C. C. C., Zheng G. J., Li B.J., Richardson B. J., Lam P.K.S., 2001, Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*, *Aquat Toxicol*, **52**, 189-203.
- Chien L.T. et Hwang D.F., 2001, Effects of thermal stress and vitamin C on lipid peroxidation and fatty acid composition in the liver of thornfish *Terapon jarbua*, *Comp Biochem Physiol B*, **128**, 91-97.
- Ching E W., Siu W H., Lam P K., Xu L., Zhang Y., Richardson B J. et Wu R S., 2001, DNA adduct formation and DNA strand breaks in green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to benzo[a]pyrene: dose- and time-dependent relationships, *Mar Pollut Bull*, **42**, 603-610
- Chipman J.K., Davies J.E., Parsons J.L., Nair J., O'Neill G. et Fawell J.K., 1998, DNA oxidation by potassium bromate; a direct mechanism or linked to lipid peroxidation, *Toxicology*, **126**, 93-102.
- Chung H.Y., Yokozawa T., Kim M.S., Hee Lee K., Kim K.W., Yang R. et Choi J.H., 2000, The mechanism of nitric oxide and/or superoxide cytotoxicity in endothelial cells, *Exp Toxic Pathol*, **52**, 227-233.
- Cighetti G., Debiassi S., Paroni R. et Allevi P., 1999, Free and total malondialdehyde assessment in biological matrices by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: What is needed for an accurate detection, *Anal Biochem*, **266**, 222-229.
- Claeson K., Thorsen G. et Karlberg B., 2001, Methyl malondialdehyde as an internal standard for the determination of malondialdehyde, *J Chromatogr B*, **751**, 315-323.
- ~~Claycamp H.G., 1992, Phenol sensitisation of DNA to subsequent oxidative damage in 8-hydroxyguanine assays, *Carcinogenesis*, **13**, 1289-1292.~~
- Collins A.R., Dusinska M., Gedik C.M. et Stetina R., 1996, Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker?, *Environ Health Perspect*, **104** (3), 465-469.
- Connors D.E. et Ringwood A.H., 2000, Effects of GSH depletion on copper cytotoxicity in oysters, *Aquat Toxicol*, **50**, 341-349.
- Cordis G.A., Maulik G., Bagchi D., Riedel W. et Das D.K., 1998, Detection of oxidative DNA damage to ischemic reperfused rat hearts by 8-hydroxydeoxyguanosine formation, *J Mol Cell Cardiol*, **30**, 1939-1944.
- Cossu C., 1996, Activités des systèmes antioxydants chez *Unio tumidus*, bivalve dulçaquicole en conditions physiologiques et de stress chimique, *Thèse de Doctorat en Toxicologie de l'Environnement*, EBSE, Université de Metz, 99 pages.

- Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C., Babut M., Exinger A. et Vasseur P., 1997, Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus* as biomarkers of aquatic contamination in field studies, *Ecotoxicol Environ saf*, **38**, 122-131.
- Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C. et Vasseur P., 1997a, Mécanismes de formation et effets des espèces réactives de l'oxygène, in *Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux*, Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. et Ramade F. (eds), 125-148, Masson, Paris.
- Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C. et Vasseur P., 1997b, Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques, in *Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux*, Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. et Ramade F. (eds), 149-164, Masson, Paris.
- Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C., Babut M., Exinger A. et Vasseur P., 2000, Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus* in response to different contamination profiles of aquatic sediments, *Ecotoxicol Environ saf*, **45**, 106-121.
- Cozzi R., Ricordy R., Aglitti T., Gatta V., Perticone P. et De Salvia R., 1997, Ascorbic acid and β -carotene as modulators of oxidative damage, *Carcinogenesis*, **18** (1), 223-228.
- Cracowski J.L., Stanke-Labesque F. et Bessard G., 2000a, *Rev Med Interne*, **21**, 304-307.
- Cracowski J.L., Stanke-Labesque F., Souvignet C. et Bessard G., 2000b, *Presse Med*, **29** (11), 604-610.
- Cuzzocrea S., Zingarelli B., Gilad E., Hake P., Salzman A.L. et Szabo C., 1997, Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation, *J Pineal Res*, **23**, 106-116.
- Dailly E., 2000, Etude de l'inhibition de la peroxydation lipidique dans le sang humain par diverses molécules endogènes et exogènes, *Ann Pharm Fr*, **58**, 303-307.
- Dally H. et Hartwig A., 1997, Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells, *Carcinogenesis*, **18**, 1021-1026
- Daneshvar B., Frandsen H., Autrup H. et Dragsted L.O., 1997, γ -Glutamyl semialdehyde and 2-amino-adipic semialdehyde: biomarkers of oxidative damage to proteins, *Biomarkers*, **2**, 117-123.
- Degan P., Shigenaga M K., Park E M., Alperin P E., et Ames B N., 1991, Immunoaffinity isolation of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 8-hydroxyguanine and quantitation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by polyclonal antibodies, *Carcinogenesis*, **12**, 865-871
- De Groote M.A., Ochsner U.A., Shiloh M.U., Nathan C., McCord J.M., Dinauer M.C., Libby S.J., Vasquez-Torres A., Xu Y. et Fang F.C., 1997, Periplasmic SOD protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase, *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 13997-14001.

- Delaney C.A., Tyrberg B., Bouwens L., Vaghef H., Hellman B. et Eizirik D.L., 1996, Sensitivity of human pancreatic islets to peroxynitrite-induced cell dysfunction and death, *FEBS Lett*, **394**, 300-306.
- De Leve L D et Kaplowitz N, 1990, Importance and regulation of hepatic glutathione, *Semin Liver Dis*, **10** (4), 251-266.
- Deneke S.M. et Fanburg B.L., 1989, Regulation of cellular glutathione, *Am J Physiol*, **257**, L163-L173.
- Depledge M.H., Amaral-Mendes J.J., Daniel B., Halbrook R.S., Kloepper-Sams P., Moore M.N. et Peakall D.B., 1993, The conceptual basis of the biomarker approach, Peakall D.B. et Shugart L.R. (eds), *Biomarkers: Research and application in the assessment of environmental Health*, 68 H, Springer Verlag, Berlin, 15-29.
- De Zwart L.L., Meerman J.H.N., Commandeur J.N.M. et Vermeulen N.P.E., 1999, Biomarkers of free radical damage : Applications in experimental animals and in humans , *Free Radic Biol Med*, **26** (1), 202-226.
- Gangolli S., Dictionary of Substances and their effects, 1999, 2nd edition, *The Royal Society of Chemistry*, Bookcraft (Bath), UK.
- Di Giulio R.T., Habig C. et Gallagher E.P., 1993, Effects of black rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress and DNA integrity in channel catfish, *Aquat toxicol*, **26**, 1-22.
- Ding Y., Gonick H.C. et Vaziri N.D., 2000, Lead promotes hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in cultured aortic endothelial cells, *AJH*, **13**, 552-555.
- Dizdaroglu M., 1994, Chemical determination of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry, *Methods in Enzymol*, **234**, 3-16.
- Dmitriev L.F. et Ivanova M.V., 1994, Interaction of tocopherol with peroxy radicals does not lead to the formation of lipid hydroperoxides in liposomes, *Chem Phys Lipids*, **69**, 35-39.
- Douki T., Onuki J., Medeiros M.H.G., Bechara E.J.H., Cadet J. Et Mascio P.D., 1998, Hydroxyl radicals are involved in the oxidation of isolated and cellular DNA bases by ALA, *FEBS Lett*, **428**, 93-96.
- Doyotte A., Cossu C., Jacquin M.C., Babut M. et Vasseur P., 1997, Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve, *Unio tumidus*, *Aquat Toxicol*, **39**, 93-110.
- Doyotte A., 1998, Etude de la lipoperoxydation et de la 8-Hydroxy-2'-déoxyguanosine en tant que biomarqueurs de toxicité chez *Unio tumidus*, bivalve dulçaquicole exposés à des sédiments contaminés et en conditions de stress chimique, *Thèse de Doctorat en Toxicologie de l'Environnement*, EBSE, Université de Metz, 121 pages.

- Drake I.M., Davies M.J., Mapstone N.P., Dixon M.F., Schorah C.J., White K.L.M., Chalmers D.M. et Axon A.T.R., 1996, Ascorbic acid may protect against human gastric cancer by scavenging mucosal oxygen radicals, *Carcinogenesis*, **17** (3), 559-562.
- Dringen R., 2000, Metabolism and functions of glutathione in brain, *Prog Neurobiol*, **62**, 649-671.
- Driver A.S., Kodavanti P.R.S. et Mundy W.R., 2000, Age-related changes in ROS production in rat brain homogenates, *Neurotoxicol Teratol*, **22** (2), 175-181.
- Durot I., Maupoil V., Ponsard B., Cordelet C., Vergely-Vandriessse C., Rochette L. et Athias P., 2000, Oxidative injury of isolated cardiomyocytes :dependence on free radical species, *Free Radic Biol Med*, **29** (9), 846-857.
- Duthie S.J., Collins A.R. et Duthie G.G., 1998, The role of carotenoids in modulating DNA stability and lipid peroxydation importance for human health, *Subcellular Biochemistry*, Quinn & Kagan (ed.), Plenum Press, New York.
- England T., Beatty E., Rehman A., Nourooz-Zadeh J., Pereira P., O'Reilly J., Wiseman H., Geissler C. et Halliwell B., 2000, The steady-state levels of oxidative DNA damage and of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) are not correlated in healthy human subjects, *Free Radic Res*, **32**, 355-362.
- Epe B., 1993, DNA damage induced by photosensitization, *DNA and free radicals*, Halliwell B. et Aruoma O.I. (ed.), Ellis Horwood Limited, England, 41-65.
- Erdelmeier I., Gérard-Monnier D., Yadan J. et Chaudière J., 1998, Reactions of N-Methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxynonenals : Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxydation, *Chem Res Toxicol*, **11**, 1184-1194.
- Esterbauer H. et Slater T.F., 1981, The quantitative estimation by HPLC of free malondialdehyde produced by peroxidizing microsomes, *IRCS Med Sci*, **9**, 749-750.
- Esterbauer H. et Zollner H., 1989, Methods for determination of aldehydic lipid peroxydation products, *Free Radic Biol Med*, **7**, 197-203.
- Esterbauer H., Schaur R J. et Zollner H., 1991, Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free Radic Biol Med*, **11**, 81-128.
- Esterbauer H., 1993, Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products, *Am J Clin Nutr*, **57**(5), 779S-785S.
- Fatima M., Ahmad I., Sayeed I., Athar M. et Raisuddin S., 2000, Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues, *Aquat Toxicol*, **49**, 243-250.
- Faux S P., Gao M., Chipman J K. et Levy L S., 1992, Production of 8-hydroxydeoxyguanosine in isolated DNA by chromium(VI) and chromium(V), *Carcinogenesis*, **13**, 1667-1669.

- Feldman D.L., Mogelesky T.C., Sharif R., Sawyer K., Jeune M., Hu C.-H., Leonards K.S. et Prescott M.F., 1999, The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties, and hypolipidemic activity of CGP 2881, *Atherosclerosis*, **144**, 343-355.
- Finnegan M.T.V., Herbert K.E., Evans M.D., Griffiths H.R. et Lunec J., 1996, Evidence for sensitisation of DNA to oxidative damage during isolation, *Free Radic Biol Med*, **20** (1), 93-98.
- Flohe L, Günzler W A et Schock H H, 1973, Glutathione peroxidase: a selenoenzyme, *FEBS Lett*, **32**, 132-134.
- Floyd R.A., Watson J.J., Wong P.K., Altmiller D.H. et Rickard R.C., 1986, Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation, *Free Radic Res Comm*, **1** (3), 163-172.
- Forbes V.E., Moller V. et Depledge M.H., 1995, Intrapopulation variability in sublethal response to heavy metal stress in sexual and asexual gastropod populations, *Funct Ecol*, **9**, 477-484.
- Frankel E N., 1983, Volatile lipid oxidation products, *Prog Lipid Res*, **22**, 1-33
- French B.L., Reichert W.L., Hom T., Nishimoto M., Sanborn H.R. et Stein J.E., 1996, Accumulation and dose-response of hepatic DNA adducts in English sole (*Pleuronectes vetulus*) exposed to a gradient of contaminated sediments, *Aquat Toxicol*, **36**, 1-16.
- Fridovich I., 1975, Superoxide dismutases, *Annu Rev Biochem*, **44**, 147-159.
- Fugita K., Yamauchi M., Shibayama K., Ando M., Honda M. et Nagata Y., 1996, Decreased CO activity but unchanged SOD and GPx activities in the spinal cords of patients ALS, *J Neurosci Res*, **45**, 276-281.
- Fung H., Kow Y W., Van Houten B. et Mossman B T., 1997, Patterns of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in DNA and indications of oxidative stress in rat and human pleural mesothelial cells after exposure to crocidolite asbestos, *Carcinogenesis*, **18**, 825-832
- Gabelova A., Slamenova D., Ruzekova L., Farkasova T. et Horvathova E., 1997, Measurement of DNA strand breakage and DNA repair induced with hydrogen peroxide using single cell gel electrophoresis, alkaline DNA unwinding and alkaline elution of DNA, *Cancer Res*, 380-388.
- Galzigna L., De Iuliis A. et Zanatta L., 2000, Enzymatic dopamine peroxydation in substantia nigra of human brain, *Clin Chim Acta*, **300**, 131-138.
- Garcia J.J., Martinez-Ballarín E., Robinson M., Allué J.L., Reiter R.J., Osuna C. et Acuna-Castroviejo D., 2000, Protective effect of β -carbolines and other antioxidants on lipid peroxidation due to hydrogen peroxide in rat brain homogenates, *Neurosci Lett*, **294**, 1-4.
- Garçon G., Zerimech F., Hannotiaux M.H., Gosset P., Martin A., Marez T. et Shirali P., 2001a, Antioxidant defense disruption by PAH-coated onto Fe₂O₃ particles in human lung cells, *Toxicology*, **166**, 129-137.

- Garçon G., Garry S., Gosset P., Zerimech F., Martin A., Hannotiaux M.H. et Shirali P., 2001b, B(a)P-coated onto Fe₂O₃ particles-induced lung tissue injury: role of free radicals, *Cancer Lett*, **167**, 7-15.
- Gavino V.C., Miller J.S., Ikharebha S., Milo G.E. et Cornwell D.G., 1981, Effect of polyunsaturated fatty acids and antioxidants on lipid peroxidation in tissue cultures, *J Lipid Res*, **22**, 763-769.
- Gedik C.M., Wood S. G. et Collins A.R., 1998, Measuring oxidative damage to DNA; HPLC and the Comet Assay Compared, *Free Radic Res*, **29**, 609-615.
- George S. G. et Pirie B. J. S., 1980, Metabolism of zinc in the mussel, *Mytilus-edulis* (l) - a combined ultrastructural and biochemical-study, *J Mar Biol Assoc UK*, **60**, 575-590.
- Gérard-Monnier D., Erdelmeier I., Régnard K., Moze-Henry N., Yadan J.C. et Chaudiere J., 1998, Reactions of 1-Methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation, *Chem Res Toxicol*, **11** (10), 1176-1183.
- Germain L., 1969, La faune de France : Mollusques terrestres et fluviatiles, Kraus-Thomson organization limited, Germany, 714-716.
- Gilberti E.A. et Trombetta L.D., 2000, The relationship between stress protein induction and the oxidative defense system in the rat hippocampus following kainic acid administration, *Toxicol Lett*, **116**, 17-26.
- Goldhaber J I et Weiss J N, 1992, Oxygen free radicals and cardiac reperfusion abnormalities, *Hypertension*, **20**, 118-127.
- Griffiths H.R. et Lunec J., 2001, Ascorbic acid in the 21st century-more than a simple antioxidant, *Environ Toxicol Pharmacol*, **10**, 173-183.
- Gutteridge J. M. C., Stocks J. et Dormandy T. L., 1974, Thiobarbituric acid-reacting substances derived from autoxidizing linoleic and linolenic acids, *Anal Chim Acta*, **70**, 107-111.
- Gutteridge J. M., Rowley D. A. et Halliwell B., 1982, Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. Detection of 'catalytic' iron and anti-oxidant activity in extracellular fluids, *Biochem J*, **206**, 605-609.
- Gutteridge J.M. et Wilkins S., 1983, Copper salt-dependent hydroxyl radical formation. Damage to proteins acting as antioxidants, *Biochim Biophys Acta*, **759**, (1-2), 38-41.
- Gutteridge J.M.C. et Halliwell B., 1990, The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological system, *Trends Biochem Sci*, **15**, 129-135.
- Gutteridge J.M.C. et Halliwell B., 1993, Transition metal ions and antioxidant proteins in extracellular fluids, in *Atmospheric Oxidation and Antioxidants*, Scott G. (eds), **3**, Elsevier Publisher, UK.

- Ha H. et Kim K.H., 1999, Pathogenesis of diabetic nephropathy: the role of oxidative stress and protein kinase C, *Diabetes Res Clin Pract*, **45**, 147-151.
- Haidara K., Morel I., Abaléa V., Gascon Barré M. et Denizeau F., 2002, Mechanism of *t*-BHP induced apoptosis in rat hepatocytes, *Biochim Biophys Acta*, **1542**, 173-185.
- Halliwell B. et Gutteridge J.M.C., 1984, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem J*, **219**, 1-14.
- Halliwell B. et Gutteridge J.M.C., 1989, Free radicals in biology and medicine, 2nd edition, Clarendon Press Publisher, Oxford.
- Halliwell B. et Aruoma O.I., 1991, DNA damage by oxygen-derived species, *FEBS*, **281** (2), 9-19.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. et Cross C.E., 1992, Free Radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med*, **119**, 598-620.
- Halliwell B. et Dizdaroglu M., 1992, The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques, *Free Radic Res Commun*, **16**, 75-87
- Halliwell B., 1998, Can oxidative DNA damage be used as a biomarker of cancer risk in humans? Problems, resolutions et preliminary results from nutritional supplementation studies, *Free Radic Res*, **29**, 469-486.
- Halliwell B., Clement M.V. et Long L.H., 2000, Hydrogen peroxide in the human body, *FEBS Lett*, **486**, 10-13.
- Harvey J.S. et Parry J.M., 1997, The detection of genotoxin-induced DNA adducts in the common mussel *Mytilus edulis*, *Mutagenesis*, **12**, 153-158.
- Helbock H.J., Beckman K.B., Shigenaga M.K., Walter P.B., Woodall A.A., Yeo H.C. et Ames B.N., 1998, DNA oxidation matters : The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine, *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 288-293.
- Hermann M., Kapiotis S., Hofbauer R., Exner M., Seelos C., Held I. et Gmeiner B., 1999, Salicylate inhibits LDL oxidation initiated by superoxide / nitric oxide radicals, *FEBS Lett*, **445**, 212-214.
- Hermes-Lima M., Willmore W.G. et Storey K.B., 1995, Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylene orange complex formation, *Free Radic Bio Med*, **19**, 271-280.
- Herrero A., Portero-Ohn M., Bellmunt M.J., Pamplona R. et Barja G., 2001, Effect of the degree of fatty acid unsaturation of rat heart mitochondria on their rates of H₂O₂ production and lipid and protein oxidative damage, *Mech Ageing Dev*, **122**, 427-443.
- Hildebrandt A G, Tjoe M et Roots I, 1975, Proceedings: Stimulation of microsomal ethanol oxidation by H₂O₂ formation during the uncoupling of hepatic microsomal mixed function oxidation reactions, *Z Klin Chem Klin Biochem*, **13**, 374.

Hirose M., Takahashi S., Ogawa K., Futakuchi M. et Shirai T., 1999, Phenolics: Blocking agents for heterocyclic amine-induced carcinogenesis, *Food Chem Toxicol*, **37**, 985-992.

Hofer T. et Moller L., 1998, Reduction of oxidation during the preparation of DNA and analysis of 8-OHdG, *Chem Res Toxicol*, **11**, 882-887.

Horton AA et Fairhurst S., 1987, Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity, *Crit Rev Toxicol*, **18**(1), 27-79.

Ibrahim W., Lee U.-S., Szabo J., Bruckner G. Et Chow C.K., 1999, Oxidative stress and antioxidant status in mouse kidney: Effects of dietary lipid and vitamin E plus iron, *J Nutr Biochem*, **10**, 674-678.

Isamah G.K., Asagba S.O. et Coker H.A.B., 2000, Comparative evaluation of the levels of some antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different fish species in two rivers in the Western Niger delta, *Environ Contam Toxicol*, **65**, 351-356.

Janero DR., 1990, Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury, *Free Radic Biol*, **9**(6), 515-40.

Jerlich A., Fritz G., Kharrazi H., Hammel M., Tschabuschnig S., Glatter O. et Schaur R.J., 2000, Comparison of HOCl traps with myeloperoxidases inhibitors in prevention of LDL oxidation, *Biochim Biophys Acta*, **1481**, 109-118.

Ji L.L., 1999, Antioxidants and oxidative stress in exercise, *PSEBM*, **222**, 283-292.

Jovanovic A., Grubor-Lajsic G., Djukic N., Gardinovacki G., Matic A. et Spasic M., 1997, The effects of selenium on antioxidant system in erythrocytes and liver of the carp, *Crit Rev Food Sci Nutr*, **37** (5), 443-448.

Kachur A.V., Tuttle S.W. et Biaglow J.E., 1998, Autoxidation of ferrous ion complexes: a method for the generation of hydroxyl radicals, *Radiat Res*, **150**, 475-482.

Kamiya H., Murata-Kamiya N., Koizume S., Inoue H., Nishimura S et Ohtsuka E, 1995, 8-Hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in hot spots of the *c-Ha-ras* gene: effects of sequence contexts on mutation spectra, *Carcinogenesis*, **16**, 883-889.

Karbownik M., Reiter R J., Garcia J J., Tan D. X., Qi W. et Manchester L C., 2000, Melatonin reduces rat hepatic macromolecular damage due to oxidative stress caused by delta-aminolevulinic acid, *Biochim Biophys Acta*, **1523**, 140-146.

Karlhuber G.M., Bauer H.C. et Eckl P.M., 1997, Cytotoxic and genotoxic effects of 4-HNE in cerebral endothelial cells, *Mutat Res*, **381**, 209-216.

Karpenko A.A. et Odintsova N.A., 1996, Effect of inducers of lipid peroxidation on the behavior of ciliated epithelial cells, *Comp Biochem Physiol*, **113B**, 841-844.

Kasai H., Tanooka H. et Nishimura S., 1984, Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA by X-irradiation, *Gann*, **75**, 1037-1039.

- Kasai H., Okada Y., Nishimura S., Rao M S. et Reddy J K., 1989, Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following long-term exposure to a peroxisome proliferator, *Cancer Res*, **49**, 2603-2605.
- Kasai H., 1997, Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-OHdG, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis, *Mutat Res*, **387**, 147-163.
- Kasprzak K S., Jaruga P., Zastawny T H., North S L., Riggs C W., Olinski R. et Dizdaroglu M., 1997, Oxidative DNA base damage and its repair in kidneys and livers of nickel(II)-treated male F344 rats, *Carcinogenesis*, **18**, 271-277.
- Kaur J., Sharma D. et Singh R., 1998, Regional effects of ageing on Na⁺, K⁺-ATPase activity in rat brain and correlation with multiple unit action potentials and lipid peroxidation, *Indian J Biochem Biophys*, **35**, 364-371.
- Kehrer J P., 1993, Free radicals as mediators of tissue injury and disease, *Crit Rev Toxicol*, **23**, 21-48.
- Kelly S.A., Havrilla C.M., Brady T.C., Abramo K.H. et Levin E.D., 1998, Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems, *Environ Health Perspect*, **106** (7), 375-384.
- Ketterer B., 1988, Protective role of glutathione et glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis, *Mutat Res*, **202**, 343-361.
- Keyer K. et Imlay J.A., 1996, Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels, *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 13635-13640.
- Kikugawa K et Sugimura Y., 1986, Properties of conjugated Schiff bases on malonaldehyde, *Chem Pharm Bull* (Tokyo), **34** (4), 1794-800.
- Kim J., Chehade J., Pinnas J.L. et Mooradian A.D., 2000, Effect of select antioxidants on MDA modification of proteins, *Nutrition*, **16**, 1079-1081.
- Kimura H., Minakami H., Otsuki K. et Shoji A., 2000, CuZn SOD inhibits lactate dehydrogenase release and protects against cell death in murine fibroblasts pretreated with UV radiation, *Cell Biol Int*, **24** (7), 459-465.
- Klaunig J.E., Xu Y., Bachowski S., Ketcham C.A., Isenberg J.S., Kolaja K.L., Baker T.K., Walborg E.F. et Stevenson D.E., 1995, Oxidative stress in nongenotoxic carcinogenesis, *Toxicol Lett*, **82/83**, 683-691.
- Knight J.A., 1998, Free radicals: their history and current status in aging and disease, *Ann Clin Lab Sci*, **28** (6), 331-345.
- Knight J.A., 1997, Reactive oxygen species and the neurodegenerative disorders, *Ann Clin Lab Sci*, **27** (1), 11-25.

Korizis K N., Exarchou A., Michalopoulos E., Georgakopoulos C D., Kolonitsiou F., Mantagos S., Gartaganis S P. et Karamanos N K., 2001, Determination of malondialdehyde by capillary electrophoresis, application to human plasma and relation of its levels with prematurity, *Biomed Chromatogr*, **15**, 287-291.

Kwee J.K., Armelin M.S., Stefani H.A. et Augusto O., 1998, Cell proliferation induced by 8-oxoguanosine and 8-methylguanosine, two adducts produced by free radical attack on ribonucleosides and RNA, *Chem Biol Interact*, **116**, 61-77.

La D.K. et Swenberg J.A., 1996, DNA adducts: biological markers of exposure and potential applications to risk assessment, *Mutat Res*, **365**, 129-146.

Lagadic L., Caquet T. et Amiard J.C., 1997, Biomarqueurs en écotoxicologie : Principes et définitions., Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. et Ramade F. (eds), *Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux*, Masson, Paris, 1-9.

Latour I., Demoulin J.B. et Buc-Calderon P., 1995, Oxidative DNA damage by *t*-BOOH causes DNA single breaks which is not linked to cell lysis, *FEBS Lett*, **373**, 299-302.

Lawrence R.A. et Burk R.F., 1976, Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver, *Biochem Biophys Res Commun*, **71** (4), 952-958.

Lawrence G D. et Cohen G., 1984, Concentrating ethane from breath to monitor lipid peroxidation *in vivo*, *Methods Enzymol*, **105**, 305-311.

Lebeau J., Neviere R. et Cotelte N., 2001, Beneficial effects of different flavonoids, on functional recovery after ischemia and reperfusion in isolated rat heart, *Bioorg Med Chem Lett*, **11**, 23-27.

Lefèvre G., Beljean-Leymarie M., Beyerie F., Bonnefont-Rousselot D., Cristol J.-P., Thérond P. et Torreilles J., 1998, Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique, *Ann Biol Clin*, **56** (3), 305-319.

Lemaire P., Viarengo A., Canesi L. and Livingstone D.R., 1993, Pro-oxidant and antioxidant processes in gas gland and other tissues of cod (*Gadus morhua*), *J Comp Physiol B*, **163**, 477-486.

Lepage G., Munoz G., Champagne J., Roy CC., 1994, Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by HPLC, *Anal Biochem*, **197**, 277-283.

Livingstone D.R., Martinez P.G., Stegeman J.J. et Winston G.W., 1988, B(a)P metabolism and aspects of oxygen radical generation in the common mussel, *Mytilus edulis*, *Biochem Soc Transactions*, **16**, 779-785.

Livingstone D.R., Martinez P.G., Michel X., Narbonne J.F., O'Hara S., Ribera D. et Winston G.W., 1990, Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel *Mytilus edulis* and other molluscs, *Funct Ecol*, **4**, 415-424.

Livingstone D.R., Lips F., Martinez P.G. et Pipe R.K., 1992, Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*, *Mar Biol*, **112**, 265-276.

- Livingstone D.R. et Pipe R.K., 1992, Mussels and environmental contaminants: molecular and cellular aspects, in *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and culture*, Gosling E. (eds), *Developments in Aquaculture and fisheries Science*, **25**, 425-464, Elsevier, Amsterdam.
- Livingstone D.R., 1993, Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment, *J Chem Tech Biotechnol*, **57**, 195-211.
- Livingstone D.R., Lemaire P., Matthews A., Peters L., Bucke D. et Law R.J., 1993, Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals, *Mar pollut Bull*, **26**, 602-606.
- Livingstone D.R., 1998, The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates in fish, *Comp Biochem Physiol A*, **120**, 43-49.
- Liu T.Y., Chen C.C., Chen C.L. et Chi C.W., 1999, Safrole-induced oxidative damage in the liver of Sprague-Dawley rats, *Food Chem Toxicol*, **37**, 697-702.
- Lloyd D.R. et Phillips D.H., 1999, Oxidative DNA damage mediated by CuII, FeII and NiII Fenton reactions: evidence for site specific mechanisms in the formation of double strand breaks, 8-OHdG and putative intrastrand cross-links, *Mut Res*, **424**; 23-36.
- Lodovici M., Casalini C., Cariaggi R., Michelucci L. et Dolara P., 2000, Levels of 8-hydroxydeoxyguanosine as a marker of DNA damage in human leukocytes, *Free Radic Biol Med*, **28**, 13-17.
- Loft S., Fischer-Nielsen A., Jeding I B., Vistisen K. et Poulsen H E., 1993, 8-Hydroxydeoxyguanosine as a urinary biomarker of oxidative DNA damage, *J Toxicol Environ Health*, **40**, (2-3), 391-404.
- Londero D. et Lo Greco P., 1996, Automated HPLC separation with spectrofluorimetric detection of a malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in plasma, *J Chromatogr A*, **729**, 207-210.
- Lu C.Y., Lee H.C., Fahn H.J. et Wei Y.H., 1999, Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin, *Mutat Res*, **423**, 11-21.
- Lukyanova O.N. et Khotimchenko Y.S., 1995, Lipid peroxidation in organs of the scallop *Mizuhopecten yessoensis* and sea-urchin *Strongylocentrotus intermedius* during the reproductive cycle, *Comp Biochem Physiol*, **110B**, 371-377.
- Luo X., Christie N.A., McLaughlin M.A., Belcastro R., Sedlackova L., Cabacungan J., Freeman B.A. et Tanswell A.K., 1999, H₂O₂ mediates O₂ toxicity in cultured fetal rat distal lung epithelial cells, *Free Radic Biol Med*, **26** (11/12), 1357-1368.
- Lynch M. et Kuramitsu H., 2000, Expression and role of superoxide dismutases in pathogenic bacteria, *Microbes Infect*, **2**, 1245-1255.

- Marcon J.L. et Filho D.W., 1999, Antioxidant processes of the wild tambaqui *Colossoma macropomum* from the Amazon, *Comp Biochem Physiol C*, **123**, 257-263.
- Marnett L.J. et Burcham P.C., 1993, Endogenous DNA adducts: potential and paradox, *J Am Chem Soc*, **6**, 771-785.
- Marnett L.J., 1999, Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde, *Mutat Res*, **424**, 83-95.
- Marnett L.J., 2000, Oxyradicals and DNA damage, *Carcinogenesis*, **21**(3), 361-370.
- McCarthy J.F. et Shugart L.R. (eds), 1990, *Biomarkers of Environmental Contamination*, Lewis Publishers, Boca Raton, 457p.
- McCord JM et Fridovich I., 1969, Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein), *J Biol Chem.*, **244** (22), 6049-55.
- Merry P., Winyard P.G., Morns C.J., Grootveld M. et Blake D.R., 1989, Oxygen free radicals, inflammation and synovitis, the current status, *Ann Rheum Dis*, **48**, 864-870.
- Michiels C. et Remacle J., 1988, Use of the inhibition of enzymatic antioxidant systems in order to evaluate their physiological importance, *Eur J Biochem*, **177**, 435-441.
- Mikhailova M.V., Littlefield N.A., Hass B.S., Poirier L.A., et Chou M.W., 1997, Cd induced 8-OHdG formation, DNA strand breaks and antioxidant enzyme activities in lymphoblastoid cells, *Cancer Lett*, **115**, 141-148.
- Mills G.C., 1957, Hemoglobin catabolism I- Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown, *J Biol Chem*, **229**, 189-197.
- Minotti G., 1993, Sources and role of iron in lipid peroxidation, *Chem Res Toxicol*, **6**, 134-146.
- Miranda S., Opazo C., Larrondo L.F., Munoz F.J., Ruiz F., Leighton F. et Inestrosa N.C., 2000, The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid β -peptide in Alzheimer's disease, *Prog Neurobio*, **62**, 633-648.
- Miyata T., Kurokawa K. et Van Ypersele de Strihou C., 2000, *Kidney Int*, **58** (76), 120-125.
- Möller L., Hofer T. Et Zeisig M., 1998, Methodological considerations and factors affecting 8-OHdG analysis, *Free Radic Res*, **29**, 511-524.
- Morel I., Hamon-Bouer C., Abalea V., Cillard P. et Cillard J., 1997, Comparison of oxidative damage of DNA and lipids in normal and tumor rat hepatocyte cultures treated with ferric nitrilotriacetate, *Cancer Lett*, **119**, 31-36.
- Morrissey P.A. et O'Brien N.M., 1998, Dietary antioxidants in health and disease, *Int Dairy Journal*, **8**, 463-472.

Mourente G., Tocher D.R., Diaz E., Grau A. et Pastor E., 1999, Relationships between antioxidants, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products during early development in *Dentex dentex* eggs and larvae, *Aquaculture*, **179**, 309-324.

Mundays R. et Winterbourn C.C., 1989, Reduced glutathione in combination with superoxide dismutase as an important biological antioxidant defence mechanism, *Biochem Pharmacol*, **38** (24), 4349-4352.

Murakami K., Ueda T., Morikawa R., Ito M., Haneda M. et Yoshino M., 1998, Antioxidant effect of dipicolinic acid on the metal-catalysed lipid peroxidation and enzyme inactivation, *Biomedical Res*, **19** (3), 205-208.

Muscari C., Giaccari A., Giordano E., Clô C., Guarnieri C. et Caldarera C.M., 1996, Role of ROS in cardiovascular aging, *Mol Cell Biochem*, **160/161**, 159-166.

Nakagawa Y. et Tayama S., 1996, Induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in CHO-K1 cells exposed to phenyl-hydroquinone, a metabolite of ortho-phenylphenol, *Cancer Lett*, **101**, 227-232.

Nappi A.J. et Vass E., 1998, Hydroxyl radical formation resulting from the interaction of nitric oxide and hydrogen peroxide, *Biochim Biophys Acta*, **1380**, 55-63.

National Research Council, 1987, Biological markers in reproductive toxicology, *National Academy Press*, Washington DC.

National Academy of Sciences, 1989, Biological markers in environmental health research, *Environ Health Perspect*, **74**, 3-9.

Nestmann E.R., Bryant D.W. et Carr C.J., 1996, Toxicological significance of DNA adducts: summary of discussions with an expert panel, *Regul Toxicol Pharmacol*, **24**, 9-18.

Nishimoto M., Roubal W.T., Stein J.E. et Varanasi U., 1991, Oxidative DNA damage in tissues of English sole exposed to nitrofurantoin, *Chem Biol Interact*, **80** (3), 317-326.

Niyogi S., Biswas S., Sarker S. Et Datta A.G., 2001, Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle and their relation with PAH, *Mar Environ Res*, **52**, 13-26.

Noguchi N. et Niki E., 2000, Phenolic antioxidants: a rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis, *Free Radic Biol Med*, **28** (10), 1538-1546.

Nourooz-Zadeh J., Halliwell B. et Anggard E.E., 1997, Evidence for the formation of F3-isoprostanes during peroxidation of eicosapentaenoic acid, *Biochem Biophys Res Commun*, **236**, 467-472.

Novelli E.L.B., Vieira E.P., Rodrigues N.L. et Ribas B.O., 1998, Risk assessment of cadmium toxicity on hepatic and renal tissues of rats, *Environ Res*, **79**, 102-105.

Okay O.S., Donkin P., Peters L.D. et Livingstone D.R., 2000, The role of algae enrichment on the bioaccumulation of B(a)P and its effects on the blue mussel *Mytilus edulis*, *Environ Pollut*, **110**, 103-113.

- Oldham K.M. et Bowen P.E., 1998, Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial?, *J Am Diet Assoc*, **98**, 1001-1008.
- Oruç E.O. et Uner N., 2000, Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*, *Comp Biochem Physiol C*, **127**, 291-296.
- Ostapczuk P., Schladot J.D., Emons H., Oxynos K., Schramm K.W., Grimmer G. et Jacob J., 1997, Environmental monitoring and banking of marine pollutants by using common mussels, *Chemosphere*, **34** (9/10), 2143-2151.
- Özdemirler G., Pabuçcuoglu H., Bulut T., Bugra D., Uysal M. et Toker G., 1998, Increased lipoperoxide levels and antioxidant system in colorectal cancer, *J Cancer Res Clin Oncol*, **124**, 555-559.
- Pagano G., Biase A., Deeva I.B., Degan P., Doronin Y.K., Iaccarino M., Oral R., Trieff N.M., Warnau M. et Korkina L.G., 2001, The role of oxidative stress in developmental and reproductive toxicity of tamoxifen, *Life Sci*, **68**, 1735-1749.
- Palacios A., Piergiacomi V.A. et Catala A., 1999, Inhibition of lipid peroxidation of microsomes and mitochondria by cytosolic proteins from rat liver: effect of vitamin A, *Int J Vit Nut Res*, **69** (1), 61-63.
- Paller M.S. et Eaton J.W., 1995, Hazards of antioxidant combinations containing superoxide dismutase, *Free Radic Biol Med*, **18** (5), 883-890.
- Pan Y.J. et Loo G., 2000, Effect of copper deficiency on oxidative DNA damage in Jurkat T-lymphocytes, *Free Radic Biol Med*, **28** (5), 824-830.
- Panasenko O.M. et Arnhold J., 1999, Linoleic acid hydroperoxide favours hypochlorite- and myeloperoxidase-induced lipid peroxidation, *Free Radic Res*, **30**, 479-487.
- Pandey S, Ahmad I, Parvez S, Bin-Hafeez B, Haque R et Raisuddin S, 2001, Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish *Channa punctatus* Bloch: 1. Protection against lipid peroxidation in liver by copper preexposure, *Arch Environ Contam Toxicol*, **41**, 345-352.
- Pannunzio T.M. et Storey K.B., 1998, Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorina*, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **221**, 277-292.
- Parrish J.M., Austin E.W., Stevens D.K., Kinder D.H. et Bull R.J., 1996, Haloacetate-induced oxidative damage to DNA in the liver of male B6C3F1 mice, *Toxicology*, **110**, 103-111.
- Payne J.F., Malins D.C., Gunselman S., Rahimtula A. et Yeats P.A., 1998, DNA oxidative damage and vit A reduction in fish from a large lake system in Labrador, contaminated with iron-ore mine Tailings, *Mar Environ Res*, **46** (1-5), 289-294.
- Peakall D.B., 1992, *Animal biomarkers as pollution indicators*, Chapman & Hall, Londres, 291p.

- Peakall D.B. et Shugart L.R. (eds), 1993, *Biomarkers: research and application in the assessment of environmental health*, NATO ASI Series, serie H: Cell Biology, 68, Springer Verlag, Berlin, 119 p.
- Pedrajas J R., Peinado J. et López-Barea J., 1995, Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers, *Chem Biol Interact*, **98**, 267-282.
- Penninckx M., 2000, A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental and oxidative stress, *Enzyme Microb Technol*, **26** (9-10), 737-742.
- Persinger R.L., Melamede R., Bepalov I., Wallace S., Taatjes D.J. et Janssen-Heininger Y., 2001, Imaging techniques used for the detection of 8-oxoguanine adducts and DNA repair proteins in cells and tissues, *Exp Gerontol*, **36**, 1483-1494.
- Pilz J., Meineke I. et Gleiter C. H., 2000, Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by HPLC as the 2,4,-dinitrophenylhydrazine derivative, *J Chromatogr B*, **742**, 315-325.
- Ploch S.A., Lee Y., MacLean E. et Di Giulio R.T., 1999, Oxidative stress in liver of brown bullhead and channel catfish following exposure to *t*-BOOH, *Aquat toxicol*, **46**, 231-240.
- Pocernich C.B., La Fontaine M. et Butterfield D.A., 2000, *In vivo* glutathione elevation protects against hydroxyl free radical-induced protein oxidation in rat brain, *Neurochem Int*, **36**, 185-191.
- Polidori M.C., Mecocci P., Browne S.E., Senin U. et Flint Beal M., 1999, Oxidative damage to mitochondrial DNA in Huntington's disease parietal cortex, *Neurosci Lett*, **272**, 53-56.
- Portakal O., Ozkaya O., Inal M.E., Bozan B., Kosan M. et Sayek I., 2000, Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients, *Clin Biochem*, **33** (4), 279-284.
- Pratico D. et Delanty N., 2000, Oxidative injury in disease of the CNS: focus on Alzheimer's disease, *Am J Med*, **109**, 577-585.
- Pré J., 1991, La lipoperoxydation, *Path Biol*, **39** (7), 716-736.
- Pryor W A. et Castle L., 1984, Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides, *Methods Enzymol*, **105**, 293-299.
- Pryor W A., 1988, Why is the hydroxyl radical the only radical that commonly adds to DNA? Hypothesis: it has a rare combination of high electrophilicity, high thermochemical reactivity, and a mode of production that can occur near DNA, *Free Radic Bio Med*, **4**, 219-223.
- Puget K. et Michelson A., 1974, Iron containing superoxide dismutases from luminous bacteria, *Biochimie*, **56**(9), 1255-67.

Qi W., Reiter R.J., Tan D.X., Manchester L.C., Kim S.J. et Garcia J.J., 1999, Inhibitory effects of melatonin on ferric nitrilotriacetate-induced lipid peroxidation and oxidative DNA damage in the rat kidney, *Toxicology*, **139**, 81-91.

Quy Hai D., Ilona Varga S. et Matkovics B., 1997, Organophosphate Effects on Antioxidant System of Carp (*Cyprinus carpio*) and Catfish (*Ictalurus nebulosus*), *Comp Biochem Physiol C*, **117**, 83-88.

Radak Z., Pucsek J., Boros S., Jorfai L. et Taylor A.W., 2000, Changes in urine 8-OHdG levels of super-marathon runners during a four-day race period, *Life Sci*, **66** (18), 1763-1767.

Radice S., Ferraris M., Marabini L., Grande S. et Chiesara E., 2001, Effect of iprodione, a dicarboximide fungicide, on primary cultured rainbow trout hepatocytes, *Aquat toxicol*, **54**, 51-58.

Ramotar D., Kim C., Lillis R. et Demple B., 1993, Intracellular localization of the Apn1 DNA repair enzyme of *Saccharomyces cerevisiae*. Nuclear transport signals and biological role, *J Biol Chem*, **268**, 20533-20539.

Ray G., Batra S., Shukla N.K., Deo S., Raina V., Ashok S. et Husain S.A., 2000, Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer, *Breast Cancer Res Treat*, **59**, 163-170.

Recknagel R O. et Glende E A. Jr., 1984, Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes, *Methods Enzymol*, **105**, 331-337.

Regoli F.; Hummel H., Amiard-Triquet C., Larroux C., et Sukhotin A., 1998a, Trace metals and variations of antioxidant enzymes in Arctic bivalve populations, *Arch Environ Contam Toxicol*, **35**, 594-601.

Regoli F., Winston G.W., Mastrangelo V., Principato G. et Bompadre S., 1998b, Total oxyradical scavenging capacity in mussel *Mytilus sp.* as a new index of biological resistance to oxidative stress, *Chemosphere*, **37** (14/15), 2773-2783.

Reinheckel T., Nedelev B., Prause J., Augustin W., Schulz H.U., Lippert H. et Halangk W., 1998, Occurrence of oxidatively modified proteins: an early event in experimental acute pancreatitis, *Free Radic Biol Med*, **24**, 393-400.

Reiter R.J., 1996a, Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals, *Eur J Endocrinol*, **134**, 412-420.

Reiter R.J., 1996b, Functional aspects of the pineal hormone melatonin: Its role as an antioxidant, *Exp Clin Endocrinol*, **104**, 10-16.

Rice-Evans C.A., Diplock A.T. et Symons M.C.R., 1991, Techniques in free radical research in laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, Burton R.H. et Van Knippenberg P.H. (eds).

Ringwood A.H., Connors D.E. et DiNovo A., 1998, The effects of copper exposures on cellular responses in oysters, *Mar Environ Res*, **46**, 591-595.

Ristimäe T., Zilmer M., Zilmer K., Kairane C., Kullisaar T. et Teesalu R., 1999, Effect of low-dose aspirin on the markers of oxidative stress, *Cardiovasc Drugs Ther*, **13**, 485-490.

Rodenas J., Carbonell T. et Mitjavila M.T., 2000, Different roles for nitrogen monoxide and peroxynitrite in lipid peroxidation induced by activated neutrophils, *Free Radic Biol Med*, **28** (3), 374-380.

Rodríguez-Ariza A., Abril N., Navas J I., Dorado G., López-Barea J. et Pueyo C., 1992, Metal, mutagenicity, and biochemical studies on bivalve molluscs from Spanish coasts, *Environ Mol Mutagen*, **19**, 112-124.

Rodríguez-Ariza A., Martínez-Lara E., Pascual P., Pedrajas J R., Abril N., Dorado G., Toribio F., Bárcena J A., Peinado J. et Pueyo C., 1993, Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral, *Sci Total Environ, Supplement Pt 1*, 109-116

Rodríguez-Ariza A., Alhama J., Diaz-Mendez F.M. et Lopez-Barea J., 1999, Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of *Sparus aurata* fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution, *Mutat Res*, **438**, 97-107.

Romeo M. et Gnassia-Barelli M., 1997, Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus*, *Comp Biochem Physiol*, **118C**, 33-37.

Romeo M., Bennani N., Gnassia-Barelli M., Lafaurie M. et Girard J.P., 2000, Cd et Cu display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*, *Aquat toxicol*, **48**, 185-194.

Romero F.J., Bosch-Morell F., Romero M.J., Janero E.J., Romero B., Marin N. et Roma J., 1998, Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease, *Environ Health Perspect*, **106**, 1229-1234.

Rouzer C., Chaudhary A.K., Nokubo M., Ferguson D., Ramachandra Reddy G., Blair I. et Marnett L.J., 1997, Analysis of the malondialdehyde-2'-deoxyguanosine adduct pyrimidopurinone in human leukocyte DNA by GC/EC/NCI/MS, *Chem Res Toxicol*, **10** (2), 181-188.

Sai K., Kai S., Umemura T., Tanimura A., Hasegawa R., Inoue T. et Kurokawa Y., 1998, Protective effects of green tea on hepatotoxicity, oxidative DNA damage and cell proliferation in the rat liver induced by repeated oral administration of 2-nitropropane, *Food Chem Toxicol*, **36**, 1043-1051.

Saint-Denis M., Labrot F., Narbonne J.F. et Ribera D., 1998, Glutathione, Glutathione-related enzymes and catalase activities in the Earthworm *Eisenia fetida andrei*, *Arch Environ Contam Toxicol*, **35**, 602-614.

Saint-Denis M., Narbonne J.F., Arnaud C., Thybaud E. et Ribera D., 1999, Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of B(a)P, *Soil Biol Biochem*, **31**, 1837-1846.

Sakamoto H., Kitahara J. et Nakagawa Y., 1999, Effect of intracellular Glutathione on the production of Prostaglandin D2 in RBL-2H3 cells oxidized by *tert*-Butyl Hydroperoxide, *J Biochem*, **125**, 90-95.



- Sakuma N., Yosikawa M., Hibino T., Okada M., Jinno Y., Tamai N., Sasai K., Yoshimata T., Kunimatsu M. et Fujinami T., 1998, α -Tocopherol protects the peroxidative modification of LDL to be recognized by LDL receptors, *J Nutr Sci Vitaminol*, **44**, 697-703.
- Sanders S.P., Bassett D.J.P., Harrison S.J., Pearse D., Zweier J.L. et Becker P.M., 2000, Measurements of free radicals in isolated, ischemic lungs and lung mitochondria, *Lung*, **178**, 105-118.
- Sattler U., Calsou P., Boiteux S. et Salles B., 2000, Detection of oxidative base DNA damage by a new biochemical assay, *Arch Biochem Biophys*, **376**, 26-33.
- Sawada M., Sester U. et Carlson J C., 1993, Changes in superoxide radical formation, lipid peroxidation, membrane fluidity and cathepsin B activity in aging and spawning male Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), *Mech Ageing Dev*, **69**, 137-147.
- Schafer F.Q., Yue Qian S. et Buettner G.R., 2000, Iron and free radical oxidations in cell membranes, *Cell Mol Biol* **46** (3), 657-662.
- Schlenk D., Wolford L., Chelius M., Steevens J. Et Chan K.M., 1997, Effect of arsenite, arsenate and the herbicide monosodium methyl arsenate on hepatic metallothionein expression and lipid peroxidation in Channel Catfish, *Comp Biochem Physiol*, **118C**, 177-183.
- Schuler D., Otteneder M., Sagelsdorff P., Eder E., Gupta R.C., et Lutz W.K., 1997, Comparative analysis of 8-OHdG in DNA by P-postlabeling and electrochemical detection, *Carcinogenesis*, **18** (12), 2367-2371.
- Schweich M.D., Lison D. et Lauwerys R., 1994, Assessment of lipid peroxidation associated with lung damage induced by oxidative stress *in vivo* and *in vitro* studies, *Biochem Pharmacol*, **47**, 1395-1400.
- Schweigert N., Acero J.L., Von Gunten U., Canonica S., Zehnder A.J.B. et Eggen R.I.L., 2000, DNA degradation by the mixture of copper and catechol is caused by DNA-copper-hydroperoxo complexes, probably DNA-Cu(I)OOH, *Environ Mol Mutagen*, **36**, 5-12.
- Sen G., Mukhopadhaya R., Ghosal J. et Bis was T., 2000, Interaction of ascorbate and α -tocopherol enhances antioxidant reserve of erythrocytes during anemia in visceral leishmaniasis, *Life Sci*, **67**, 3181-3190.
- Sevilla C., Mahle N., Eliezer N., Uzieblo A., O'Hara S., Nokubo M., Miller R., Rouzer C. et Marnett L. J., 1997, Development of monoclonal antibodies to the malondialdehyde-deoxyguanosine adduct, pyrimidopurinone, *Chem Res Toxicol*, **10** (2), 172-180.
- Shanmugasundaram K.R., Kumar S.S. et Rajajee S., 2001, Excessive free radical generation in the blood of children suffering from asthma, *Clin Chim Acta*, **305**, 107-114.
- Shen H M., Ong C N., Lee B L. et Shi C Y., 1995, Aflatoxin B1-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation in rat hepatic DNA, *Carcinogenesis*, **16**, 419-422

Shi X., Mao Y., Ahmed N. et Jiang H., 1995, HPLC investigation on Ni(II)-mediated DNA damage in the presence of t-BOOH and GSH, *J Inorg Biochem*, **57**, 91-102.

Shi X., Chiu A., Chen C.T., Halliwell B., Castranova V. et Vallyathan V., 1999, Reduction of chromium VI and its relationship to carcinogenesis, *J Toxicol Environ Health*, **2** (part B), 87-104.

Shigenaga M.K., Park J.W., Cundy K., Gimeno C.L. et Ames B.N., 1990, *In vivo* oxidative DNA damage: measurement of 8-OHdG in DNA and urine by HPLC with ED, *Methods Enzymol*, **186**, 521-551.

Shigenaga M.K., Aboujaoude E.N., Chen Q. et Ames B.N., 1994, Assays of oxidative damage biomarkers 8-OHdG and 8-oxoguanine in nuclear DNA and biological fluids by HPLC with ED, *Methods Enzymol*, **234**, 16-33.

Shih M.K. et Hu M.L., 1999, UVA-induced oxidative damage to rat liver nuclei : reduction of iron ions and the relationship between lipid peroxidation and DNA damage, *Mutat Res*, **438**, 125-132.

Sies H., 1981, Measurement of hydrogen peroxide formation *in situ*, *Methods Enzymol*, **77**, 15-20.

Sies H., 1991, Oxidative stress: from basic research to clinical application, *Am J Med.*, **91**(3C):31S-38S.

Singh N P., McCoy M T., Tice R R. et Schneider E L., 1988, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp Cell Res*, **175**, 184-191.

Singh N P., Stephens R E. et Schneider E L., 1994, Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage, *Int J Radiat Biol*, **66**, 23-28.

Singh R. et NathPathak D., 1990, Lipid peroxidation and Glutathione peroxidase, Glutathione reductase, Superoxide dismutase, Catalase, and Glucose-6-Phosphate dehydrogenase activities in FeCl₃-induced Epileptogenic foci in the rat brain, *Epilepsia*, **31** (1), 15-26.

Sokolova T., Gutterer J.M., Hirrlinger J., Hamprecht B. et Dringen R., 2001, Catalase in astroglia-rich primary cultures from rat brain : immunocytochemical localization and inactivation during the disposal of hydrogen peroxide, *Neurosci Lett*, 129-132.

Solé M., Porte C., Biosca X., Mitchelmore C.L., Chipman J.K., Livingstone D.R. et Albaigés J., 1996, Effects of the Aegean Sea oil spill on Biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulus* L.), *Comp Biochem Physiol C*, **113**, 257-265.

Spiteller G., 2001, Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases, *Exp Gerontol*, **36**, 1425-1457.

Stohs S.J. et Bagchi D., 1995, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radic Biol Med*, **18** (2), 321-336.

Sudha K., Rao A.V. et Rao A., 2001, Oxidative stress and antioxidants in epilepsy, *Clin Chim Acta*, **303**, 19-24.

Système d'évaluation de la qualité de l'eau, 1997, Seuils de qualité pour les micropolluants organiques et minéraux dans les eaux superficielles, Synthèse, Agences de l'Eau et Ministère de l'Environnement.

Szabo C., 1996, The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation and ischemia-reperfusion injury, *Shock*, **6**, 79-88.

Tachet H., 2000, Invertébrés d'eau douce : Systématique, Biologie, Ecologie, CNRS éditions, Paris, 139-147.

Tagesson C., Källberg M., Klintonberg C. et Starkhammar H., 1995, Determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by automated coupled-column high performance liquid chromatography: a powerful technique for assaying *in vivo* oxidative DNA damage in cancer patients, *Eur J Cancer*, **31**, 934-940.

Takahashi S., Hirose M., Tamano S., Ozaki M., Orita S., Ito T., Takeuchi M., Ochi H., Fukada S., Kasai H. et Shirai T., 1998, Immunohistochemical detection of 8-OHdG in paraffin-embedded sections of rat liver after carbon tetrachloride treatment, *Toxicol Pathol*, **26** (2), 247-252.

Tanaka K., Iguchi H., Taketani S., Nakata R., Tokumaru S., Sugimoto T. et Kojo S., 1999, Facile degradation of apolipoprotein B by radical reactions and the presence of cleaved proteins in serum, *J Biochem*, **125**, 173-176.

Tato R E, Cárdenas E et Herrero Huerta E, 1994, Selenium: the physiopathological and clinical implications, *An Med Interna (Madrid, Spain: 1984)*, **11** (9), 457-463.

Téoule R., 1987, Radiation-induced DNA damage and its repair, *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, **51**, 573-589.

Terao J., Miyoshi M. et Miyamoto S., 2001, Thin-layer chromatography blotting for the fluorescence detection of phospholipid hydroperoxides and cholesteryl ester hydroperoxides, *J Chromatogr B*, **765**, 199-203.

Thomas P. et Wofford H.W., 1993, Effects of cadmium and arochlor 1254, on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues, *Aquat toxicol*, **27**, 159-178.

Timbrell J.A., Drapper R. et Waterfield C., 1994, Biomarkers in toxicology : new uses for old molecules, *Toxicol Ecotoxicol News*, **1**, 4-14.

Toyokuni S. et Sagripanti J.L., 1996, Association between 8-OHdG formation and DNA strand breaks mediated by copper and iron, *Free Radic Biol Med*, **20**, 859-864.

Topp H., Lengger C., Schoch G., Werner J. Et Mietzsch, 2000, Renal excretion of 8-OHdG in Wistar rats with increased O₂ consumption due to cold stress, *Arch Biochem Biophys*, **376** (2), 328-332.

- Toraason M., 1999, 8-OHdG as a biomarker of workplace exposures, *Biomarkers*, **4** (1), 3-26.
- Van Bergen P., Rauhala P., Spooner C.M. et Chiueh C.C., 1999, Hemoglobin and iron-evoked oxidative stress in the brain: protection by bile pigments, manganese and S-nitrosoglutathione, *Free Radic Res*, **31**, 631-640.
- Van der Oost R., Van Schooten F.J., Ariese F., Heida H., Satumalay K. et Vermeulen N.P.E., 1994, Bioaccumulation, biotransformation and DNA binding of PAHs in feral eel exposed to polluted sediments: a field survey, *Environ Toxicol Chem*, **13**, 859-870.
- Van der Oost R., Goksøyr A., Celander M., Heida H. et Vermeulen N. P. E., 1996, Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses, *Aquat toxicol*, **36**, 189-222.
- Van Gestel C.A.M. et Van Brummelen T.C., 1996, Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms, *Ecotoxicology*, **5**, 217-225.
- Varanasi U., Reichert W.L. et Stein J.E., 1989, 32P-post labelling analysis of DNA adducts in liver of wild english sole and winter flounder, *Cancer Res*, **49**, 1171-1177.
- Viarengo A., Pertica M., Canesi L., Biasi F., Cecchini J. et Orunesu M., 1988, Effects of heavy metals on lipid peroxidation in mussel tissues, *Marine Env Res*, **24**, 354-356
- Viarengo A., Canesi L., Martinez G., Peters L.D. et Livingstone D.R., 1995, Pro-oxidant processes and antioxidant defence systems in the tissues of the Antarctic scallop compared with the Mediterranean scallop, *Comp Biochem Physiol*, **111B**, 119-126.
- Viarengo A., Burlando B., Cavaletto M., Marchi B., Ponzano E. et Blasco J., 1999, Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Am J Physiol*, 1612-1619.
- Viarengo A., Burlando B., Ceratto N. et Panfoli I., 2000, Antioxidant role of metallothioneins : a comparative overview, *Cell Mol Biol*, **46** (2), 407-417.
- Wade C. R. et Van Rij A. M., 1985, *In vivo* lipid peroxidation in man as measured by the respiratory excretion of ethane, pentane, and other low-molecular-weight hydrocarbons, *Analytical Biochemistry*, **150**, 1-7.
- Wang Y. et Hu M.L., 2000, Use of rat liver slices for the study of oxidative DNA damage in comparison with isolated rat liver nuclei and HepG2 human hepatoma cells, *Food Chem Toxicol*, **38**, 451-458.
- Weil J.H., 1990, *Biochimie générale*, Masson (eds), 508 p.
- Whiteman M. et Halliwell B., 1997, Prevention of peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and inactivation of $\alpha 1$ -antiproteinase by antibiotics, *Free Radic Res*, **26**, 49-56.
- Whiteman M., Spencer J.P.E., Jenner A. et Halliwell B., 1999, Hypochlorous acid-induced DNA base modification: potentiation by nitrite: biomarkers of DNA damage by reactive oxygen species, *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 572-576.

Willson R L, 1978, Hydroxyl radicals and biological damage in vitro: what relevance in vivo?, *Ciba Foundation Symp*, **65**, 19-42.

Winston G.W., Livingstone D.R. et Lips F., 1990, Oxygen reduction metabolism by the digestive gland of the common marine mussel, *Mytilus edulis*, *J Exp Zool*, **255**, 296-308.

Winzer K., Becker W., Van Noorden C.J.F. et Kohler A., 2000, Short-time induction of oxidative stress in hepatocytes of the European flounder, *Marine Environ Res*, **50**, 495-501.

Winzer K., Winston G.W., Becker W., Van Noorden C.J.F. et Koehler A., 2001, Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder, *Aquat toxicol*, **52**, 143-155.

Witting P.K., Upston J.M. et Stocker R., 1998, The Molecular Action of α -tocopherol in lipoprotein lipid peroxidation pro- and antioxidant activity of vitamin E in complex heterogeneous lipid emulsions, *Subcellular Biochemistry*, Quinn & Kagan (eds.), Plenum Press, New York.

Wood M L., Dizdaroglu M., Gajewski E et Essigmann J M., 1990, Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome, *Biochemistry*, **29**, 7024-7032.

Xie C., Lovell M.A. et Markesbery W.R., 1998, Glutathione transferase protects neuronal cultures against four hydroxynonenal toxicity, *Free Radic Biol Med*, **25** (8), 979-988.

Xu L., Zheng G.J., Lam P.K.S. et Richardson B.J., 1999, Relationship between tissue concentrations of PAH and DNA adducts in green-lipped mussels, *Ecotoxicology*, **8**, 73-82.

Yagi K., 1984, Assay for blood plasma or serum, *Methods Enzymol*, **105**, 328-331.

Yim M B, Chock P B et Stadtman E R, 1990, Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide, *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 5006-5010.

Yin B., Whyatt R M., Perera F P., Randall M C., Cooper T B. et Santella R M., 1995, Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA, *Free Radic Biol Med*, **18**, 1023-1032

Yue Qian S. et Buettner G.R., 1999, Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study, *Free Radic Biol Med*, **26** (11/12), 1447-1456.

Yusof M., Yildiz D. et Ercal, 1999, NAC protects against ALA-induced 8OHdG formation, *Toxicology Lett*, **106**, 41-47.

Zastawny T.H., Altman S.A., Randers-Eichhorn L., Madurawe R., Lumpkin J.A., Dizdaroglu M. et Rao G., 1995, DNA base modifications and membrane damage in cultured mammalian cells treated with iron ions, *Free Radic Biol Med*, **18** (6), 1013-1022.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Dosage des protéines par la méthode de Bradford

La technique de Bradford utilise la fixation du bleu de Coomassie sur les protéines. Ce colorant existe sous 3 formes : une forme anionique colorée en bleu ($\lambda_{\text{max}} = 595 \text{ nm}$), une forme cationique rouge ($\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$) et une forme neutre verte ($\lambda_{\text{max}} = 650 \text{ nm}$).

C'est la forme anionique qui se fixerait préférentiellement aux protéines grâce à des interactions électrostatiques avec les groupements cationiques des protéines (plus particulièrement les groupements fonctionnels basiques et/ou aromatiques).

Gamme d'étalonnage (6 tubes)

- On réalise une gamme d'étalonnage contenant de 0 à 10 mg de protéine. Le volume de l'étalon ne doit pas dépasser 100 μL .
- 5 μL de réactif (bleu de Coomassie Brilliant G.250) sont ajoutés. On agite au vortex et on laisse reposer 10 minutes à l'obscurité.
- l'absorbance est mesurée à 595 nm. La coloration est stable pendant 1 h.

Dosage (2 essais)

- Opérer de même que pour la solution protéique, l'échantillon à doser est éventuellement dilué pour se situer dans la gamme.

ANNEXE 2 : Récapitulatif des tampons utilisés pour le dosage de la 8-OHdG

TAMPON D'HOMOGENEISATION	0,1 M NaCl 30 mM Tris pH 8 10 mM EDTA 10mM β -2-mercaptoéthanol 0,5 % (v/v) Triton X-100
TAMPON D'EXTRACTION	0,1 M Tris pH 8 0,1 M NaCl 20 mM EDTA
TAMPON RNASE	10 mM Tris-Cl pH 7,5 15 mM NaCl
TAMPON PROTEINASE	10 mM Tris pH 7,4 1 mM EDTA

ANNEXE 3 : Calcul de la quantité et de la pureté de l'ADN

Calcul de la quantité d'ADN

La solution est quantifiée par la mesure de l'absorbance à 260 nm sachant que :

$A_{260} = 1$ correspond à une concentration de **50 $\mu\text{g/ml}$**

Calcul de la pureté de l'ADN isolé

Le rapport A_{260}/A_{280} calculé doit être supérieur ou égal à 1,8

ANNEXE 4 : Composition pour 1 litre d'eau reconstituée utilisée lors des essais en laboratoire

Ajouter :

- 12,5 mL d'une solution de 9,86 g/L de $\text{Mg SO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$,
- 12,5 mL d'une solution de 23,5 g/L de $\text{Ca Cl}_2, 2 \text{ H}_2\text{O}$,
- 12,5 mL d'une solution de 5,18 g/L de $\text{NaH CO}_3, 7 \text{ H}_2\text{O}$,
- 12,5 mL d'une solution de 0,46 g/L de KCl .

Compléter jusqu'à 1 litre avec de l'eau déminéralisée

ANNEXE 5 : Protocole des intoxication de bivalves au Benzo(a)Pyrène et au fer en conditions contrôlées au laboratoire

Essai préliminaire

	Témoin	Témoin DMSO	BaP	Fer	BaP + Fer
Concentration finale en B(a)P	0 µg/L	0 µg/L	20 µg/L	0 µg/L	20 µg/L
Concentration finale en Fe ³⁺	0 mg/L	0 mg/L	0 mg/L	20 mg/L	20 mg/L
Volume final (mL)	700	700	700	700	700
Volume d'eau reconstituée (mL)	700	700	700	630	630
Volume de DMSO (µL)	0	350	0	0	0
Volume de la solution de B(a)P (40 mg/L) à ajouter (µL)	0	0	350	0	350
Volume de la solution de chlorure de fer (200 mg/L) à ajouter (mL)	0	0	0	70	70

Essai définitif

	Témoin	Témoin DMSO	Fer 1	Fer 2	BaP 1	BaP 2	Fer 1 + BaP 1	Fer 2 + BaP 1	Fer 1 + BaP 2	Fer 2 + BaP 2
Concentration finale en B(a)P	0	0	0	0	50	100	50	50	100	100
Concentration finale en Fe ³⁺	0	0	20	40	0	0	20	40	20	40
Volume final (mL)	700	700	700	700	700	700	700	700	700	700
Volume d'eau reconstituée (mL)	700	700	665	630	700	700	665	630	665	630
Volume de DMSO (µL)	0	350	0	0	175	0	175	175	0	0
Volume de la solution de B(a)P (200 mg/L) à ajouter (µL)	0	0	0	0	175	350	175	175	350	350
Volume de la solution de fer (400 mg/L) à ajouter (mL)	0	0	35	70	0	0	35	70	35	70

8-OHdG : 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine ; MDA : malondialdéhyde ; DMSO : diméthyl sulfoxyde ; B(a)P : benzo(a)pyrène

ANNEXE 6 : Composition des eaux interstitielles des stations le long de la Moselle (PNETOX)

Paramètres	Unités	Manom	Eloyes	Archettes	Igney	Velle sur Moselle
pH		7,85	6,95	6,85	7,60	7,45
% C organique	mg/L	11,6	8,95	7,95	5,35	6,55
Conductivité	µS/cm	767	129	186	327	414
Cl ⁻	mg/L	62	11	12	20	18
SO ₄ ⁻	mg/L	25,1	7,7	6,1	22,7	84
TAC	°F	30,4	3,4	6,2	10,2	7,2
CO ₃ ⁻	mg/L	<6	<6	<6	<6	<6
PO ₄ ⁻	mg/L	0,1	0,5	0,2	0,4	0,1
P total	mg/L	0,2	0,7	0,2	0,3	0,1
NO ₃ ⁻	mg/L	<7	0,8	1,7	11	1,5
NO ₂ ⁻	mg/L	0,03	0,11	0,11	0,27	0,24
NH ₄ ⁻	mg/L	5,2	1,9	3,55	0,98	0,47
As	µg/L	12	7	9	3	4
Cd	µg/L	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Cr	µg/L	<4	<4	<4	<4	<4
Cu	µg/L	<0,01	<0,01	<0,01	<0,02	<0,01
Hg	µg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ni	µg/L	3	<7	<7	<7	<7
Pb	µg/L	11	10	10	<3	3
Zn	µg/L	<0,01	0,04	0,02	0,01	0,02
Sn	µg/L	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HAP totaux	µg/L	0,04	0,11	0,17	0,16	0,09
PCB totaux	µg/L	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Hexachlorobutadiène	µg/L	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Hexachlorobenzène	µg/L	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
α HCH	µg/L	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
β HCH	µg/L	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
γ HCH	µg/L	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
δ HCH	µg/L	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Aldrine	µg/L	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Dieldrine	µg/L	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
op DDD	µg/L	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
pp DDD	µg/L	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
op DDE	µg/L	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
op DDT	µg/L	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
pp DDT	µg/L	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
1,2-dichlorobenzène	µg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
1,3-dichlorobenzène	µg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
1,4-dichlorobenzène	µg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
1,2,3-trichlorobenzène	µg/L	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
1,2,4-trichlorobenzène	µg/L	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
1,3,5-trichlorobenzène	µg/L	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005

ANNEXE 7: Taux de MDA dans les glandes digestives et les branchies des bivalves transférés pendant 7 et 21 jours sur les 5 sites le long de la Moselle

GD	MDA	t = 0	Témoïn t ₇	S1	S2	S3	S4	S5
t ₇	1	3,05	3,04	3,93	3,79	4,55	5,02	5,48
t ₇	1	3,16	3,06	3,72	-	4,23	-	5,48
t ₇	2	3,45	3,14	3,57	3,87	4,44	4,35	6,00
t ₇	2	3,36	3,18	-	3,90	4,47	4,30	5,92
t ₇	3	3,24	3,10	3,77	3,68	3,83	4,36	5,36
t ₇	3	-	3,05	3,58	3,62	3,73	4,44	5,18
t ₇	4	3,42	3,46	3,74	3,97	4,19	4,56	5,16
t ₇	4	3,40	3,36	3,80	3,88	4,03	4,35	5,20
t ₇	5	2,52	3,58	3,52	3,42	3,96	4,28	4,33
t ₇	5	2,84	3,55	3,46	3,57	4,14	4,16	4,42
t ₇	6		3,18	3,63	4,14	5,40	4,40	-
t ₇	6		3,32	3,64	3,91	5,52	4,76	-
t ₂₁	1		3,68	4,06	4,98	4,22	5,52	5,80
t ₂₁	1		3,36	3,84	-	4,26	5,63	6,00
t ₂₁	2		3,03	3,06	4,13	4,48	4,02	6,32
t ₂₁	2		3,14	3,08	4,06	5,00	4,24	6,16
t ₂₁	3		3,24	4,68	5,47	5,99	3,97	6,32
t ₂₁	3		-	4,88	5,63	5,80	3,96	5,72
t ₂₁	4		2,60	3,17	4,24	3,50	4,88	7,60
t ₂₁	4		2,80	3,13	4,28	3,91	4,84	7,24
t ₂₁	5		3,10	5,15	4,64	3,95	2,56	5,39
t ₂₁	5		3,46	5,06	4,78	4,00	2,32	5,50
t ₂₁	6		3,84	3,46	5,16	6,00	5,07	6,20
t ₂₁	6		-	3,51	5,36	6,04	4,91	6,36
BR	MDA	t = 0	Témoïn t ₂₁	S1	S2	S3	S4	S5
t ₇	1	2,92	3,54	3,51	3,12	4,80	3,74	4,90
t ₇	1	2,80	3,51	3,20	3,20	4,72	3,87	5,51
t ₇	2	2,60	3,60	4,04	3,13	4,27	4,63	5,02
t ₇	2	2,52	3,26	3,98	3,17	4,16	4,57	5,02
t ₇	3	3,27	3,82	3,92	4,16	4,24	3,79	4,88
t ₇	3	-	3,26	3,83	4,20	4,24	3,64	5,20
t ₇	4	3,59	3,57	4,06	4,43	4,17	4,87	4,55
t ₇	4	-	3,67	3,99	4,25	4,14	4,81	4,48
t ₇	5	3,28	3,24	3,20	3,59	4,64		4,28
t ₇	5	3,36	3,36	3,13	3,62	4,48		4,59
t ₇	6		3,51	3,53	4,38	4,10		
t ₇	6		3,41	3,31	4,37	4,00		
t ₂₁	1		3,29	3,75	4,18	3,79	-	5,55
t ₂₁	1		3,33	3,82	4,26	4,06	4,48	5,42
t ₂₁	2		3,64	3,98	4,19	3,84	4,40	5,36
t ₂₁	2		3,60	4,00	3,99	3,81	4,33	5,35
t ₂₁	3		3,68	3,33	3,85	4,74	4,75	5,51
t ₂₁	3		3,03	3,40	3,91	4,57	4,61	5,63
t ₂₁	4		3,25	3,72	4,14	4,12	-	5,37
t ₂₁	4		3,07	3,78	4,36	4,48	4,36	5,60
t ₂₁	5		3,03	3,31	3,48	3,83	4,53	-
t ₂₁	5		3,14	3,24	3,53	4,03	4,23	4,30
t ₂₁	6		3,28	3,22	3,69	4,75	4,38	5,45
t ₂₁	6		3,31	3,20	3,63	4,80	4,31	5,48

Les concentrations sont exprimées en ng MDA/mg protéines

-: non mesuré

S1 : Les Mitreuches ; S2 : Eloyes ; S3 : Archettes ; S4 : Igney ; S5 : Velle sur Moselle

ANNEXE 8: Taux de 8-OHdG dans les glandes digestives et les branchies des bivalves transférés pendant 7 et 21 jours sur les 5 sites le long de la Moselle

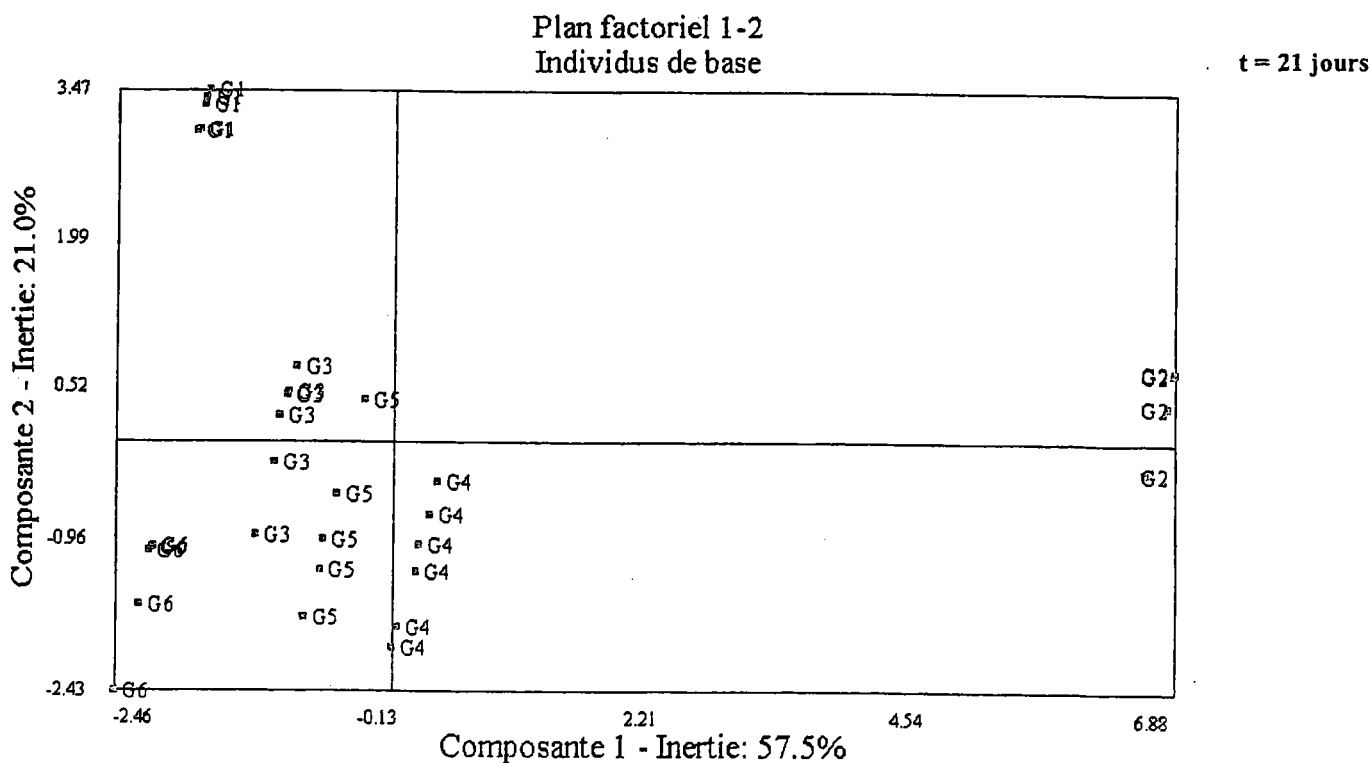
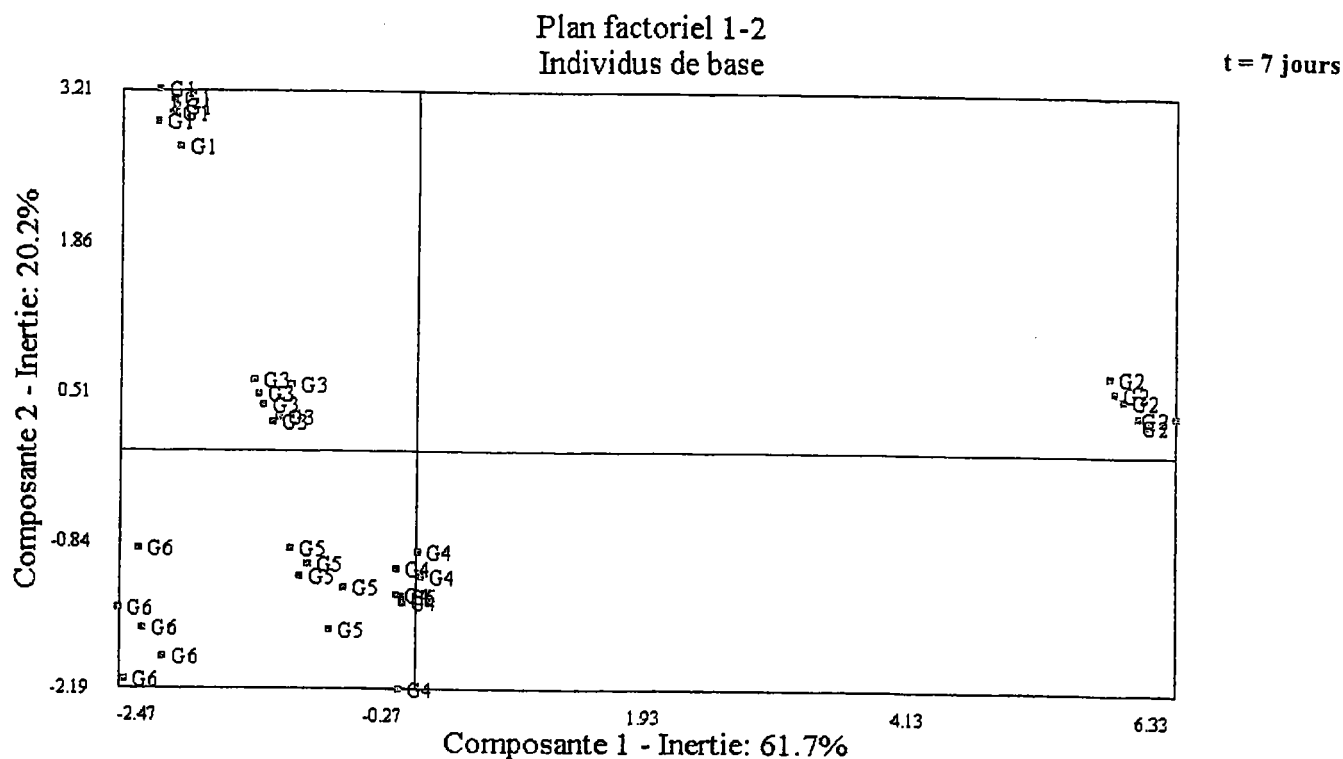
GD	8-OHdG	t = 0	Témoin t ₇	S1	S2	S3	S4	S5
t ₇	1	4,37	3,81	10,25	4,40	5,33	8,09	7,59
t ₇	1	-	3,32	11,08	4,36	-	7,89	8,39
t ₇	2	4,00	5,16	12,87	4,87	5,82	3,31	5,30
t ₇	2	3,76	-	-	4,99	6,04	-	4,90
t ₇	3	5,35	4,83	8,50	3,73	6,30	5,25	5,70
t ₇	3	-	5,00	8,00	-	6,54	5,06	5,78
t ₇	4	4,46	3,92	9,86	6,47	4,79	8,48	3,53
t ₇	4	4,45	-	9,73	6,90	4,91	8,62	3,17
t ₇	5	4,73	6,20	-	5,92	7,16	13,95	4,04
t ₇	5	4,79	-	-	-	-	13,58	4,06
t ₇	6	-	5,02	6,72	-	7,08	4,56	-
t ₇	6	-	5,02	7,30	-	-	-	-
t ₂₁	1	-	4,88	3,77	3,18	8,64	3,26	6,49
t ₂₁	1	-	-	-	3,29	8,18	3,21	6,46
t ₂₁	2	-	5,69	3,83	3,59	5,22	3,41	5,81
t ₂₁	2	-	5,96	-	3,64	5,13	3,97	5,78
t ₂₁	3	-	3,47	6,44	3,19	9,25	3,76	10,05
t ₂₁	3	-	3,75	-	3,05	9,19	4,34	-
t ₂₁	4	-	4,10	6,12	9,60	3,44	3,39	12,42
t ₂₁	4	-	3,90	-	10,10	3,56	3,51	-
t ₂₁	5	-	2,99	-	3,45	5,18	2,93	7,48
t ₂₁	5	-	3,02	-	4,01	5,03	3,22	7,73
t ₂₁	6	-	-	-	12,47	7,46	-	-
t ₂₁	6	-	-	-	12,02	-	-	-
BR	8-OHdG	t = 0	Témoin t ₂₁	S1	S2	S3	S4	S5
t ₇	1	20,86	16,83	8,13	22,35	14,62	23,76	20,93
t ₇	1	20,36	16,09	-	21,51	14,32	-	20,55
t ₇	2	17,49	17,88	15,29	19,39	24,88	23,44	16,62
t ₇	2	-	-	15,87	19,12	-	22,59	17,27
t ₇	3	18,43	16,49	24,49	22,21	27,44	24,62	21,03
t ₇	3	-	16,35	24,23	-	26,91	24,52	21,00
t ₇	4	17,95	16,64	15,98	18,97	21,23	21,56	26,24
t ₇	4	-	-	-	-	21,63	-	26,22
t ₇	5	18,16	16,25	19,50	18,65	13,05	-	22,09
t ₇	5	-	-	19,77	18,95	-	-	21,24
t ₇	6	-	16,23	13,82	14,25	21,26	-	-
t ₇	6	-	-	13,10	-	21,66	-	-
t ₂₁	1	-	17,50	20,34	21,08	29,55	15,22	19,75
t ₂₁	1	-	-	20,77	-	-	-	-
t ₂₁	2	-	19,60	19,18	14,22	19,20	14,86	19,35
t ₂₁	2	-	19,47	-	15,95	-	-	-
t ₂₁	3	-	19,25	18,04	13,45	21,02	15,34	20,16
t ₂₁	3	-	18,59	18,81	13,86	-	15,83	-
t ₂₁	4	-	18,31	14,75	22,28	21,53	18,10	20,05
t ₂₁	4	-	-	15,03	-	-	18,62	-
t ₂₁	5	-	18,98	23,93	20,84	20,06	22,79	23,69
t ₂₁	5	-	19,95	-	-	-	21,43	-
t ₂₁	6	-	20,00	22,5	20,07	-	23,67	-
t ₂₁	6	-	20,67	21,93	-	-	23,20	-

Les concentrations sont exprimées en ng MDA/mg protéines

-: non mesuré

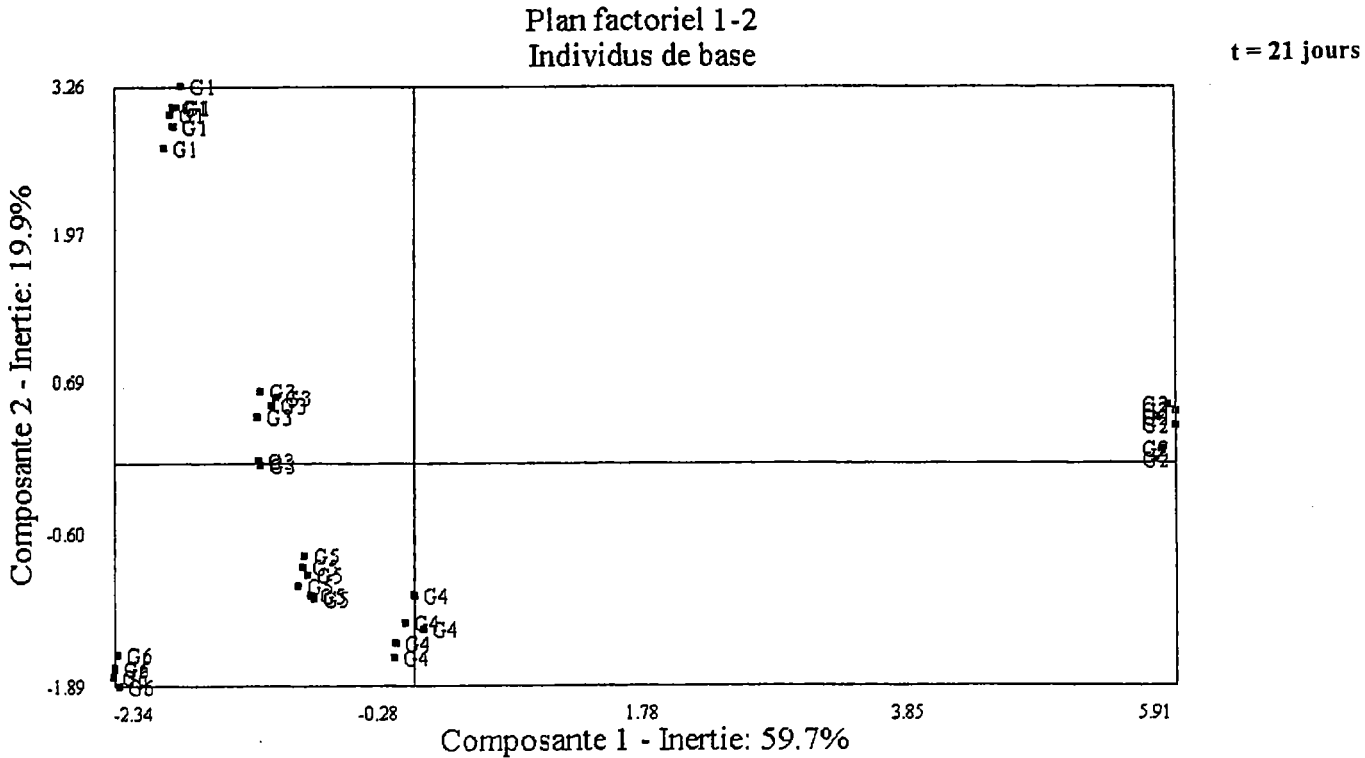
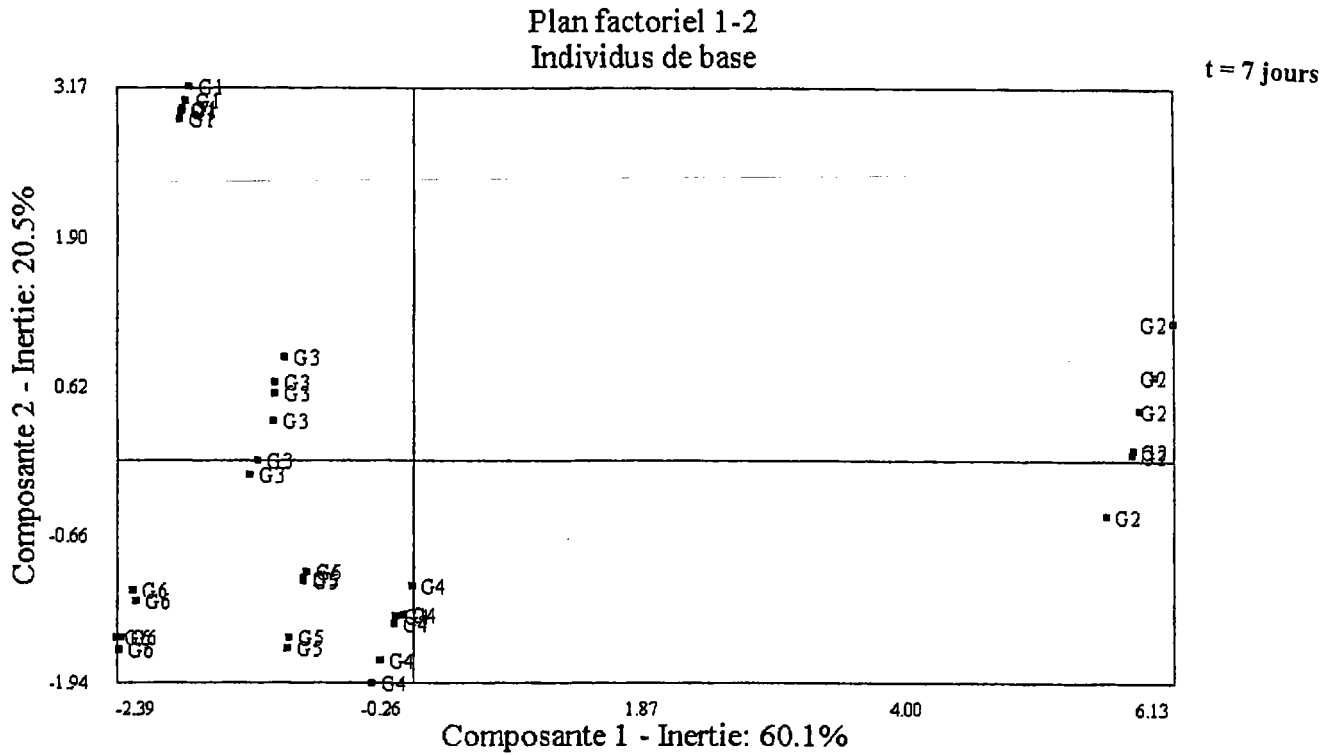
S1 : Les Mitreuches ; S2 : Eloyes ; S3 : Archettes ; S4 : Igney ; S5 : Velle sur Moselle

ANNEXE 9 : Distribution des individus issus de la campagne du PNETOX dans le plan factoriel issu de l'ACP des données centrées réduites des glandes digestives



- G1 : station témoin (Manom)
- G2 : les Mitreuches
- G3 : Eloyes
- G4 : Archettes
- G5 : Igney
- G6 : Velle sur Moselle

ANNEXE 10 : Distribution des individus issus de la campagne du PNETOX dans le plan factoriel issu de l'ACP des données centrées réduites des branchies



- G1 : station témoin (Manom)
- G2 : les Mitreuches
- G3 : Eloyes
- G4 : Archettes
- G5 : Igney
- G6 : Velle sur Moselle

ANNEXE 11 : Analyses physico-chimiques des sédiments du site de référence de la Maxe

<i>Contaminant</i>	<i>Concentrations en sédiments</i>
Métaux	(mg/Kg MS)
Cadmium	<0,01
Chrome	12
Cuivre	5
Nickel	7
Plomb	6
Zinc	19
Etain	<0,1
Polycyclic aromatic hydrocarbons	(µg/Kg MS)
Fluoranthène	10
Benzo[b]fluoranthène	4
Benzo[k]fluoranthène	<3
Benzo[a]pyrène	3
Benzo[ghi]perylène	<10
Indenoperylène	13
Polychlorinated biphenyls	(µg/Kg MS)
PCB 28	<5
PCB 52	9
PCB 101	<5
PCB 118	<5
PCB 138	<5
PCB 153	<5
PCB 180	<5
Pesticides Organochlorés	(µg/Kg MS)
Hexachlorobutadiene	<5
Hexachlorobenzene	<5
Aldrine	<5
Dieldrine	<5
o,p-DDD	<5
p,p-DDD	<5
o,p-DDE	<5
o,p-DDT	<5
p,p-DDT	<5
Chlorobenzenes (µg/Kg dry wt)	
1,2 dichlorobenzene	<5
1,3 dichlorobenzene	<5
1,4 dichlorobenzene	<5
1,2,3 trichlorobenzene	<5
1,2,4 trichlorobenzene	<5
1,2,5 trichlorobenzene	<5

ANNEXE 12 : Taux de MDA et de 8-OHdG dans les glandes digestives et les branchies lors des campagnes des gravières

GD	automne 1999 (t=21 jours)				printemps 2000 (t=7 jours)				printemps 2000 (t=21 jours)				automne 2000 (t=7 jours)					automne 2000 (t=21 jours)				
	témoïn	R	V		témoïn	R	V	C	témoïn	R	V	C	témoïn	R	V	C	M	témoïn	R	V	C	M
1	3,80	4,99	5,28		3,74	4,48	3,88	4,19	3,28	3,08	8,17	3,19	3,16	2,81	5,39	4,74	6,59	3,73	3,41	10,03	5,85	8,35
1	3,84	4,60	5,26		3,71	4,40	3,80	4,44	3,18	3,25	8,18	3,23	3,15	2,77	5,26	-	6,53	3,93	3,39	10,13	-	8,27
2	3,83	5,12	6,10		3,61	3,92	4,16	3,85	3,04	3,29		3,15	3,80	3,14	6,69	4,53	5,49	3,80	3,08	8,62	7,70	6,99
2	3,50	4,72	6,09		3,74	3,89	3,92		3,24	3,37			-	3,13	6,57	4,62	5,47	3,74	3,16	-	7,58	6,75
3	3,56	5,06	4,14		3,45	3,40	3,73	4,31	3,18	3,51		3,51	3,49	3,22	6,19	3,94	6,09	3,65	3,13	5,60	7,51	7,96
3	3,80	5,40	4,56		-	3,41	3,80	4,48	3,28	3,57		3,67	3,47	3,26	6,10	4,38	8,10	3,68	3,19	5,93	7,86	7,86
4	3,96	6,16	4,00		3,94	4,36	4,52	4,24	3,39	3,52		3,75	3,83	3,65	5,99	4,62	4,09	3,74	2,96	5,98	5,47	6,55
4	3,78	6,20	4,40		3,80	4,20	4,57	4,12	-	3,44		3,86	-	3,71	5,84	4,71	-	3,72	2,99	-	5,33	6,64
5	3,80	5,42	5,68		3,55	4,36	4,86	3,80	3,07	3,35		3,80	3,70	3,55	8,83	8,83	5,52	3,15	3,98	8,88	5,51	-
5	3,80	-	5,58		3,56	4,21	-	4,08	-	3,57		3,85	3,66	3,54	7,08	6,68	5,45	3,10	3,67	8,68	5,50	-
6	-	6,26	5,88		-	-	4,02	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	6,40	-	-		-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

BR	automne 1999 (t=21 jours)				printemps 2000 (t=7 jours)				printemps 2000 (t=21 jours)				automne 2000 (t=7 jours)					automne 2000 (t=21 jours)				
	témoïn	R	V		témoïn	R	V	C	témoïn	R	V	C	témoïn	R	V	C	M	témoïn	R	V	C	M
1	3,13	4,58	5,11		3,41	3,24	3,85	4,06	3,12	4,01	-	6,16	3,62	4,94	7,80	4,67	4,48	3,60	4,23	6,39	5,08	7,06
1	3,12	5,03	4,92		3,49	3,25	3,80	3,93	3,04	4,01	5,70	5,96	3,09	4,70	8,10	4,88	4,11	3,48	4,19	6,55	5,09	6,89
2	3,87	4,00	4,01		3,89	4,80	4,79	5,38	3,16	4,83	-	6,03	3,27	4,51	8,37	4,73	6,84	3,84	4,11	5,36	5,48	7,29
2	3,89	3,90	4,03		4,05	5,42	4,78	5,47	3,11	-	-	-	3,08	4,56	8,35	4,71	6,89	3,67	4,14	5,21	5,59	7,37
3	3,78	5,24	4,86		3,67	6,00	6,43	5,03	3,53	4,08	-	4,39	3,22	4,63	8,72	5,35	5,50	3,90	4,18	7,39	6,79	7,17
3	3,84	4,42	4,61		3,53	-	-	-	3,19	4,42	-	-	3,23	4,48	8,66	5,68	5,38	3,96	4,05	7,62	8,86	6,94
4	3,86	4,20	3,90		4,84	7,60	2,76	5,69	3,68	5,92	-	3,98	3,75	5,07	5,74	3,90	5,39	4,14	4,24	7,71	7,17	6,68
4	3,98	4,39	3,93		-	7,58	2,87	5,76	3,37	5,58	-	4,04	3,59	5,06	5,41	3,82	5,43	4,19	4,32	7,86	7,23	6,68
5	3,12	4,19	4,11		3,52	5,57	4,69	6,22	3,07	5,52	-	3,92	3,37	4,36	7,32	4,68	6,31	4,19	3,86	6,93	4,92	-
5	3,27	4,04	3,48		-	5,59	4,60	6,49	3,22	5,52	-	3,95	-	-	7,36	4,95	6,44	3,72	3,70	6,82	5,07	-
6	3,81	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	3,78	-	-		-	-	4,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

8-OHdG	automne 2000 (t=7 jours)					automne 2000 (t=21 jours)				
	témoïn	R	V	C	M	témoïn	R	V	C	M
	3,53	4,20	2,54	3,85	6,75	3,39	4,94	8,45	5,51	4,11
	3,66	-	-	-	6,81	3,56	-	8,85	5,86	-
	3,43	3,19	9,04	4,00	6,99	2,99	5,65	6,70	6,62	4,82
	3,27	3,18	8,99	4,29	-	2,72	5,60	6,33	6,74	-
	3,66	4,42	6,64	2,83	13,36	3,67	4,68	13,82	4,96	4,35
	-	4,50	6,52	-	-	-	4,84	13,83	-	-
	3,07	3,30	7,63	6,63	9,88	3,22	5,36	12,00	3,85	3,82
	-	3,35	7,50	-	10,20	-	5,36	12,91	3,86	-
	3,03	3,35	12,27	3,38	9,60	2,14	5,79	12,97	7,36	3,60
	3,08	3,47	11,64	3,44	9,82	-	5,85	12,98	-	-

8-OHdG	automne 2000 (t=7 jours)					automne 2000 (t=21 jours)				
	témoïn	R	V	C	M	témoïn	R	V	C	M
	16,70	15,30	16,23	17,15	18,37	16,22	15,68	22,43	15,41	15,43
	16,84	15,27	-	-	-	16,75	15,19	22,26	-	15,46
	16,39	15,95	16,24	16,26	18,24	14,60	16,81	21,92	16,65	27,68
	-	-	-	-	-	15,22	17,22	-	16,61	27,14
	16,79	15,33	17,57	18,41	17,65	18,18	15,51	22,98	19,28	17,38
	16,81	14,90	-	-	18,00	17,94	15,85	-	18,51	17,83
	16,99	16,05	16,18	18,12	16,61	17,46	16,62	26,06	14,10	19,11
	-	-	-	18,25	18,79	17,63	16,51	26,76	-	18,80
	17,79	15,58	16,63	15,71	18,28	17,33	15,83	25,60	20,40	15,46
	-	15,71	-	15,83	18,26	16,91	15,78	25,08	-	-

ANNEXE 13 : Taux de MDA et de 8-OHdG dans les glandes digestives et les branchies des bivalves exposés au fer et au BaP lors des intoxications en conditions contrôlées au laboratoire

Glande digestive	MDA		8-OHdG	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
témoin	3,192	2,811	3,35	-
témoin DMSO	3,447	-	4,7	-
Fer	9,231	10,088	7,9	-
Fer + B(a)P	7,462	6,744	7,96	-
B(a)P	5,221	5,332	8,13	-

Branchie	MDA		8-OHdG	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
témoin	3,847	-	15,43	-
témoin DMSO	4,591	4,662	14,73	0,32
Fer	7,373	7,33	14,47	0,20
Fer + B(a)P	9,409	10,537	17,72	0,16
B(a)P	6,912	6,732	22,46	0,40

Essai préliminaire

[Fer] = 20 mg/L
[BaP] = 20 µg/L

[Fer] = 20 mg/L
[BaP] = 20 µg/L

Glande digestive	MDA		8-OHdG	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
témoin	3,706	0,503	3,48	0,315
témoin DMSO	4,983	0,397	4,9	0,821
Fe1	10,232	2,16	4,94	1,891
Fe2	11,842	2,933	5,77	2,538
BaP1	9,134	2,276	9,26	3,127
BaP2	10,772	2,112	6,86	4,162
Fer1BaP1	11,419	3,126	6,38	4,175
Fer1BaP2	13,199	1	6,46	4,188
Fer2BaP1	7,328	0,863	6,69	3,699
Fer2BaP2	9,513	0,607	6,68	2,356

Branchie	MDA		8-OHdG	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
témoin	3,898	0,297	17,58	0,668
témoin DMSO	4,283	0,578	19,79	0,909
Fe1	9,337	2,379	23,37	5,996
Fe2	8,305	1,263	33,21	9,278
BaP1	7,06	0,784	34,37	3,127
BaP2	6,547	0,838	39,61	27,933
Fer1BaP1	5,476	1,052	21,77	18,215
Fer1BaP2	5,819	0,934	29,38	15,615
Fer2BaP1	7,286	1,95	24,51	11,178
Fer2BaP2	8,685	2,22	45,63	8,917

Essai définitif

[Fer1] = 20 mg/L
[Fer2] = 40 mg/L
[BaP1] = 50 µg/L
[BaP2] = 100 µg/L

[Fer1] = 20 mg/L
[Fer2] = 40 mg/L
[BaP1] = 50 µg/L
[BaP2] = 100 µg/L

Coefficient de variation (%)	
8-OHdG	
9	
15	
38	
44	
34	
60	
35	
35	
55	
35	

Coefficient de variation (%)	
8-OHdG	
3,7	
4,6	
25	
28	
9	
70	
84	
53	
46	
19,5	

Les taux de MDA sont en ng/mg protéines
Les taux de 8-OHdG sont en 8-OHdG/10⁵ dG
- pas de répliquats