



HAL
open science

Intérêt de l'application de tests alternatifs en écotoxicologie : cas des hépatocytes primaires de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

François Gagné

► **To cite this version:**

François Gagné. Intérêt de l'application de tests alternatifs en écotoxicologie : cas des hépatocytes primaires de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Ecotoxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 1996. Français. NNT: 1996METZ007S . tel-01777109

HAL Id: tel-01777109

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01777109>

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>

~~SAH 8 96/7~~

THESE

présentée devant

l'Université de Metz

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Metz

spécialité *Sciences de l'Environnement*

par

FRANÇOIS GAGNE

**“Intérêt de l'application de tests alternatifs
en écotoxicologie :
cas des hépatocytes primaires de truite arc-en-ciel
(Oncorhynchus mykiss)**

Après avis des rapporteurs :

Guy DIRHEIMER - Professeur à l'Université de Strasbourg, France

François RAMADE - Professeur à l'Université de Paris Sud, France

Soutenue le 29 Mars 1996 devant la Commission d'examen :

Christian BLAISE, Chercheur Scientifique, Environnement Canada
et Professeur Associé, Université du Québec à Rimouski, Canada

Guy DIRHEIMER, Professeur à l'Université de Strasbourg, France

Jean-François FERARD, Professeur à l'Université de Metz, France

François RAMADE, Professeur à l'Université de Paris Sud, France

Paule VASSEUR, Professeur à l'Université de Metz, France

Eric VINDIMIAN, Directeur Scientifique INERIS, Verneuil en Halatte, France

AVANT-PROPOS

Je tiens à remercier le Dr. Christian Blaise pour m'avoir accepté au sein de l'Unité de recherche en bioanalyse, de sa confiance, de sa patience et de ces précieux conseils, comme co-directeur, dans le déroulement de ma recherche sur les méthodes alternatives en écotoxicologie.

J'exprime toute ma gratitude au Professeur Paule Vasseur de l'Université de Metz qui a accepté de co-diriger mes travaux du coté français. Pour son intérêt intrinsèque à l'égard de ma recherche et pour la confiance qu'elle a bien voulu m'accorder, je lui suis profondément reconnaissant.

Je suis également reconnaissant aux autres membres du jury - Messieurs les Professeurs F. Ramade, G. Dirheimer et J.F. Férard, respectivement des Universités de Paris-Sud, Strasbourg et Metz, ainsi que Monsieur E. Vindimian de l'INERIS - qui m'honorent de leur présence à ma soutenance de thèse. Pour cette disponibilité qui témoigne bien de l'intérêt qu'ils portent envers nos travaux, je tiens à les assurer de ma profonde gratitude et de ma haute considération.

La participation du Professeur Férard et du chercheur Éric Vindimian comme membre de jury dans la soutenance de cette thèse a été appréciée. Leurs présences témoignent d'un intérêt pour nos travaux et je leur suis très reconnaissant.

Je voudrais aussi remercier Monique Simond, de la Section Gestion et Diffusion de l'Information, pour ses nombreuses suggestions quant à l'édition de cette thèse.

Je remercie Norman Bermingham pour m'avoir impliqué dans des études qui ont servi à valider le modèle hépatocyte de truite arc-en-ciel.

Je suis reconnaissant du soutien que m'a apporté le personnel de la section Écotoxicologie et Chimie Environnementale impliqué dans les caractérisations écotoxicologiques des effluents industriels et les analyses de l'argent pour les déterminations de la métallothionéine.

Je voudrais aussi remercier Lynn Cleary Directeur, Centre Saint-Laurent, qui a appuyé la réalisation de ces recherches.

Enfin, je remercie les miens - ma conjointe Lucie et mes enfants Geneviève, Catherine et Valérie - pour leur patience et appui constant durant tout le déroulement de ces travaux de cette thèse.

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19960145
Cote	SM3 96/7
Loc	Magasin

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS (REMERCIEMENTS)

RÉSUMÉ

ABSTRACT

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

INTRODUCTION ET OBJECTIFS

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 Les sources de contamination du milieu aquatique.....	1
1.2 Stratégies écotoxicologiques	1
1.3 Les défis bioanalytiques.....	4
1.4 Les tests alternatifs en écotoxicologie.....	5
1.4.1 Postulat afférent aux tests alternatifs	7
1.4.2 Les différents types de modèles cellulaires	8
1.4.3 Choix du modèle cellulaire.....	9
1.5 Critères d'effets toxicologiques.....	11
1.5.1 La mesure d'effets létaux	13
1.5.2 La mesure d'effets sublétaux	14
1.5.2.1 L'agression par les métaux	14
1.5.2.2 L'agression par des substances organiques.....	18
1.5.2.3 La génotoxicité	23
1.6 Validation de tests cellulaires pertinents.....	28
2. OBJECTIFS GÉNÉRAUX DU TRAVAIL EXPÉRIMENTAL	32
EXPÉRIMENTATION	
3. DÉVELOPPEMENT DE MESURES DE SUBLÉTALITÉ AVEC LA TRUITE	34
3.1 Introduction et objectifs	34

3.2 Méthodologie	36
3.2.1 Exposition des truites	36
3.2.2 Préparation de l'homogénat.....	38
3.2.3 Évaluation de la concentration de la métallothionéine hépatique.....	39
3.2.4 Détermination de l'activité du P4501A1	40
3.2.5 Traitement statistique des données.....	40
3.3 Résultats et discussion	41
3.3.1 Effet de l'anesthésie générale avec la tricaine	41
3.3.2 Effets toxiques des effluents d'usines de pâtes et papiers	41
3.3.3 Profils d'induction de la MT et de l'EROD	46
3.4 Conclusions	50
4. DÉVELOPPEMENT DE CRITÈRES DE MESURES (SUB)LÉTALES AVEC HÉPATOCTES DE TRUITE	51
4.1 Introduction et objectifs	51
4.2 Méthodologie	54
4.2.1 Préparation et exposition des hépatocytes	54
4.2.2 Évaluation de la viabilité cellulaire	55
4.2.3 Détermination de la métallothionéine (MT).....	56
4.2.3.1 Mesure de la MT au niveau traductionnel	56
4.2.3.2 Mesure de l'expression génétique de la MT selon la méthode «FISHES»	57
4.2.4 Détermination de l'activité du cytochrome P450 1A1	58
4.2.4.1 Mesure enzymatique.....	59
4.2.4.2 Mesure de l'expression génétique du P4501A1	60
4.2.5 Détermination des dommages génétiques.....	60
4.2.5.1 Test de translation de brèches sur l'ADN nucléaire	60
4.2.5.2 Test de la précipitation alcaline de l'ADN	61
4.2.6 Traitement statistique	62
4.3 Résultats et discussions des bioessais réalisés avec substances pures	63
4.3.1 Viabilité cellulaire.....	63
4.3.2 Activité du cytochrome P4501A	64
4.3.3 Induction de la métallothionéine	69
4.3.4 Génotoxicité	70
4.3.5 Conclusions	74
5. APPLICATION DU MODÈLE HÉPATOCTE SUR DIVERSES MATRICES ENVIRONNEMENTALES: RÉSULTATS ET DISCUSSION	76
5.1 Effluents industriels	76
5.1.1 Effet sur la viabilité cellulaire	76
5.1.2 Induction de la métallothionéine	77
5.1.3 Induction du cytochrome P4501A par les effluents industriels	78
5.1.4 Génotoxicité des effluents industriels.....	78

5.2 Eaux de surface : rejet municipal et son panache	79
5.2.1 Effets sur la viabilité cellulaire	79
5.2.2 Induction de la métallothionéine	80
5.2.3 Induction du P4501A1	80
5.2.4 Génotoxicité	81
5.3 Extraits organiques de sédiments marins.....	81
5.3.1 Viabilité cellulaire	82
5.3.2 Génotoxicité des extraits de sédiments marins	83

DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

6. VALIDATION DU MODÈLE HÉPATOCTE	86
6.1 Évaluation de la toxicité létale	86
6.2 Évaluation de l'inductibilité du cytochrome P4501A1	89
6.3 Évaluation de l'inductibilité de la MT	90
6.4 Mesure de la génotoxicité	91
7. INTÉGRATION ET CONCLUSIONS	92
7.1 Potentiel du modèle hépatocyte comme alternative au test avec truite	92
7.2 Conclusions : sa valeur comme outil préventif	95
8. RÉFÉRENCES	96
9. ANNEXE.....	111

ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN clone
Ah(récepteur) : hydrocarbure aryle (« aryl hydrocarbon »)
AHH : « aryl hydrocarbon hydroxylase »
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ATP : adénosine triphosphate
BaP : benzo(a)pyrène
Bio-dUTP : biotine déoxyribose uridine triphosphate
BPC : biphényles polychlorés
EROD : 7-éthoxyrésorufine O-dééthylase
 β -NF : β -naphtoflavone
DMSO : diméthyl sulfoxyde
DTT : dithiothréitol
Km : constante de Michaelis
HFIS : hybridation fluorescente *in situ* ou FISHES : « Fluorescent *in situ* hybridization en suspension »
MCF : méthoxycarbonylfluorescéine
MCFOD : méthoxycarbonylfluorescéine O-déméthylase
MH : modèle hépatocyte
MT : métallothionéine
NTA : « nick translation assay » ou essai de la translation de brèches
OC : pesticide organochloré
PA : précipitation alcaline (de l'ADN)
Pol1 : polymérase 1 ADN-dépendante
Rnase : ribonucléase
RCP : réaction en chaîne de la polymérase
Tris : tris(hydroxyméthyl)aminométhane
XRE : « xenobiotic response element » ou élément de réponse xénobiotique
Vmax : vitesse maximum (d'une réaction enzymatique)

RÉSUMÉ

Le contrôle des rejets industriels évacués vers les eaux réceptrices du fleuve Saint-Laurent nécessite des évaluations de nature chimique et toxicologique. La toxicité des effluents industriels est étudiée, en partie, par un bioessai standard de mortalité de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Ce bioessai est reconnu par les autorités de réglementation pour le contrôle des rejets industriels.

Un modèle *in vitro* qui consiste à utiliser des hépatocytes de truite en culture primaire est proposé comme alternative. Cet essai a l'avantage de réduire considérablement le nombre de poissons requis pour les essais tout en utilisant des critères d'effet qui sont à la base de l'expression de la toxicité. La cytotoxicité est mesurée par la perte de la perméabilité membranaire, par l'induction de la métallothionéine (MT) et de l'activité du cytochrome P4501A1 (EROD), et par le dommage à l'ADN dans les hépatocytes exposés à des effluents industriels pendant 48 h. Ces critères sont aussi mesurés dans le foie de truitelle exposée aux mêmes rejets industriels où la mortalité est aussi étudiée en fonction de la cytotoxicité des hépatocytes.

Les résultats montrent que le modèle hépatocyte (MH) est plus sensible que le bioessai avec la truite arc-en-ciel. Une corrélation significative ($R=0,7$; $p=0,008$) est obtenue entre la cytotoxicité et la mortalité. Cependant, il existe également une corrélation entre le bioessai bactérien Microtox® ($R=0,8$; $p=0,002$ selon une transformation en rang) avec la truite arc-en-ciel. Par ailleurs, des corrélations significatives sont obtenues pour les critères d'effet sublétaux comme l'induction de la MT ($R=0,93$; $p=0,002$), du cytochrome P4501A1 ($R=0,87$; $p<0,001$, selon une transformation de rang) et de la génotoxicité ($R=0,92$; $p<0,001$, selon une transformation de rang). Pour évaluer la toxicité létale, le MH et le test Microtox® peuvent constituer des alternatives au bioessai avec la truite arc-en-ciel. En plus, le MH pourrait aussi s'avérer une alternative intéressante pour la mesure de l'induction de la MT, du cytochrome P4501A1 et la génotoxicité hépatique.

Le MH peut être incorporé dans une démarche étape par étape de manière à réduire le nombre de poissons à tester et les coûts tout en augmentant l'information toxicologique. Celle-ci est aussi pertinente pour prévenir les dommages (ir)réversibles puisqu'elle repose sur des mécanismes qui sont précurseurs d'effets toxiques.

ABSTRACT

Control of point source pollution requires chemical characterization and toxicological assessment because it has the potential to contaminate and impact the aquatic biota. Toxicity of industrial effluents is evaluated, in part, by means of a standard 96 h static bioassay using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). A trout hepatocyte model has been developed as an alternative assay to the trout bioassay. This would reduce the number of fishes in these studies and may further underline some of the mechanism(s) of toxicity. With this model, cytotoxicity, along with metallothionein (MT), cytochrome P4501A1 (EROD) inductions, and DNA damage, can be estimated in effluent-exposed hepatocytes after 48 h. Similarly, these effects were also measured in the liver of effluent-exposed fishes after 96 h. In those comparisons, cell toxicity was particularly studied in relation to fish mortality.

The results showed that the cell system is more sensitive than the fish system. Cytotoxicity was significantly correlated with fish mortality ($R=0.7$, $p=0.008$), but so was a bacterial bioluminescent assay (Microtox®) ($R=0.8$, $p=0.002$, based on ranks). Significant correlations were also obtained with MT induction ($R=0.93$, $p = 0.002$), cytochrome P4501A1 activity ($R=0.87$, $p < 0.001$, based on ranks) and DNA damage ($R= 0.92$, $p < 0.001$, based on ranks). It appears, that the Microtox and the fish hepatocyte bioassays would be good predictors of fish toxicity as evaluated by the 96 h bioassay. Furthermore, sublethal effects measured in the cell system also proved good to be predictors of the same effects in the liver of the effluent-exposed trouts. In conclusion, these preliminary results suggest that the rainbow trout hepatocyte is a pertinent model for evaluating lethality as well as target organ (liver) toxicity for sublethal effects.

The hepatocyte model can be used in a sequential approach so as to minimize test fish numbers and cost while increasing the toxicological information generated for effluents. This added information should be useful toward prevention of toxicity because it relates to effects that are precursors of toxic expression.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications

GAGNÉ, F., BLAISE, C. (1993). Hepatic metallothionein level and mixed function oxidase activity in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after acute exposure to pulp and paper mill effluents. *Wat. Res.* 27, 1669-1982.

GAGNÉ, F., BLAISE, C. (1995). Fluorescence *in situ* hybridization en suspension using biotin-labeled DNA probes for measuring genetic expression of metallothionein and CYP1A1 in rainbow trout hepatocytes exposed to wastewaters. Dans : «Environmental Toxicology Assessment », Plenum Press, Londres, Angleterre, pages 41-53.

GAGNÉ, F., BLAISE, C. (1995). Evaluation of the genotoxicity of environmental contaminants to rainbow trout hepatocytes. *Environ. Toxicol. Wat. Qual.* 10(3), 217-229.

GAGNÉ, F., BLAISE, C. (1995). Genotoxicity of sediment extracts obtained in the vicinity of a creosote-treated wharf to rainbow trout hepatocytes. *Toxicol. Lett.*, 78, 175-182.

GAGNÉ, F., BLAISE, C. (1996) Measurement of cell viability and mixed function oxidase activity in rainbow trout hepatocytes - Method development. *Environ. Toxicol. Wat. Qual.* sous presse.

Communications

- 1) Validation of the rainbow trout hepatocyte model for the toxicological assessment of industrial wastewaters. VIII^e congrès international de toxicologie, Seattle, États-Unis (juillet 1995).
- 2) Fluorescence *in situ* hybridization en suspension using biotin-labeled DNA probes for measuring genetic expression of metallothionein and CYP1A1 in rainbow trout hepatocytes exposed to wastewaters. Société Britannique de Toxicologie, York, Angleterre (mars 1995).
- 3) Genotoxicity assessment of wastewaters with rainbow trout hepatocytes using the nick translation assay and flow cytometry. Société Britannique de Toxicologie, Cambridge, Angleterre (mars 1994).

- 4) Genotoxicity of sediment extracts obtained in the vicinity of a creosote-treated wharf to rainbow trout hepatocytes. Society de Toxicologie du Canada, Montréal, Québec, Canada (décembre 1994).
- 5) A rainbow trout hepatocyte model as an alternative to evaluate the toxicity of industrial effluents to fish. Congrès "First international meeting on alternatives in animal testing", Baltimore, USA (novembre 1993).
- 6) Evaluation of cell viability and mixed function oxydase activity using flow cytometry in rainbow trout hepatocytes (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to industrial effluents. VIIe congrès international de Toxicologie, Rome, Italie (juillet 1992).
- 7) Sublethal toxicity of pulp mill effluents evaluated by the measurement of metallothionein and mixed function oxidase induction in the liver of rainbow trout. Atelier sur la toxicité aquatique, Vancouver, Canada (novembre 1991).

Introduction et objectifs

1. Introduction générale

1.1 Les sources de contamination du milieu aquatique

Depuis le début du siècle, les activités de notre société industrielle entraînent une contamination toujours croissante de la biosphère, et en particulier du milieu aquatique. La contamination par des milliers, voire des centaines de milliers, de substances chimiques constitue un danger réel pour les écosystèmes. Les rejets industriels, municipaux et les activités agricoles sont des sources importantes de polluants qui peuvent se retrouver dans le milieu aquatique dulcicole et marin. Certains polluants persistent dans l'environnement; d'autres sont (bio)transformés chimiquement ce qui entraîne la formation d'une multitude de (sous) produits. Ces polluants ainsi que leurs sous-produits de (bio)transformation peuvent s'accumuler dans plusieurs compartiments de l'écosystème aquatique (par exemple les sédiments, l'eau interstitielle, la colonne d'eau et la composante biotique).

1.2 Stratégies écotoxicologiques

Pour contrer les risques écotoxicologiques liés au côté négatif de l'industrialisation, la caractérisation toxicologique des sources de pollution devient une activité essentielle pour la protection et la conservation du milieu aquatique. Cette caractérisation peut se réaliser en

Niveau trophique	Organisme	Bioessai	Critère d'effet	Référence
Décomposeur	<i>V. fischeri</i>	Microtox®	Inhibition de la bioluminescence	Env. Canada, 1992
	<i>E. coli</i>	SOS Chromotest	Génotoxicité	Legault <i>et al.</i> , 1996
	<i>S. typhimurium his</i>	Test d'Ames	Mutagenicité	Maron et Ames, 1983
Producteur primaire	<i>S. capricornutum</i>	Test algal	Reproduction	Env. Canada, 1992
Producteur secondaire	<i>O. mykiss</i>	Test avec Truite arc-en-ciel	Viabilité (Létalité)	Env. Canada, 1990

tableau 1.1 Exemples d'organismes couramment utilisés dans les évaluations écotoxicologiques.

appliquant une série de bioessais avec des organismes appartenant à divers niveaux trophiques (BLAISE *et al.*, 1988; COSTAN *et al.*, 1993). Dans une telle démarche, les poissons sont importants dans toute appréciation écotoxicologique des sources de pollution (NEFF, 1985) en raison de leur position dans la chaîne trophique et des phénomènes de bioaccumulation et de bioamplification. En effet, l'évaluation de la toxicité létale des rejets industriels liquides requiert le plus souvent un bioessai avec la truite arc-en-ciel et celui-ci est aussi reconnu par les organismes de réglementation des effluents industriels (BLAISE et COSTAN, 1986; ENVIRONNEMENT CANADA, 1990). Lors d'évaluations écotoxicologiques de rejets industriels, agricoles et municipaux, des organismes autres que les poissons et appartenant à différents niveaux trophiques (e.g. les algues et les bactéries) sont aussi largement utilisés pour les bioessais (**tableau 1.1**). Plusieurs critères d'effet peuvent être aussi déterminés chez des organismes du même niveau trophique. Pour évaluer l'écotoxicité de rejets complexes, on préconise une approche simultanée qui tient compte de la toxicité relative des organismes des niveaux trophiques différents, de la persistance, de la toxicité et des phénomènes de bioaccumulation/bioamplification des contaminants (BLAISE *et al.*, 1988). Les données de toxicité obtenues lors d'essais en laboratoire peuvent alors être prédictives des dommages dans le milieu naturel (WAGNER et LOKKE, 1991). Par exemple, un certain modèle est réputé prédire une concentration sécuritaire dans le milieu naturel à partir des résultats de toxicité obtenus en laboratoire (ALDENBERG et SLOB, 1993). Selon ce modèle, la distribution logistique des valeurs CMSEO (concentration minimale sans effet observé) des tests de toxicité permet ensuite

de calculer la concentration qui protège 95 % des espèces. Cette concentration représente en fait la limite de confiance à 95 % des données CMSEO. A mesure que le nombre de bioessais augmente, le modèle devient plus juste et la probabilité de surestimer une concentration sécuritaire diminue considérablement. Ce modèle peut également être utilisé pour prédire le facteur de dilution d'un effluent dans le milieu aquatique qui protégera 95 % des espèces. Pour établir une correspondance dans le milieu aquatique par contre, l'hydrodynamique du panache du rejet liquide doit être connue. Malgré que ce modèle ait été proposé pour l'étude de polluants spécifiques, on pourrait aussi envisager son emploi pour l'étude de mélanges complexes. Par ailleurs, les données de toxicité peuvent servir à comparer les dangers potentiels d'effluents industriels à partir d'un indice conçu avec des biotests (COSTAN *et al.*, 1993). Ce modèle, développé pour l'évaluation des mélanges, intègre des données de (géo)toxicité issues d'essais aigus et chroniques réalisés à plusieurs niveaux trophiques. En plus, il tient compte de la « charge toxique » vis-à-vis de l'environnement récepteur en intégrant le débit de l'effluent aux unités toxiques générées par les biotests. L'équation du modèle génère une valeur, nommée indice BEEP (barème d'effets écotoxiques potentiels), sur une échelle de 1 à 10, qui simule une échelle Richter environnementale de toxicité. Ces deux exemples démontrent l'utilité des biotests de laboratoire dans le cadre d'aide à la prise de décision. Il est impératif, cependant, que les essais écotoxicologiques ne soient pas utilisés seuls mais plutôt en complément des analyses chimiques et des études écologiques. Ils doivent de plus exploiter des critères d'effets qui sont pertinents pour prévenir, dans la mesure du possible, les dommages possibles à l'écosystème.

1.3 Les défis bioanalytiques

A mesure que le nombre de contaminants augmente, leur potentiel écotoxicologique devient de plus en plus difficile à appréhender. Ce constat plaide en faveur de la mise en oeuvre de nouveaux tests rentables. Ceux-ci doivent être rapides, sensibles, et économiques. Tout d'abord, le bioessai doit produire des réponses dans un délai raisonnable afin que les décideurs puissent agir efficacement. Ensuite, la sensibilité du bioessai s'avère un paramètre primordial parce que la réponse devra être obtenue après un temps d'exposition relativement court (pour satisfaire la contrainte de rapidité). Enfin, il va sans dire que le test devra être rentable tout en permettant l'analyse de plusieurs échantillons à la fois.

La demande croissante d'essais écotoxicologiques pour desservir différents type de programmes environnementaux, soulève maintenant des réserves sur le plan de l'éthique concernant l'emploi de bioessais utilisant des organismes entiers. En effet, le bioessai avec truite nécessite 120 truites par échantillon d'effluent. Basé sur l'étude de milliers d'essais réglementaires à chaque année au Canada, ceci représente donc le sacrifice d'un nombre important de truites. Est-il possible de réduire le nombre de poissons tout en conservant l'information toxicologique à ce niveau trophique ? Un essai alternatif pouvant réduire considérablement l'emploi d'organismes s'avérerait utile en ce sens. En guise d'exemple, mentionnons que le modèle avec hépatocytes

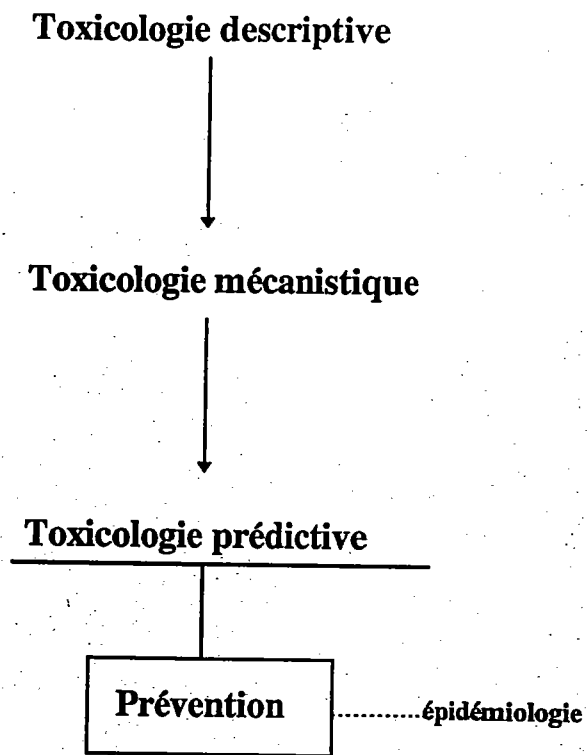


figure 1-1 La démarche de la toxicologie dans la prévention.

proposé dans nos travaux ne requiert le sacrifice que d'une seule truite de 15 cm pour évaluer la toxicité de 5 effluents industriels alors qu'il en faut 600 pour le bioessai sur poisson.

Une autre caractéristique désirable d'un bioessai est qu'il puisse offrir une information sur les effets écotoxiques à long terme. L'étude des mécanismes d'action qui sous-tendent les effets toxiques est des plus pertinentes en écotoxicologie pour la protection environnementale. En effet, la toxicologie se veut une science prédictive pour prévenir les effets néfastes de la pollution (**figure 1-1**). Pour pouvoir prédire, il faut premièrement connaître les effets (description) et les mécanismes qui les déclenchent (KLAASSEN, 1986). Le bioessai pourra donc mesurer des critères d'effets de stress (i.e. le mécanisme d'action) qui signalent le début d'une succession d'étapes et qui conduiront éventuellement à l'effet délétère. Par exemple, la formation de dommages à l'ADN ou bien l'activation de l'oncogène *c-jun* précèdent souvent la transformation néoplasique de certaines cellules exposées à des xénobiotiques (EVAN *et al.*, 1994). Les bioessais devraient donc, autant que possible, offrir une information pro-active permettant de prévenir les dégâts plutôt qu'à les constater rétrospectivement.

1.4 Les tests alternatifs en écotoxicologie

La nécessité de rentabiliser les bioessais, d'accélérer leur exécution, de réduire le nombre d'organismes d'essai et d'obtenir davantage d'information toxicologique introduit bien le concept des trois « **R** » que l'on associe aux tests alternatifs (RIXON, 1995). Ces trois **R**

représentent la Réduction du nombre d'organismes nécessaire pour les tests, le Raffinement des tests en matière de rentabilité et de critères d'effets plus prédictifs et le Remplacement de tests conventionnels par des tests plus performants. Ces trois **R** sont évidemment liés entre eux et forment les concepts de base qui motivent l'utilisation de méthodes alternatives aux tests *in vivo* (RIXON, 1995).

Les avantages des modèles cellulaires sont nombreux bien qu'ils ne soient toutefois pas exempts d'inconvénients. En considérant tout d'abord leurs avantages, il est clair que les modèles *in vitro* permettent un meilleur contrôle des conditions expérimentales (e.g. les éléments nutritifs, le pH du milieu, la température et la présence d'hormones). Les interactions systémiques, c'est-à-dire l'influence des autres organes ou systèmes physiologiques, sont aussi éliminées, ce qui contribue à réduire la variabilité des réponses toxiques. La précision expérimentale s'avère meilleure car la durée et la concentration d'exposition sont maintenues plus facilement qu'avec un système *in vivo*. Les modèles *in vitro* demandent un faible volume de l'échantillon. Comparativement, un bioessai avec truite demande de 60 à 200 L d'échantillon tandis qu'un modèle cellulaire n'en exigera que de 0,05 à 10 mL ! Les alternatives cellulaires contribuent à la suppression ou à la réduction, tout au moins, de l'emploi d'organismes entiers pour les essais toxicologiques. La période d'exposition aux toxiques peut être considérablement réduite par rapport à une exposition *in vivo*. Le coût en matériel et en temps d'analyse est aussi moins élevé. Enfin, le pouvoir de diagnostic, lequel se traduit par un plus grand nombre de critères d'effets étudiés par

test, est supérieur pour les essais réalisés avec les modèles cellulaires. En revanche, ceux-ci possèdent deux désavantages majeurs. Le premier concerne la pertinence ou le réalisme de la réponse cellulaire vis-à-vis de l'organisme. Sur ce, on peut se demander si une réponse toxique chez la cellule traduira bien une réponse similaire chez l'organisme correspondant ? Pour répondre à cette question, la méthode alternative se doit d'être étudiée en fonction de l'organisme entier. Cette étape de validation essentielle des méthodes alternatives a été abordée dans ce travail. Le deuxième désavantage est lié à la perte des effets systémiques car le modèle ne détecte que des altérations strictement cellulaires. Ce point est discuté plus loin dans la section traitant du choix du modèle (section 1.4.3). Acceptons, pour l'instant, la notion que les modèles cellulaires nous informent sur la toxicité générale des substances mais qu'ils ne peuvent pas témoigner d'effets toxiques à l'égard d'un tissu spécifique.

1.4.1 Postulat afférent aux tests alternatifs

Selon le principe des trois **R**, les modèles cellulaires représentent des outils de choix pour remplacer les tests toxicologiques qui utilisent des organismes entiers. L'utilisation de modèles cellulaires (MC) repose sur le principe suivant : les altérations qui entraînent des dommages systémiques, organiques et tissulaires s'expriment avant tout au niveau (sub)cellulaire. La cellule est donc le point de départ dans l'expression de la toxicité et peut être considérée comme une alternative aux bioessais avec des organismes entiers (BABICH et BORENFREUND, 1987). Le

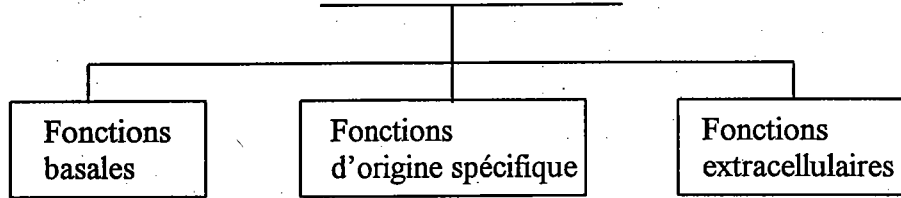
modèle cellulaire ne peut toutefois pas s'appliquer d'une façon systématique. Il faut que l'alternative proposée soit validée si l'on veut qu'elle soit efficace et pertinente.

1.4.2 Les différents types de modèles cellulaires

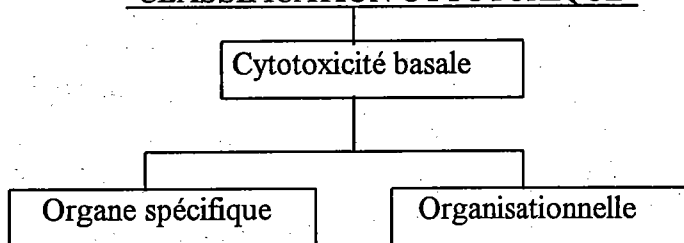
Il existe trois types de modèle cellulaire (on exclut ici les cultures d'organes qui peuvent aussi être utilisées dans certaines études écotoxicologiques) : la lignée cellulaire (« finite cell line »), la lignée immortelle et la culture primaire. Le terme *culture primaire* signifie que la culture provient directement de l'organe. Cette culture contient des cellules qui possèdent les caractéristiques spécifiques du type tissulaire ou des fonctions spécialisées des cellules. Lorsqu'on fait croître ces cellules de génération en génération, on obtient une *lignée cellulaire*. La lignée cellulaire peut se diviser d'une façon continue mais limitée. Une lignée peut se diviser généralement de 1 à 70 fois selon le type cellulaire, puis elle entre dans un état de sénescence et meurt. Le temps de vie de la lignée est donc limité. Une lignée immortelle par contre, est une lignée cellulaire transformée qui peut se diviser (des centaines de fois) comme dans le cas de cellules néoplasiques.

Une culture primaire - c'est le cas des hépatocytes - n'est pas une population strictement homogène de cellules (BLAIR *et al.*, 1990). Cette population hétérogène est composée généralement de 97 % de cellules épithéliales (ou hépatocytes) et d'environ 3 % de cellules

**CLASSIFICATION
FONCTIONNELLE**



CLASSIFICATION CYTOTOXIQUE



Adapté de SAWYER, 1994.

tableau 1-2 Classification de la toxicité cellulaire.

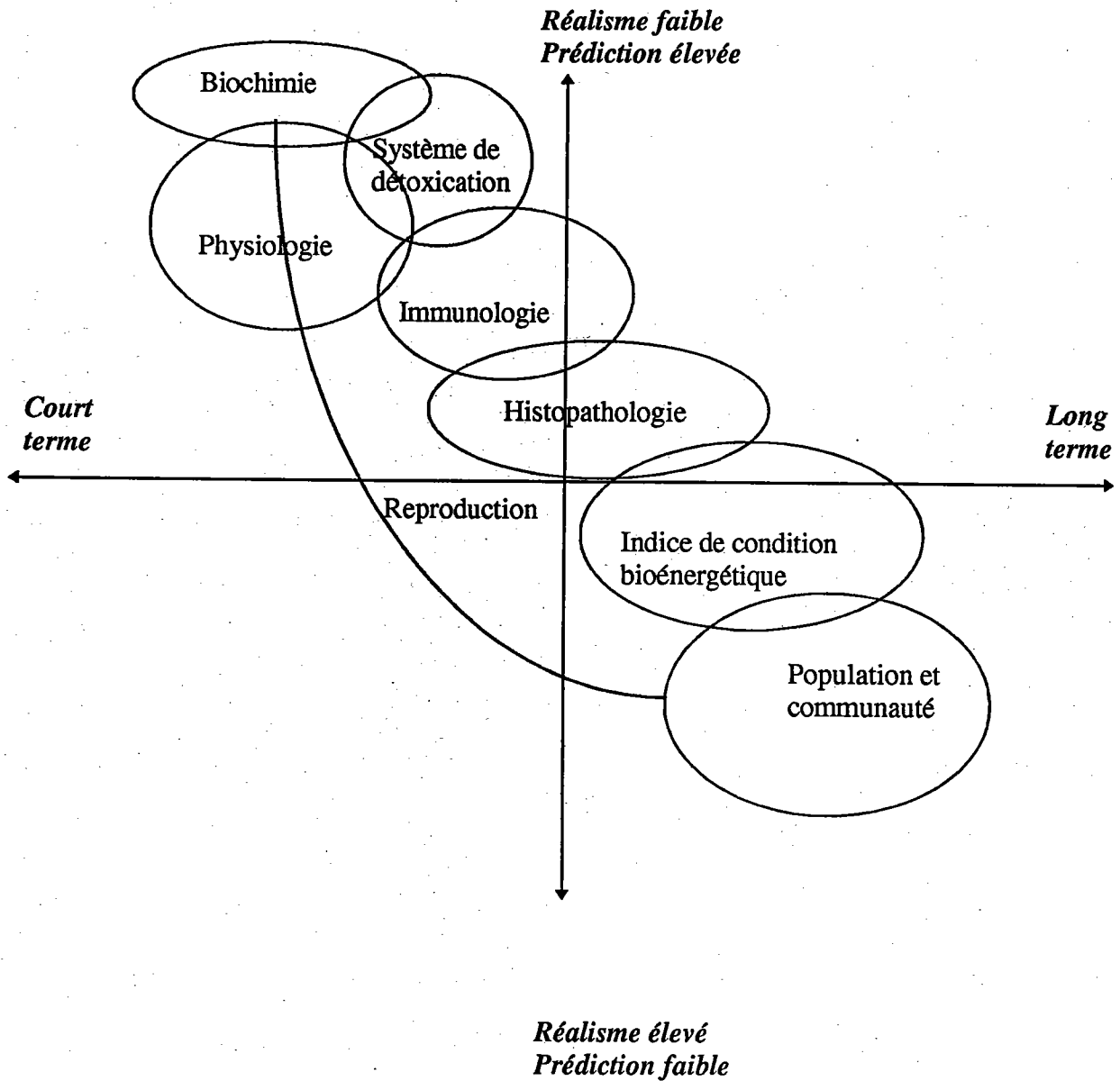
biliaires. Elle renferme aussi des macrophages et des érythrocytes ($< 0,1 \%$). En terme de viabilité, les hépatocytes de truite maintiennent pendant 4 jours leurs caractéristiques initiales. Après ce temps, leur viabilité diminue accompagnée de changements morphologiques.

1.4.3 Choix du modèle cellulaire

Pour appliquer des tests alternatifs en écotoxicologie, il faut admettre une certaine classification de la toxicité cellulaire (**tableau 1-2**). Les xénobiotiques peuvent agir au niveau de fonctions dites basales, spécifiques ou extracellulaires. Les *fonctions basales* représentent les réactions biochimiques fondamentales qui existent dans toute cellule pour maintenir l'intégrité des membranes, la phosphorylation oxydative dans les mitochondries, la transcription et l'activité des enzymes lysosomales. Ces activités métaboliques fondamentales se retrouvent chez la cellule quel que soit son état de différenciation. Les *fonctions spécifiques* dépendent du type de cellule et du degré de différenciation. Par exemple, les cellules épithéliales ciliées, les cellules musculaires et les cellules neurales ont des caractéristiques spécifiques. Enfin les *fonctions extracellulaires* des cellules représentent les activités de communication ou de médiation par la sécrétion de protéines, peptides ou hormones. Citons comme exemple, l'activité de sécrétion des neurotransmetteurs par les neurones ou bien du collagène par les fibroblastes pulmonaires. La classification de la toxicité cellulaire correspond donc à celle des fonctions cellulaires. Les altérations peuvent agir ainsi aux niveaux des fonctions basales, spécifiques et extracellulaires.

On parle de cytotoxicité basale lorsque le composé altère l'intégrité membranaire, interfère avec la synthèse mitochondriale d'ATP ou diminue la synthèse de protéine ou d'ADN. La cytotoxicité sur les fonctions spécifiques s'observe lorsqu'une substance inhibe, par exemple, la recapture de la noradrénaline dans les neurones ou diminue la synthèse de l'albumine dans les hépatocytes. Enfin, une cytotoxicité sur les fonctions extracellulaires survient lorsqu'une substance limite la sécrétion de collagène ou d'interleukine, par exemple. Notons qu'un effet sur les fonctions extracellulaires aura des conséquences sur les fonctions systémiques ou organisationnelles. Par exemple, une interférence dans l'action de l'acétylcholine peut entraîner la paralysie pulmonaire. Tout récemment, on a démontré que des cultures en trois dimensions sur des gels de collagène favorisent une organisation plus réaliste vis-à-vis de l'organe et qu'elles pourront servir de modèle intéressant pour évaluer les effets sur la communication extracellulaire ou la cancérogenèse *in vitro* (LADUCA et SINHA, 1994).

Pour évaluer la toxicité générale d'une substance, on peut utiliser un modèle cellulaire qui n'implique pas nécessairement des fonctions spécifiques ou extracellulaires. Une lignée cellulaire est normalement dépourvue de fonctions spécifiques mais maintient ses fonctions basales, communes chez toutes les cellules, et serait ainsi utile pour évaluer la toxicité de fonctions basales ou générales. Les cultures primaires exploitent des cellules directement prélevées de l'organe qui assurent les fonctions spécifiques de l'organe pour une certaine période. La durée est variable selon le type de cellules et dépend la plupart du temps des



Adapté de Adams, 1990.

figure 1-2 Continuum écotoxicologique.

constituants du milieu de culture et de la présence de certaines hormones et cofacteurs. Les cultures primaires d'hépatocytes représentent donc un modèle intéressant pour évaluer les fonctions spécifiques du foie, dont certaines sont essentielles dans le métabolisme des xénobiotiques. Les cultures primaires sont aussi utiles pour évaluer la toxicité basale des substances. Le modèle hépatocyte (MH) en culture primaire représente ainsi un bon compromis entre les fonctions basales et spécifiques pour évaluer la toxicité générale et la toxicité sublétales telle que l'induction des MT et du cytochrome P4501A1 (qui constituerait une caractéristique spécifique) par des xénobiotiques spécifiques. Quant à la génotoxicité, celle-ci résulte directement de l'action de certaines substances mais aussi du métabolisme oxydatif liés à d'autres xénobiotiques par le système de détoxification du cytochrome P450 dont l'hépatocyte abonde. Ainsi, dans le cadre d'études environnementales, l'hépatocyte de truite arc-en-ciel en culture primaire représenterait un système intéressant pour les recherches toxicologiques (BAKSI et FRAZIER, 1990).

1.5 Critères d'effets toxicologiques

Plusieurs critères d'effet peuvent être retenus dans les évaluations écotoxicologiques. Le choix des critères repose sur certaines considérations conceptuelles (**figure 1-2**). Premièrement, le critère de la toxicité létale, tant au niveau cellulaire qu' *in vivo*, doit être maintenu pour exprimer des dommages évidents chez le poisson. En se basant sur la notion de la continuité des effets

toxicologiques à partir de l'échelle moléculaire jusqu'à l'échelle des populations et des communautés (ADAMS, 1990; SCHULTE, 1989), les critères d'effets, qui sont précurseurs de dommages lors d'une exposition à plus long terme, sont importants en terme de prévention. L'idée principale, que l'on veut décrire ici, est l'utilité des mesures de stress subléthal au niveau moléculaire et physiologique. L'avantage de mesurer ou de suivre des effets au niveau moléculaire réside principalement dans la possibilité de prévenir des dommages qui pourraient survenir à des niveaux d'organisation plus élevée. En effet, la connaissance des mécanismes d'action des polluants aux niveaux biochimiques et cellulaires nous permettrait de prévenir des détériorations plus importantes au niveau de l'individu et de la population. Il ne faut toutefois pas limiter les études à ce seul niveau car on ne sait pas avec certitude si l'effet perçu au niveau moléculaire se répercutera à un niveau supérieur. L'utilisation d'indicateurs de niveaux d'organisation supérieurs est donc nécessaire pour confirmer ou infirmer le dommage mesuré à l'échelle moléculaire et cellulaire. Le suivi d'effets à l'échelle moléculaire offre donc un moyen utile d'évaluer le danger potentiel de divers échantillons liquides, en autres, au niveau ichthyen.

Il existe une panoplie de critères d'effets que l'on peut appliquer lors d'évaluations écotoxicologiques. Certains choix s'imposent, bien évidemment, afin de limiter le nombre de ces critères et faire une évaluation toxicologique pertinente et peu coûteuse. Dans le cadre de cette étude, nos recherches ont porté sur des mesures de létalité (cytotoxicité) et de subléthalité (induction de la métallothionéine (MT); induction du cytochrome P4501A1; la génotoxicité).

1.5.1 La mesure d'effets létaux

Au niveau cellulaire, la létalité se traduit par un arrêt de division cellulaire, une perte de la perméabilité membranaire et l'arrêt des fonctions fondamentales ou basales de la cellule (ZUCKER *et al.*, 1988). Une perte de viabilité cellulaire provoque un dysfonctionnement de l'organe atteint, une inflammation et éventuellement la mort de l'organisme. La mesure de la viabilité cellulaire est fondamentale également pour cerner les concentrations non létales susceptibles d'entraîner des effets à plus ou moins long terme. La perte de viabilité cellulaire équivaut à la mortalité chez l'organisme dans le contexte d'un test de substitution. Elle sera ici comparée en rapport avec la mortalité de truites exposées à des effluents industriels.

La mort cellulaire peut aussi se produire par apoptose (RAFFRAY *et al.*, 1993). Une cellule apoptotique se caractérise par une dégradation de l'ADN ayant des fragments distribués en échelle (« ladder-like ») tel qu'indiqué par l'électrophorèse et par une élévation du calcium intracellulaire libre qui stimule l'activité des endonucléases (DARZYNCHIEWICZ *et al.*, 1992). Par contre, la perméabilité membranaire ainsi que la synthèse d'ATP dans les mitochondries demeurent constantes. La cellule finit par se fragmenter en petites sphères qui sont éventuellement réabsorbées par les cellules voisines (RAFFRAY *et al.*, 1993; DARZYNCHIEWICZ *et al.*, 1992). La destruction de cellules par apoptose n'entraîne pas de

réaction inflammatoire dans le voisinage cellulaire. La mortalité occasionnée par des substances toxiques résulte le plus souvent d'une nécrose tissulaire plutôt que d'une apoptose. L'apoptose a été surtout signalée dans les cellules du système immunitaire et dans certaines cellules épithéliales. C'est le cas des thymocytes, des lymphocytes, et des hépatocytes (RAFFRAY *et al.*, 1993). Il faut toutefois tenir compte de ce type de mort cellulaire dans le mécanisme de la toxicité létale.

1.5.2 La mesure d'effets sublétaux

1.5.2.1 *L'agression par les métaux*

L'induction de la MT dans le foie ou les branchies est un indicateur bien connu d'une exposition à des métaux lourds, notamment par le cadmium, le cuivre, le zinc et le mercure (ROCH et MC CARTHER, 1984; HAMILTON et MERHLE, 1986). La recherche d'un rôle biologique pour le Cd a conduit à l'isolement d'une protéine riche en Cd (25 mg de Cd par gramme de protéines) dans le cortex rénal du cheval (KAGI et VALLEE, 1960). Cette protéine contenait 5 % de Cd, 2,2 % de Zn, 0,4 % de fer, 0,18 % de Cu, 14,9 % d'azote et 8,5 % de soufre. Puisque cette protéine contenait du soufre et plusieurs métaux, KAGI et VALLEE l'ont appelée métallothionéine (MT), c'est-à-dire, un dérivé métallo de la protéine riche en soufre qui est la thionéine. Les MT représentent des protéines de poids moléculaire de 6000-7000 g/mole qui sont

riches en cystéine (30 % des acides aminés); elles sont dépourvues d'acides aminés aromatiques, et donc de région hydrophobe, ce qui leur confère une thermostabilité caractéristique. Les MT sont omniprésentes dans les tissus et peuvent lier les métaux lourds divalents. Cette liaison dépend de la nature du métal; le zinc est celui qui se lie le plus faiblement en général, suivi du cadmium, du cuivre et du mercure. Cependant, plusieurs protéines isolées d'organismes vertébrés non-mammifères et invertébrés sont différentes de la MT de mammifères. En raison de cette diversité dans la structure moléculaire, on propose trois classes de MT (FOWLER *et al.*, 1987). Les MT de classe 1 sont celles qui possèdent les caractéristiques de la MT équine du cortex rénal citées précédemment. Elles se retrouvent principalement chez les vertébrés et quelques invertébrés et proviennent de mammifères, de poissons tels que *Pleuronectes platessa*, *Oncorhynchus mykiss* (KAGI *et al.*, 1984; PRICE-HAUGHEY *et al.*, 1986), de l'huître *Crassostera virginica* (ROESIJADI *et al.*, 1989), du crabe *Scylla serrata* (LERCH *et al.*, 1982) et du homard *Homarus americanus* (BROUWER *et al.*, 1989). Les MT de classe 2 comprennent les protéines qui ne démontrent que peu ou pas de ressemblance avec les MT de la classe 1 en ce qui a trait à la présence d'acides aminés aromatiques, à leur proportion en cystéines et leur poids moléculaire. On les retrouve chez la levure et l'ourson de mer (WINGE *et al.*, 1985; NEMER *et al.*, 1985). Enfin, les MT de la classe 3 comprennent les oligopeptides γ -glutamyle-cystéinyles isolés des plantes (GRILL *et al.*, 1985) et des micro-organismes *Euglena gracilis* et *Schizosaccharomyces pombe* (WEBER *et al.*, 1987; REESE *et al.*, 1988). Les discussions qui suivent se limitent aux MT de la classe 1.

La fonction physiologique de la MT, mis à part leur rôle dans la détoxification des métaux, serait en partie la régulation de l'homéostasie du cuivre et du zinc intracellulaire (COYLE *et al.*, 1994; KAGI, 1994; WEBB, 1986; GAGNÉ *et al.*, 1990) en plus d'assurer le maintien du statut d'oxydoréduction des cellules (SATO et BREMNER, 1993). La MT intervient dans le transport et le transfert du Cu et du Zn à des métalloprotéines (BROUWER *et al.*, 1989). De nombreux signes indiquent que la MT participe dans le transfert du Cu et du Zn lors du métabolisme des acides nucléiques, de la synthèse de protéines et d'autres processus métaboliques dans les tissus normaux ou endommagés. La réaction au froid, au chaud, à l'exercice et à la présence de xénobiotiques métalliques (et quelquefois organiques) peuvent induire les MT. Leur induction par le stress semble déclenchée par les hormones glucocorticoïdes (KARIN, 1985). La capture de radicaux libres, formés lors du métabolisme oxydatif dans les cellules, se fait par la MT. La distribution de métaux dans les tissus peut varier selon l'état nutritionnel, l'habitation, l'âge et le cycle reproducteur des organismes. On constate que la MT, une protéine de stress, n'est pas entièrement spécifique à une exposition aux métaux. Son induction s'avère toutefois le marqueur le mieux connu d'une telle exposition. Une induction de la MT dans l'organisme indique une probabilité que les métaux soient responsables de l'exposition, mais n'exclut pas la possibilité d'une induction par d'autres facteurs mentionnés précédemment. Ceux-ci peuvent être néanmoins contrôlés expérimentalement. On pourrait utiliser d'autres indicateurs en association avec la MT pour détecter/identifier une exposition spécifique aux métaux lourds. Par exemple,

une dégradation d'hémoprotéine comme le cytochrome P450 avec une élévation de l'hème oxygénase, une enzyme impliquée dans le catabolisme de l'hème, sont deux indicateurs d'effets qui pourraient aussi témoigner d'une exposition aux métaux, quoique non spécifiques à ces derniers. On reconnaît néanmoins que ceux-ci peuvent dégrader le cytochrome P450 et ils peuvent aussi induire l'hème oxygénase pour cataboliser l'hème qui serait libérée par les métaux (EATON *et al.*, 1980). L'accroissement de la fraction libre du Zn intracellulaire par les métaux constituera peut-être une nouvelle façon de mesurer le stress métallique (GAGNÉ et BLAISE, 1996). Il reste cependant à vérifier la spécificité de ce nouveau biomarqueur d'exposition aux métaux lourds.

Le phénomène de détoxification et de résistance aux métaux requiert la participation de la MT. La réduction de la forme libre du métal - la forme plus dangereuse - par la liaison sur la MT, explique le phénomène de la résistance. Le rôle de la MT dans la détoxification des métaux a été démontré, en particulier par le fait que : 1) l'induction de la synthèse de la MT s'accompagne d'une liaison de ces métaux; 2) le prétraitement avec des métaux accroît la tolérance lors d'une exposition aiguë subséquente; 3) certaines enzymes sont inhibées par le Cd²⁺ *in vitro* mais non par le Cd lié à la MT; 4) l'injection d'une faible dose de Cd ou d'une forte dose de Zn protège contre la nécrose testiculaire et les effets tératogéniques; 5) les cellules résistantes au Cd contiennent de la MT en plus grande quantité.

Lorsque la MT est présente en plus grande quantité, suite à une exposition sublétales aux métaux, la résistance de l'organisme à une exposition subséquente de métaux se trouve accrue (HAMILTON et MERHLE, 1986). Cette résistance est conséquente car elle protège l'organisme à des concentrations qui lui sont normalement mortelles (HAMER, 1986). En cas d'intoxication métallique, il y a une élévation de la MT pour réduire la perturbation de l'homéostasie du Cu et du Zn qui serait responsable de certaines manifestations pathologiques. Ainsi, une induction de la MT indique la possibilité d'une exposition à des métaux. La distribution des métaux sur la protéine peut aussi offrir une information intéressante. Lorsqu'ils saturer les sites de liaison de la MT, la toxicité peut s'accroître parce que l'exposition du métal dépasse la capacité de la MT de fixer les métaux excédentaires et peut ainsi réagir sur des sites intracellulaires sensibles. De plus, la MT saturée par les métaux ne peut plus jouer son rôle dans l'homéostasie du Cu et du Zn. Le rôle de détoxification des métaux par la MT est donc une extension de ses fonctions normales, qui sont le transport, le stockage et le transfert des métaux biologiquement essentiels tels que le Cu et le Zn.

1.5.2.2 L'agression par des substances organiques

La présence dans l'organisme de substances organiques, telles que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les biphényles polychlorés (BPC) et certaines dioxines et furannes, stimule

le système de biotransformation des xénobiotiques dans le foie et le rein principalement. Cette biotransformation des xénobiotiques a pour objectif de rendre ces derniers plus hydrosolubles (i.e. plus polaires) ce qui facilite leur élimination par voie aqueuse. La biotransformation possède un caractère biphasique. La première phase comprend l'oxydation, la réduction ou l'hydrolyse de la molécule; elle aboutit à l'addition ou la formation de groupements polaires sur la molécule rendue alors davantage hydrophile tandis que la deuxième phase implique sa conjugaison avec des molécules telles que le glucuronide, le glutathione, les acides aminés polaires et les sulfates. La première phase de la biotransformation constituant l'oxydation et la réduction des xénobiotiques, met en jeu le cytochrome P450, les flavines monooxygénases (amines oxydases), l'époxide hydrolase, les estérases, les amidases et les systèmes d'oxydoréduction d'alcools, de cétones et d'aldéhydes. Par exemple, l'alcool déshydrogénase et l'aldéhyde ou la cétone réductase sont des systèmes d'oxydoréduction impliqués dans la biotransformation.

Le système enzymatique le plus important de la biotransformation est celui de la grande famille du cytochrome P450. Le qualificatif « P450 » provient du fait que l'enzyme contient un pigment chromatique autour de 450 nm qui résulte du spectre différentiel entre la protéine oxydée et réduite lorsque cette dernière est saturée en monoxyde de carbone. Plusieurs isoformes identifiées sous une nomenclature reconnue forment des familles et des sous-familles du cytochrome P450. Il existe environ 150 cytochromes P450 différents selon leur degré d'homologie entre les séquences primaires (ARCHAKOV et DEGTYARENKO, 1993;

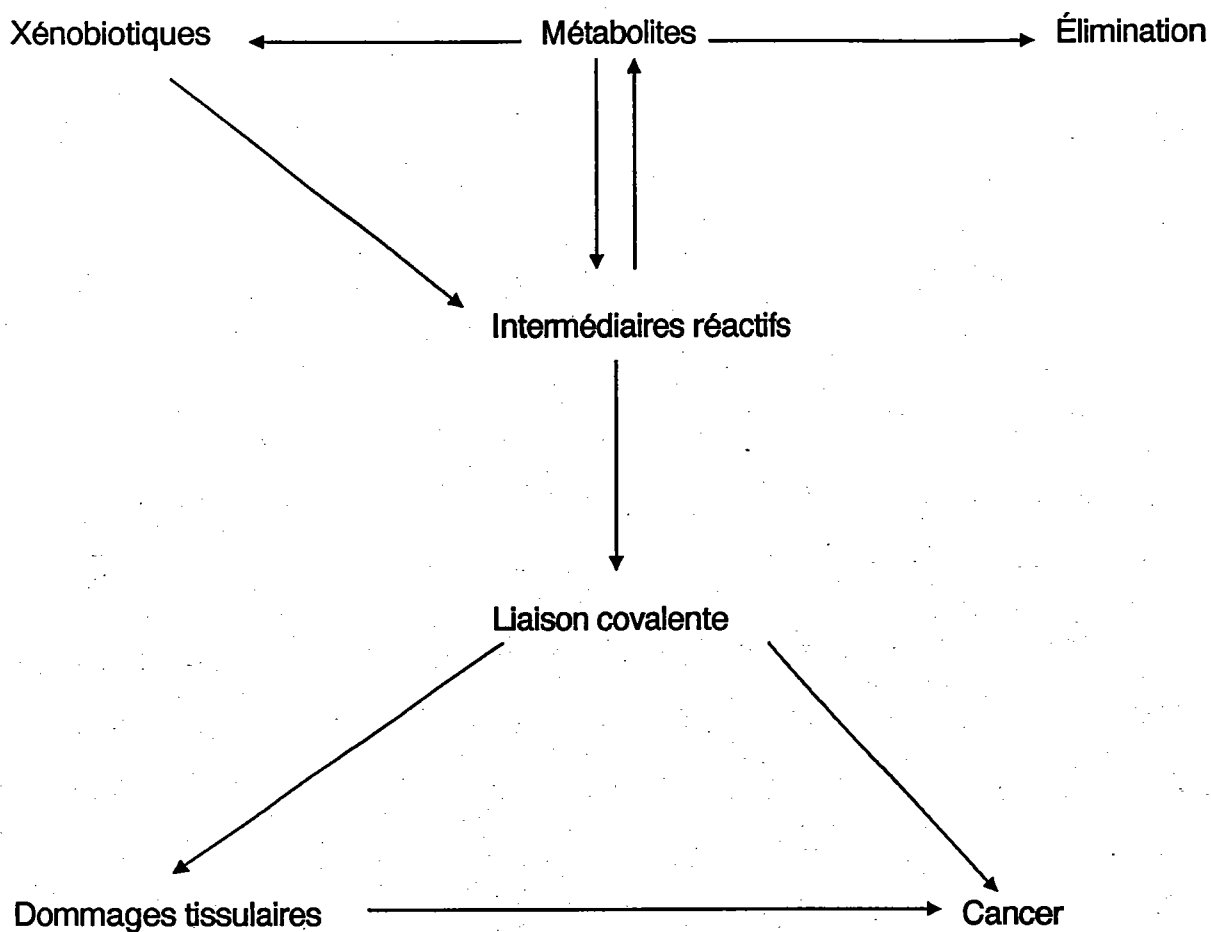
NÉBERT *et al.*, 1991). Les protéines, dont les séquences d'acides aminés démontrent des similarités d'au moins 40 %, forment les familles. Le chiffre placé après le terme « P450 » indique la famille (e.g. P4501). Les sous-familles regroupent au moins 59 % de similitudes dans les séquences primaires et une lettre majuscule suivant la famille les identifient (e.g. P4502B). Les cytochromes qui appartiennent à la même famille et sous-famille, mais qui présentent encore des différences, s'identifient par un chiffre placé après la sous-famille (e.g. P4501A1 ou 1A2). L'homologie de séquences sert de critère de classification, mais on ne tient pas compte des critères fonctionnels tels que la spécificité des substrats et l'inductibilité par les xénobiotiques. Ce type de classification possède néanmoins un intérêt au niveau de l'évolution et de la spéciation moléculaire du cytochrome P450 dans sa distribution phylogénétique.

Le cytochrome P450 est une hémoprotéine contenant un ligand hémique qui est localisée dans la membrane de la région lisse (où il y a absence de ribosomes) du réticulum endoplasmique (AHOKAS *et al.*, 1976). Le cytochrome P4501A1 est une monooxygénase qui catalyse l'introduction d'un atome d'oxygène sur le composé hydrophobe (A) :



Le NADPH est le cofacteur qui fournit l'électron nécessaire dans la réaction de monooxygénation. Cet électron est transféré du NADPH sur le cytochrome P450 par la NADPH

cytochrome P450 réductase qui est localisée dans le voisinage du P450 dans la membrane. Ainsi, la molécule (A-H) devient plus polaire par l'addition d'un atome d'oxygène (A-OH), ce qui facilite son élimination par voie aqueuse (i.e. le plasma sanguin et l'urine). Le produit oxydé peut ensuite être conjugué à des ligands polaires tels que la glycuronide, le glutathione ou d'autres peptides pour favoriser encore une fois l'excrétion. Un mécanisme impliquant un récepteur Ah (mis pour « aromatic hydrocarbon ») est à la base de l'induction du cytochrome P4501A1 (LORENZEN et OKEY, 1990). Certain HAP se fixe sur le récepteur qui est localisé sur la membrane cytoplasmique (EMA, 1992). Ce complexe pénètre ensuite dans le cytosol pour se lier à un deuxième ligand - la protéine de stress thermique 90 - pour prendre une forme active. Ce complexe ternaire diffuse alors dans le noyau pour y libérer la protéine de stress 90. Le récepteur Ah avec le HAP se fixe sur une région spécifique de la partie non transcrite du gène CYP1A1 située à l'amont du site de transcription du gène. Cette région nommée XRE pour «Xenobiotic response element» remplit la fonction de promouvoir la transcription du gène CYP1A1 (WILLIAMS et WEISBURGER, 1986; PESONEN *et al.*, 1992). Il existe une volumineuse documentation sur le sujet, et tenter de décrire d'une façon exhaustive ce domaine de la toxicologie et de la pharmacologie dépasserait largement les objectifs de ce travail. Les xénobiotiques qui peuvent se lier avec le récepteur Ah stimulent la synthèse du cytochrome P4501A1 afin de les rendre plus polaires pour favoriser leur excrétion. Une induction du P4501A1 dans un organe et dans ses cellules nous indique donc la présence de ces substances caractéristiques. Ceci signifie que, l'induction du P4501A1 est considérée comme « marqueur

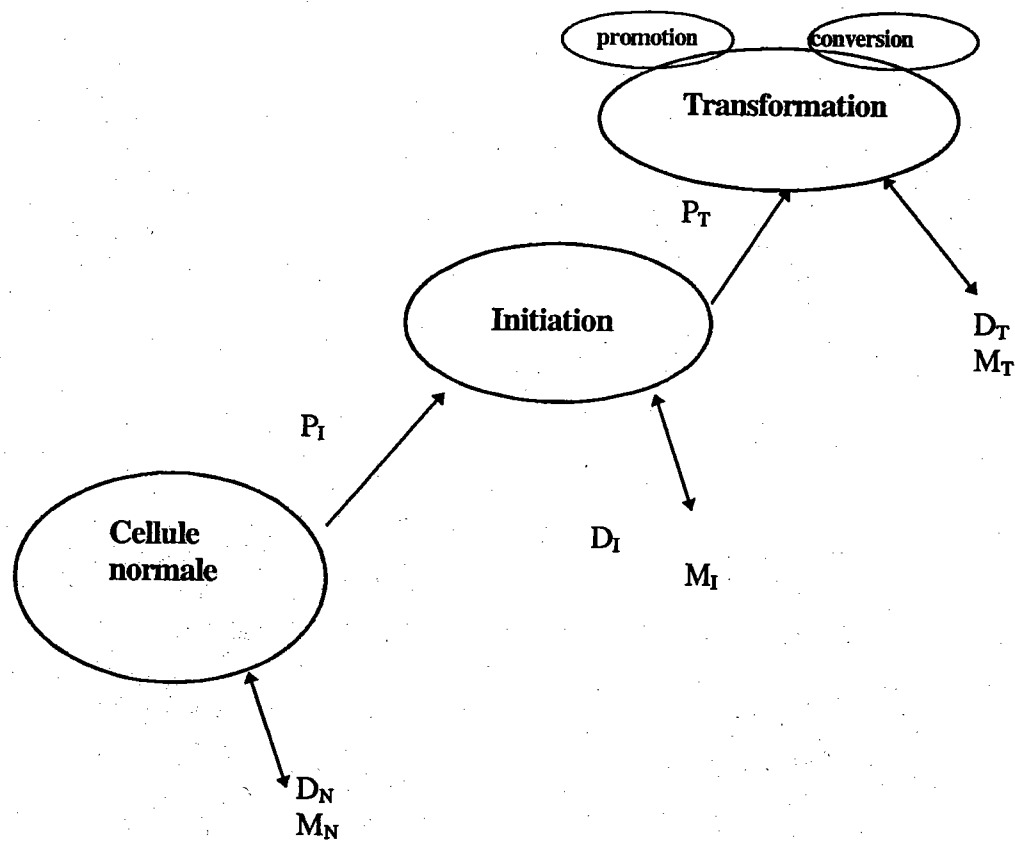


Tiré de WILLIAMS et WEISBURGER, 1986.

figure 1-3 Relations entre la biotransformation et la toxicité.

d'exposition » aux substances comme les BPC, les HAP, dioxines et furannes. Après biotransformation, certaines substances pourront devenir plus (géo)toxiques. C'est le cas, par exemple, du benzo(a)pyrène qui devient cancérigène lors de son activation métabolique par les enzymes de biotransformation.

Les enzymes de la phase 1 et 2 de la biotransformation des xénobiotiques rendent les substances lipophiles plus polaires afin de faciliter leur excrétion pour éventuellement les éliminer. Dans ce contexte, ces enzymes sont dites « de détoxification » (WILLIAMS et WEISBURGER, 1986). Cependant, la biotransformation ne se termine pas toujours en une **détoxification** des xénobiotiques mais peut aussi contribuer au phénomène de **bioactivation** des xénobiotiques. Dans de nombreux cas, le produit biotransformé devient plus réactif et peut agir sur différentes cibles telles que les protéines et l'ADN. Ceci est particulièrement vrai de certaines substances cancérigènes, en l'occurrence le BaP et les organophosphates. Les métabolites bioactivés peuvent être quelquefois identifiés selon leur demi-vie respective. Ils peuvent endommager les cellules ou l'organe ce qui pourra entraîner des manifestations toxiques telles que la nécrose tissulaire, la formation de cancer et la tératogenèse (**figure 1-3**). Par exemple, l'induction du cytochrome P450 chez le rat est quelquefois un paramètre biochimique qui peut favoriser les effets mutagènes des substances pures qui, dans certains cas, ne présentent pas de mutagénicité selon le test d'Ames (KITCHIN *et al.*, 1993; KITCHIN *et al.*, 1992).



Probabilité de formation d'une transformation néoplasique :
 $P \cong P_I \times P_T$

- D : taux de différenciation.
- M : index mitotique.
- P : probabilité de changement.
- N : cellule normale.
- I : cellule initiée.
- T : cellule transformée.

figure 1.4 Modèle de la cancérogenèse.

Tiré de Williams and Weisburger, 1986.

1.5.2.3 La génotoxicité

Les substances chimiques peuvent réagir sur l'ADN nucléaire pour produire des dommages. La formation d'adduits sur l'ADN peuvent entraîner la formation de bris, la dépurination, la dépyrimidination et la déamination des cytosines (BRUSICK, 1994). Ces dommages peuvent conduire à des changements dans la séquence des nucléotides. La réparation enzymatique peut alors favoriser la formation de mutations dans le génome si le nombre de sites endommagés devient suffisamment important. Par ailleurs, ces changements peuvent déstabiliser le fonctionnement des protooncogènes cellulaires et ainsi favoriser la transformation néoplasique des cellules. Les cellules mutées, qui demeurent vivantes, soutiennent le développement de tumeurs et peuvent entraîner la mort de l'organisme à plus long terme. La transformation néoplasique repose sur un modèle d'initiation et de promotion de cellules néoplasiques (**figure 1-4**). Une cellule normale se divise et conserve ses caractéristiques fonctionnelles dans des conditions dites saines ou normales. Un composé cancérigène, souvent bioactivé par la biotransformation, réagit avec les diverses protéines et l'ADN pour former un lien covalent ou bien une liaison par interaction hydrophobe. Le système de réparation de l'ADN répare dans la plupart des cas l'ADN endommagé; les autres molécules sont catabolisées ou éliminées et remplacées. Dans ces conditions, la cellule maintient son intégrité contre les effets immédiats des génotoxiques. Il se peut que le dommage puisse se fixer dans la cellule. Si celle-ci se divise

pendant que le dommage à l'ADN persiste suite à une exposition continue, alors des altérations permanentes peuvent survenir dans le génome à plusieurs niveaux (GODET *et al.*, 1993). Par exemple, ces dommages peuvent former des erreurs dans l'appariement des bases qui engendrent des mutations ponctuelles ou bien des erreurs qui favorisent le réarrangement de certains codons. Certains de ces réarrangements peuvent faire intervenir des séquences qui proviennent de certains proto-oncogènes c-myc, c-jos, c-jun, p53 (SMITH *et al.*, 1993) qui régulent la prolifération cellulaire, l'apoptose et la communication cellulaire. Des mutations peuvent transformer les proto-oncogènes en oncogènes et stimuler la prolifération cellulaire et la transformation néoplasique. Les cancers peuvent impliquer une activation d'oncogènes (COOPER, 1992) ou une répression d'anti-oncogènes et leur expression relative est utile pour évaluer le potentiel cancérigène des substances. Les interactions avec les protéines responsables de la régulation de l'expression génétique ou des changements dans l'activité enzymatique de la méthylation de l'ADN peuvent aussi nuire à la cellule d'une façon permanente (WILLIAMS et WEISBURGER, 1986). Par exemple, des interactions au niveau de l'appareil mitotique peuvent entraîner des pertes de fragments chromosomiques, voire même une perte d'un chromosome entier (aneuploïdie). Ce phénomène peut se traduire par des aberrations chromosomiques et la formation de micronoyaux visibles en microscopie (GODET *et al.*, 1993; FORNI, 1994). Les dommages permanents de l'ADN favorisent ainsi la transformation néoplasique. Celle-ci peut avoir lieu si la cellule initiée et endommagée est capable de proliférer. Les cellules anormales partiellement transformées peuvent être tout de même contrôlées dans le tissu par les facteurs de

régulation extracellulaire. Ces cellules peuvent se diviser pour former des lésions pré-néoplasiques. Durant ces étapes, des altérations additionnelles de l'ADN se traduisant par des mutations, des transpositions de séquences et des altérations des protéines qui peuvent réussir à transformer complètement le foyer de cellules. Ces cellules peuvent être maintenues à l'état dormant par les facteurs de régulation tissulaire gouvernée par la communication extracellulaire. Des changements dans les facteurs de croissance sont nécessaires pour favoriser l'évolution des cellules vers des lésions pathologiques. La transformation néoplasique est un processus multifactoriel qui met en jeu le métabolisme dans certains cas, l'altération de l'ADN et la formation de dommages persistants d'une génération cellulaire à l'autre, le dérèglement des oncogènes ainsi que la perte de communication extracellulaire. La probabilité d'une transformation est directement proportionnelle à la probabilité de générer une altération persistante et à celle de favoriser le clonage des cellules altérées. L'évaluation de dommages à l'ADN constitue la toute première étape dans la détection du potentiel cancérigène des polluants. La formation de cassures d'ADN indique que des dommages primaires s'installent sur l'ADN et qu'il y a risque de former des mutations (SNYDER et MATHESON, 1985). Par contre, le suivi des facteurs qui sont associés à promotion de cancers, tels que l'expression d'oncogène ou d'indicateurs de prolifération cellulaire (EVAN *et al.*, 1994), constitue aussi un domaine important de recherche pour prédire l'action de cancérigènes non-génotoxiques (agissant par des mécanismes dits « épigénétiques »). Citons en exemple, les esters de mirystate de phorbol qui ne

sont pas génotoxiques mais favorisent la promotion de cellules préalablement initiées (KOZA *et al.*, 1993).

Le dépistage de la génotoxicité des substances requiert un ensemble ou une batterie de bioessais. Lorsqu'on connaît la composition chimique d'un xénobiotique, on peut en apprécier le potentiel cancérigène à partir de sa structure moléculaire. L'électrophilicité des substances est souvent liée à la génotoxicité parce que les substances électronégatives peuvent réagir sur l'ADN (ROSENKRANZ et KLOPMAN, 1995). Pour évaluer le potentiel génotoxique, on peut faire appel à une série de bioessais *in vitro* de courte durée qui emploient des bactéries et des cellules de mammifères. La mutagenèse peut être évaluée avec le test d'Ames (MARON et AMES, 1983), test le plus souvent employé en mutagenèse expérimentale. Il mesure la mutation inverse de l'indépendance à l'histidine comme source de carbone chez des mutants de la bactérie *Salmonella typhimurium* qui deviennent dépendants de l'histidine. Il existe des souches qui sont dépourvues du système de réparation de l'ADN, dotées d'une paroi cellulaire plus poreuse, et qui contiennent un facteur génétique facilitant la mutation. Une autre souche s'avère sensible à l'oxydation. Au niveau des cellules eucaryotes, la réparation de l'ADN, les dommages chromosomiques, la mutagenèse et la transformation cellulaire sont les critères d'effet les plus souvent estimés. La mise au point d'un test de génotoxicité avec le modèle hépatocyte (MH) s'inscrit dans nos travaux au niveau d'une mesure de réparation de l'ADN dans le cadre d'un test *in vitro* de courte durée. Ces tests « de première ligne » permettent de juger du potentiel

mutagène d'une substance et, si celui-ci se confirme, des tests pourront alors être entrepris *in vivo*. Conclure qu'une substance est cancérigène basée sur un seul test bactérien seulement est évidemment à proscrire. On se doit d'obtenir au moins un résultat positif chez les bactéries et les cellules eucaryotes. Par la suite, on étudiera la capacité de la substance à promouvoir le développement des cellules initiées. Ces tests de promotion peuvent se réaliser autant *in vitro* qu'*in vivo*. À l'échelle *in vitro*, on peut utiliser divers indicateurs de prolifération cellulaire, par exemple l'activité de l'ornithine décarboxylase (EVAN *et al.*, 1994; MORKVE *et al.*, 1992), l'amplification d'oncogènes tels que le c-myc, Ki-67 et le p53, l'aneuploidie et la production d'échange de chromatides-soeurs (EVAN *et al.*, 1994; MORKVE *et al.*, 1992; KINSELLA et RADMAN, 1978). Dans certains cas, l'induction du cytochrome P450 peut aussi fournir une information sur la promotion des cellules initiées (KITCHIN *et al.*, 1992). Des substances qui agissent sur la communication cellulaire au niveau des jonctions intercellulaires (« gap junction ») peuvent aussi intervenir dans la promotion de cellules cancéreuses. Ce domaine a été jusqu'à ce jour très peu exploré dans les études écotoxicologiques qui emploient surtout des tests de génotoxicité de dépistage tels que le test d'Ames et des tests de réparation de l'ADN. On trouve cependant quelques études du genre dans la littérature récente (EVAN *et al.*, 1994; MORKVE *et al.*, 1992; LEE *et al.*, 1995; GOODWIN et GRIZZLE, 1994; PARSHAD *et al.*, 1994). Les modèles *in vivo* de promotion existent surtout au niveau du foie (GOODWIN et GRIZZLE, 1994). Après la caractérisation du potentiel promoteur des substances, on est alors en mesure de mieux estimer le potentiel cancérigène. Ces étapes se réalisent à partir d'études *in*

vivo destinées à confirmer le caractère cancérigène de la substance. On utilise alors, par exemple, des essais d'apparition de foci dans le foie de poisson ou de rat, de formation de tumeurs sur la peau de souris, d'induction de néoplasme pulmonaire chez la souris et d'incidence de cancer de la glande mammaire chez le rat. Après l'exécution de l'ensemble de ces tests, on est en mesure de préciser le potentiel cancérigène des substances qui repose sur le modèle actuel du développement de cancers (figure 1-4). On peut aussi considérer la génotoxicité comme un mécanisme qui conduit à des altérations géniques néfastes pour un individu ou une population sans qu'elle mène nécessairement vers le cancer (KURELEC, 1993).

Notre test de génotoxicité avec le MH s'insère à la première étape de l'évaluation du risque cancérigène et devrait être utilisé en association avec des tests bactériens de mutagénicité ou de génotoxicité. Parce que la génotoxicité chez la truite sert de support pour valider le MH, celui-ci serait de fait plus représentatif des effets *in vivo* que les tests bactériens. Les nouveaux bioessais devraient aussi étudier les caractéristiques non génotoxiques des cancérigènes, telles que les indicateurs de promotion de cellules.

1.6 Validation de tests cellulaires pertinents

Pour que le MH serve d'alternative au bioessai réalisé avec la truite arc-en-ciel, il faut d'abord le valider. La validation d'un modèle consiste à en caractériser les forces et faiblesses afin de démontrer que les résultats et les informations obtenus avec le modèle sont comparables à ceux

Modèle hépatocyte (MH)	Résultat du test	
	+	-
Bioessai avec Truite (BT)		
Toxique	a	b
Non toxique	c	d

$$\text{Sensibilité} = \frac{\text{Nombre de résultats positifs (MH+BT)}}{\text{Nombre total de réponses toxiques (BT)}} = \frac{a}{a+b}$$

$$\text{Spécificité} = \frac{\text{Nombre de non cytotoxiques (MH+BT)}}{\text{Nombre total de négatifs (BT)}} = \frac{d}{c+d}$$

$$\text{Valeur prédictive} = \frac{\text{Nombre de résultats toxiques (MH)}}{\text{Nombre total de résultats positifs (MH+BT)}} = \frac{a}{a+c}$$

$$\text{Concordance} = \frac{\text{Nombre total des prédictions correctes (MH+BT)}}{\text{Nombre total des échantillons}} = \frac{a+d}{a+b+c+d}$$

$$\text{Incidence} = \frac{\text{Nombre de toxiques (BT)}}{\text{Nombre total des échantillons}} = \frac{a+b}{a+b+c+d}$$

Adapté de SAWYER, 1994.

tableau 1.3a Définition des termes et concepts pour la validation de tests alternatifs.

Association des réponses		Modélisation
Corrélation paramétrique	→	Régression linéaire (quantitative)
Corrélation de rang*	→	Régression linéaire (semi-quantitative)

* Dans le cas d'une corrélation de rang, les valeurs de toxicité sont d'abord transformées en rang. Ensuite, la corrélation est étudiée entre les rangs. Une telle transformation offre plutôt une relation semi-quantitative.

Tableau 1-3b Validation statistique d'alternatives.

du bioessai truite. Encore faut-il que l'alternative soit ensuite utilisée adéquatement. Idéalement, les réponses générées avec le MH devraient correspondre de façon quantitative à celles du bioessai avec la truite à partir d'un modèle prédictif simple basée sur une régression linéaire.

La validation d'un modèle cellulaire comprend deux niveaux. Premièrement, du point de vue qualitatif, les critères suivants peuvent servir à en évaluer la performance : sensibilité, spécificité, valeur prédictive, concordance et incidence (**tableau 1-3**). La *sensibilité* du modèle informe sur sa capacité à mesurer un effet toxique réel. Par exemple, une *sensibilité* de 80 % nous informe que le modèle confirme une toxicité chez la truite dans 80 % des cas (effets positifs réels) avec une possibilité d'erreur de 20 %. Dans ce cas, le MH ne détecte aucun effet dans 20 % des échantillons (faux négatifs). La *spécificité* du modèle nous informe sur sa capacité à confirmer une absence d'effet toxique. Par exemple, une *spécificité* de 90 % indique qu'une absence de toxicité avec le modèle correspond à une absence de toxicité chez la truite dans 90 % des cas et que, dans 10 % des cas, le modèle mesure un effet même si le test truite n'en détecte pas. La *valeur prédictive* du modèle indique sa capacité à prédire un effet positif parmi les substances qui se révèlent toxiques pour la truite. Par exemple, une *valeur prédictive* de 60 % nous indique qu'une réponse positive avec le modèle correspond à un effet similaire chez la truite dans 60 % des cas et que cette correspondance est erronée dans 40 % des cas. La *concordance* du modèle nous renseigne sur le nombre de prédictions correctes par rapport au nombre d'échantillons testés. Par exemple, une *concordance* de 75 % indique que la prédiction est correcte dans 75 %

des cas, tant en ce qui concerne l'absence que la présence de toxicité, par rapport au nombre d'échantillons. Enfin, l'*incidence* du modèle nous renseigne sur l'obtention de réponses positives par rapport au nombre d'échantillons testés. Ce dernier critère est particulièrement utile si l'on veut comparer plusieurs alternatives par rapport au test de référence que l'on désirerait remplacer. Deuxièmement, d'un point de vue quantitatif, on doit mettre en évidence une association quantitative entre deux variables, c'est-à-dire la toxicité cellulaire avec celle de la toxicité pour la truite en ce qui concerne nos travaux (**tableau 1.3b**). Les données, transformées au besoin, peuvent être traitées avec un modèle de régression linéaire. On cherche donc à établir un modèle mathématique pour prédire la toxicité d'échantillons liquides (e.g. effluents industriels) pour la truite à partir du MH.

Une fois la validation terminée, un modèle cellulaire peut alors servir d'alternative. La normalisation d'une méthode alternative repose alors sur une procédure étagée (**tableau 1.4**). Une phase préparatoire à trois étapes est réalisée avant l'étape de l'évaluation qui soutiendra son acceptation comme alternative valable (CURREN *et al.*, 1995). La première étape consiste à raffiner la méthodologie. Elle fait souvent intervenir une deuxième équipe (laboratoire) qui devient responsable du raffinement méthodologique. Ce laboratoire ou ces équipes définissent un protocole adapté aux normes de bonnes pratiques de laboratoire (« Good Laboratory Practice ») ainsi qu'une procédure opérationnelle normalisée. La reproductibilité inter-laboratoire est éprouvée durant cette étape qui comprend aussi une évaluation critique du processus préparatoire

Étapes	Actions/produits
Pré-validation	
Phase 1 Raffinement du protocole expérimental	Protocole selon les normes (GLP*) Procédure opérationnelle normalisée (PON) Reproductibilité inter-laboratoire Évaluation de la progression vers la phase 2
Phase 2 Transfert du protocole expérimental	Transfert de la méthode selon la PON Déterminer la transférabilité inter-laboratoire Raffinement additionnel du protocole Publication de la PON dans INVITTOX** Évaluation de la progression vers la phase 3
Phase 3 Performance du protocole	Rajustement du modèle prédictif Essai avec des échantillons aveugles codés Préparation d'un rapport sur la performance Révision de la performance de la méthode Confirmation du pouvoir prédictif du modèle Recommandations pour la normalisation
Phase de la validation	
Phase 1 Validation formelle avec les autorités officielles	Implication des répondants externes
Phase 2 Évaluation de l'insertion dans le contexte de la communauté régulatrice	Évaluation indépendante avec des pairs externes
Phase 3 Améliorer la prédiction du modèle	Recommandations pour améliorer la prédiction
Phase 4 Recommandation visant à limiter tout changement dans la méthode	Éviter tout changement méthodologique pour assurer l'efficacité de la normalisation

Tiré de CURREN *et al.*, 1995

* GLP: «Good Laboratory Practice» ou bonne pratique de laboratoire.

** INVITTOX est un organisme à but non lucratif qui distribue les PON sur demande.

tableau 1.4 Étapes dans la normalisation des alternatives.

de normalisation. La deuxième étape est associée au transfert du protocole, ce qui demande la participation d'un troisième laboratoire désigné à cette fin. Ce transfert se fait avec la procédure opérationnelle normalisée qui est définie par le laboratoire responsable. La facilité du transfert méthodologique inter-laboratoire se détermine selon les données produites à la première étape. Le protocole peut être encore raffiné pour améliorer son transfert et soumis à l'organisme *INVITTOX* par exemple, qui distribue les protocoles normalisés utilisant les alternatives *in vitro*. La performance de la méthode est par la suite jugée dans une troisième étape. Celle-ci comprend une étude avec des échantillons codés (en aveugle) qui implique les deux laboratoires chargés de raffiner la méthode, le laboratoire désigné pour le transfert et au moins deux autres laboratoires. Dans cette dernière étape, le test alternatif est évalué à partir d'échantillons représentatifs de ceux qui seront évalués en routine. Un rapport statistique déterminera ensuite la performance du modèle et son potentiel prédictif. Cette phase préparatoire (à plusieurs niveaux) requiert donc la participation d'au moins quatre laboratoires en plus de celui qui a développé la méthode. Un comité de gestion est aussi désigné pour réaliser chacune de ces phases de façon concertée. Par la suite, la validation formelle débute pour normaliser l'alternative comme test de substitution. Les autorités officielles sont, par exemple, le centre européen de validation de méthodes alternatives (ECVAM), le centre d'alternatives pour les tests avec les animaux (CAAT) aux États-Unis, des organisations gouvernementales telles que le ZEBET en Allemagne et l'agence du comité de coordination pour la validation de méthodes alternatives (ICCVAM) aux États-Unis. L'application de l'alternative par les organismes de réglementation nécessite une consultation

avec des groupes externes. Le potentiel prédictif peut être encore amélioré à cette étape à l'aide de suggestions ou de critiques pertinentes. Enfin, on suggère de limiter tout changement méthodologique. La validation d'une méthode pour la normalisation est donc une procédure laborieuse qui doit toujours être précédée d'une étape préparatoire.

2. Objectifs généraux du travail expérimental

Afin de réduire le nombre de poissons dans les essais de toxicité, de réduire leurs coûts, et de rendre les bioessais plus rapides tout en accroissant leur rendement bioanalytique, on suggère une alternative qui exploite une culture primaire d'hépatocytes de truite arc-en-ciel. Le critère de mesure de la viabilité chez ces hépatocytes sera comparé avec celui de la mortalité chez la truite. Dans le même but, le bioessai faisant appel au réactif bactérien Microtox®, sera aussi étudié comme test alternatif mais seulement vis-à-vis du critère de mortalité chez la truite. Le MH et le Microtox® seront validés selon les principes décrits aux **tableaux 1-3a** et **1-3b**. Cette validation établira de manière quantitative les avantages et les limites du modèle alternatif vis-à-vis du test avec la truite.

L'évaluation de l'induction de la MT, du cytochrome P4501A1 et de la génotoxicité sont des critères d'effets sublétaux d'intérêt pour l'étude de mélanges complexes tels que les extraits de

sédiments, les rejets industriels, les effluents municipaux et les eaux de surface. Ces effets sublétaux représentent une information toxicologique pertinente puisqu'ils sont à la base du développement et de la progression de la toxicité. Dans ce contexte, la mesure de ces critères d'effet s'avère cruciale dans la prévention des dommages des mélanges complexes. Ils seront donc aussi évalués dans notre comparaison MH/test truite, décrite dans les chapitres suivants, à partir d'échantillons représentant diverses matrices environnementales.

Expérimentation

3. Développement de mesures de sublétalité avec la truite

3.1 Introduction et objectifs

La compréhension des phénomènes toxiques attribuables à une contamination toujours croissante des populations et des communautés de poissons requiert une approche multidisciplinaire. Cette approche évalue, par exemple, l'impact des effets des polluants à l'échelle moléculaire, cellulaire, tissulaire et des organes, comportementale, pathologique et écologique (SINDERMAN, 1988; ADAMS *et al.*, 1989). Les tests de dépistage pour détecter la présence de substances potentiellement dangereuses dans les sources ponctuelles de rejets doivent être au premier plan des stratégies de protection environnementale. Les MT et les oxydases à fonctions multiples, particulièrement la 7-éthoxyrésorufine O-dééthylase (EROD), sont deux systèmes de détection et de prévention des dangers potentiels des polluants du milieu aquatique. Tous deux sont utiles pour suivre des changements à l'échelle biochimique et physiologique chez des poissons exposés en laboratoire ou dans le milieu naturel près de zones polluées (NEFF, 1985).

Les effluents industriels sont des sources importantes de contamination de l'écosystème aquatique (BERGMAN *et al.*, 1986 ; OECD, 1987 ; BLAISE *et al.*, 1988), en plus de leurs possibilités à induire la MT et les MFOs (PAYNE, 1984 ; NEFF, 1985 ; VINDIMIAN *et GARRIC*, 1989). Les effluents industriels des fabriques de pâtes et papiers sont particulièrement connus pour leur toxicité (sub)létale à l'égard du poisson (COUILLARD, 1980 ; HOLMBOM *et*

LEHTINEN *et al.*, 1990 ; BLAISE *et al.* , 1986 ; KOVACS, 1986 ; BLAISE et COSTAN, 1987 ; ENVIRONNEMENT CANADA, 1987 ; SODERGREN, 1987). Ces effluents contiennent une multitude de produits chimiques (HOLMBOM et LEHTINEN, 1980 ; KRINGSTAD et LINDSTROM, 1984 ; ENVIRONNEMENT CANADA, 1987) dont certains peuvent induire les systèmes de détoxification, autant chez les poissons vivant en milieu naturel que chez ceux exposés en laboratoire (FORLIN *et al.*, 1985, SODERGREN, 1987 ; LINDSTROM-SEPPA et OIKARI, 1990 ; MUNKITTRICK *et al.*, 1991 ; SMITH *et al.*, 1991 ; HODSON *et al.*, 1992 ; OIKARI *et al.*, 1988 ; ANDERSON *et al.*, 1987). Plusieurs expériences en laboratoire entreprises avec des effluents pendant des périodes d'exposition plus ou moins longues (semaine ou mois) ont montré des effets sur l'activité hépatique du métabolisme des xénobiotiques (ANDERSSON *et al.*, 1987 ; OIKARI *et al.*, 1988 ; LEHTINEN *et al.*, 1990). Certains groupes ont aussi observé des inductions significatives des enzymes cytochrome P450-dépendantes avec des périodes d'exposition variant de 3 à 5 jours seulement (LIDMAN *et al.*, 1976 ; ADDISON *et al.*, 1981 ; FINGERMAN *et al.*, 1983).

Le laboratoire d'écotoxicologie aquatique du Centre Saint-Laurent réalise couramment des essais de toxicité létale de 96 h sur des effluents industriels, selon une procédure normalisée, pour réglementer et contrôler leurs déversements dans le fleuve Saint-Laurent (ENVIRONNEMENT CANADA, 1990). Nous jugions donc intéressant de compléter ce type de bioessai par des tests sublétaux tels que la mesure de la MT et de l'activité du cytochrome P450 1A1 (EROD). On

optimiserait ainsi l'information toxicologique obtenue ainsi que la rentabilité du bioessai avec truite. Nous avons tenté de répondre aux questions suivantes : est-ce qu'une induction significative de la MT ou de l'EROD hépatique peut être mesurée après une exposition de 96 h à des effluents de pâtes et papiers de la région du Québec ? Si oui, existe-t-il des liens entre la toxicité létale et la capacité d'induire la MT ou l'EROD hépatique ? Est-ce que les données (sub)létales peuvent discriminer entre les différents procédés et traitements industriels ? Cette procédure expérimentale pourrait-elle servir pour le dépistage de la toxicité (sub)létale ?

Dans cette étude préliminaire, on démontre que la MT et les OFM (particulièrement l'EROD) peuvent être induites chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) après une exposition sublétale de 96 h à une douzaine d'effluents d'usines de pâtes et papiers. Des interférences dans les mesures de la MT et de l'activité des OFM lors d'une exposition à des mélanges complexes d'effluents font aussi l'objet d'une discussion approfondie. Nous insistons sur le fait que nous voulons examiner la possibilité de ces deux paramètres d'effet biochimique à déterminer la présence de substances dangereuses et biodisponibles dans les effluents industriels lors des essais routiniers effectués par notre laboratoire.

3.2 Méthodologie

3.2.1 Exposition des truites

Effluent	Procédé ^a	Traitement ^b	CL50 (% v/v) ^d	Concentration des effluents utilisée avec le facteur d' induction de la MT et de l'OFM ^d			Rapport L/S ^e de toxicité létale (L) et sublétales (S) ^f observé	
				MT	OFM		L/S (MT)	L/S (MFO)
1	PTM	1	4,2-5,6	0,56	1	1,8	4,9	nd ^g
2	PTM	1	5,6-7,5	0,4 ^h	0,1 ^h	0,3 ^h	6,6	11,8
3	GWMP	1	6,3	0,56	1	1,8	11,3	6,3
4	PTM	1	8,4	0,56	1	1,8	4,7	15
5	PTM,PTC	1	9	0,56	1	1,8	9	5
6	PTM, PSC	1	10-18	0,56	1	1,8	25	25
7	PK	1	18-24	0,56	10	18	3,8	3,8
8	PTM, PCP	1	24-42	0,56	1	1,8	33	59
9	PK	1	24-42	0,56	10	18	5,9	33
10	PK	2	24-42	0,56	10	18	7,5	<2,3
11	PSC,PGWM	2	42-56	0,56	10	13,5	8,8	8,8
12	PK	2	65-100	0,56	10	18	4,6	<4,6

a. PTM (pulpe thermo-mécanique), PK (pulpe Kraft), PGWMP (pulpe mécanique <<groundwood>>), PTC (pulpe thermochimique) et PSC (pulpe sulfite chimique).

b. 1 : traitement primaire; 2 : traitement primaire et secondaire.

c. Lorsque le nombre de concentrations d'effluent était insuffisant pour déterminer la concentration par laquelle 50 % des poissons meurent, un intervalle de concentrations est fourni (ex. : 18-24% pour l'effluent 7). Les valeurs spécifiques de CL50 sont calculées selon l'analyse Probit (Litchfield et Wilcoxon, 1949).

d. MT: métallothionéine, OFM : oxydase à fonctions multiples : spécifiquement l'activité de l'EROD.

e. Concentration minimale avec effet observé (CMEO) pour la MT et l'OFM (EROD). Une induction statistiquement significative par rapport au groupe témoin est indiquée par le symbole *.

f. Dans l'analyse du rapport L/S, la valeur médiane de la CL50 est déterminée pour les effluents ayant un intervalle de concentrations (effluent 1 : CL50 médiane 4,2 + 5,6/2 = 4,9. Les rapports L/S sont calculés avec la valeur CMEO obtenue pour la MT et l'OFM (effluent 1: rapport L/S pour la MT = 4,9 % v/v / 1 %v/v = 4,9).

g. Non calculé à cause de l'effet de dégradation sur les OFM.

h. Même si la valeur du facteur d'induction est élevée, la variabilité des réplicats est telle que la significativité n'est pas valable.

tableau 3.1 Caractéristiques toxicologiques des effluents de pâtes et papiers.

Les effluents industriels servant à nos évaluations sont prélevés dans le cadre d'un programme de surveillance des rejets industriels des usines de pâtes et papiers de la région du Québec pour caractériser leur toxicité létale. Les poissons exposés à ces effluents servent aussi à étudier leurs potentiels à induire les MT et les OFM. Les effluents d'usines de pâtes et papiers proviennent de plusieurs procédés industriels et ont subi ensuite un traitement primaire suivi ou non d'un traitement secondaire (**tableau 3-1**). Un échantillon représentatif de 400 L de l'effluent à tester est prélevé sur 24 h selon le protocole d'Environnement Canada (VEZEAU, 1982) et acheminé dans nos laboratoires pour les bioessais et les analyses chimiques suivantes : métaux (APHA, 1989), HAPs, BPC, dioxines et furannes (US EPA, 1982). L'évaluation de la toxicité létale de ces effluents se réalise à l'aide d'un bioessai statique de 96 h recommandé par Environnement Canada (1990) avec des alevins de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) de $5,5 \pm 0,3$ cm et $2,3 \pm 0,4$ g. Les tests sont entrepris à 15°C à différentes dilutions de l'effluent industriel : 0..., 5,6, 7,5, 10, 13,5, 18, 24, 42, 56, 65, 100 % v/v, dans des contenants renfermant un volume de 60 L et 10 poissons. Au préalable, on réalise un test préliminaire de 24 h afin de connaître l'intervalle de concentrations entraînant la toxicité létale. Ce test consiste à exposer 4 poissons dans des béciers de 5 L aux dilutions de: 0, 1, 10, 50 et 100 % v/v. Étant donné que la mortalité s'exprime normalement dans les 24 premières heures (BLAISE et COSTAN, 1987), ce test préliminaire nous permet de sélectionner une plage de concentrations n'entraînant aucune mortalité manifeste (**tableau 3-1**). Ce test permet également de fixer la plage optimale de concentrations pour calculer la concentration létale qui tue 50 % des poissons (CL50). Ainsi, le choix de trois

concentrations non létales pour évaluer le potentiel d'induction de la MT et des OFM se base sur le test préliminaire. Pour le bioessai de 96 h, on prépare 4 sous-échantillons des trois concentrations non létales retenues, afin de déterminer la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et la concentration minimale sans effet observé (CMSEO).

3.2.2 Préparation de l'homogénat

Après la période d'exposition (96 h), les truites sont recueillies puis légèrement anesthésiées par une immersion dans une eau non chlorée contenant 25 mg/L de tricaine méthanesulfonate (MS 222) pendant 50 sec à 15 °C. Cette concentration optimale a été déterminée au préalable pour mesurer les inductions de la MT et des OFM chez les truites pour tous les effluents étudiés. Après décapitation, le foie est retiré de la cavité abdominale, puis rincé dans une solution isotonique à 4 °C contenant 154 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl et 1 mM d'EDTA dont le pH est ajusté à 7,4. On retire les foies (10 par sous-échantillon) de ce milieu de lavage et on les place dans une solution tampon de Tris-acétate 20 mM, pH 8,0, contenant 250 mM de sucrose et 2 mM de dithiothréitol (DTT). On broie les foies à 4 °C à l'aide d'un homogénéisateur de tissu muni d'un piston en Téflon et l'homogénat est centrifugé à 10 000 x g pendant 30 min à la même température. On retire délicatement le surnageant (S₁₀) puis on le congèle à - 85 °C. Un échantillon de 25 µL est préalablement récupéré pour déterminer les protéines totales à l'aide de

solution étalon d'albumine selon la méthode employant le bleu de Coomassie (BRADFORD, 1976).

3.2.3 Évaluation de la concentration de la métallothionéine hépatique

La quantification de la métallothionéine hépatique se fait selon la méthode de saturation à l'argent de SCHEUHAMMER et CHERIAN (1986) modifiée selon GAGNÉ *et al.* (1990). Brièvement, on dénature environ 200 μL du surnageant (S_{10}) dans un bain d'eau bouillante pendant 3 min, puis on élimine les protéines dénaturées par une centrifugation de 10 000 x g pendant 2 min. Un volume de 50 μL du surnageant est saturé avec 50 μL de la solution d'Ag à 20 ppm dans le tampon de glycine à 500 mM, pH 8,5, pendant 5 minutes à la température de la pièce. On complète ensuite le volume à 1 mL avec la solution tampon de glycine à 500 mM, pH 8,5. On ajoute 100 μL d'une solution d'hémoglobine (Hb) à 2 % et on incube le mélange pendant 5 min. On élimine l'Hb comme décrit ci-haut et on le précipite du milieu à l'aide d'une centrifugation à 10 000 x g pendant 3 min. On répète les étapes de l'ajout de l'Hb/dénaturation thermique/centrifugation une dernière fois. L'Ag qui demeure dans le surnageant est évalué par spectroscopie d'absorption atomique dans un four au graphite muni d'un correcteur d'interférence spectrale par effet « Zeeman » (Varian AA-300/400). Les niveaux de MT sont calculés en assumant que 17 moles d'Ag se lient à une mole de MT (SCHEUHAMMER et CHERIAN, 1986). Ce rapport a été vérifié maintes fois avec des standards de MT de rat ou de

lapin qui étaient ajoutés dans les échantillons (le S₁₀). On définit une unité équivalente de MT mammalienne correspond à 1 pmole de MT calculée/mg protéine dans le S₁₀ parce que le ratio est obtenu à partir de la MT de mammifère.

3.2.4 Détermination de l'activité du P4501A1

L'activité du cytochrome P4501A1 est mesurée par l'essai de la 7-éthoxyrésorufine O-dééthylase (EROD) selon la méthode initiale de PROUGH *et al.* (1978). La concentration finale du substrat était de 1 mM et la concentration du NADPH était de 100 mM. Le tampon d'essai contenait 10 mM de dicoumarol pour empêcher la quinone oxido-réductase de réduire la 7-hydroxyrésorufine en un composé non-fluorescent (NIMS *et al.*, 1984). Parallèlement, on détermine la quantité totale du cytochrome P450 par la méthode du spectre différentiel du P450 saturé en monoxyde de carbone entre la forme oxydée et réduite avec le sodium dithionite. On rajoute au préalable de la phénazine éthanesulfonate et d'ascorbate dans la solution (JOHANNESSEN et DE PIERRE, 1978) afin de corriger les interférences spectrales provenant de la présence de l'hémoglobine et de la méthémoglobine qui contaminent les homogénats et le S₁₀ de foie de truite.

3.2.5 Traitement statistique des données

L'analyse statistique consiste en une analyse de variance des données biochimiques (MT, OFM, cytochrome P450) pour les truites non exposées et celles exposées à trois concentrations

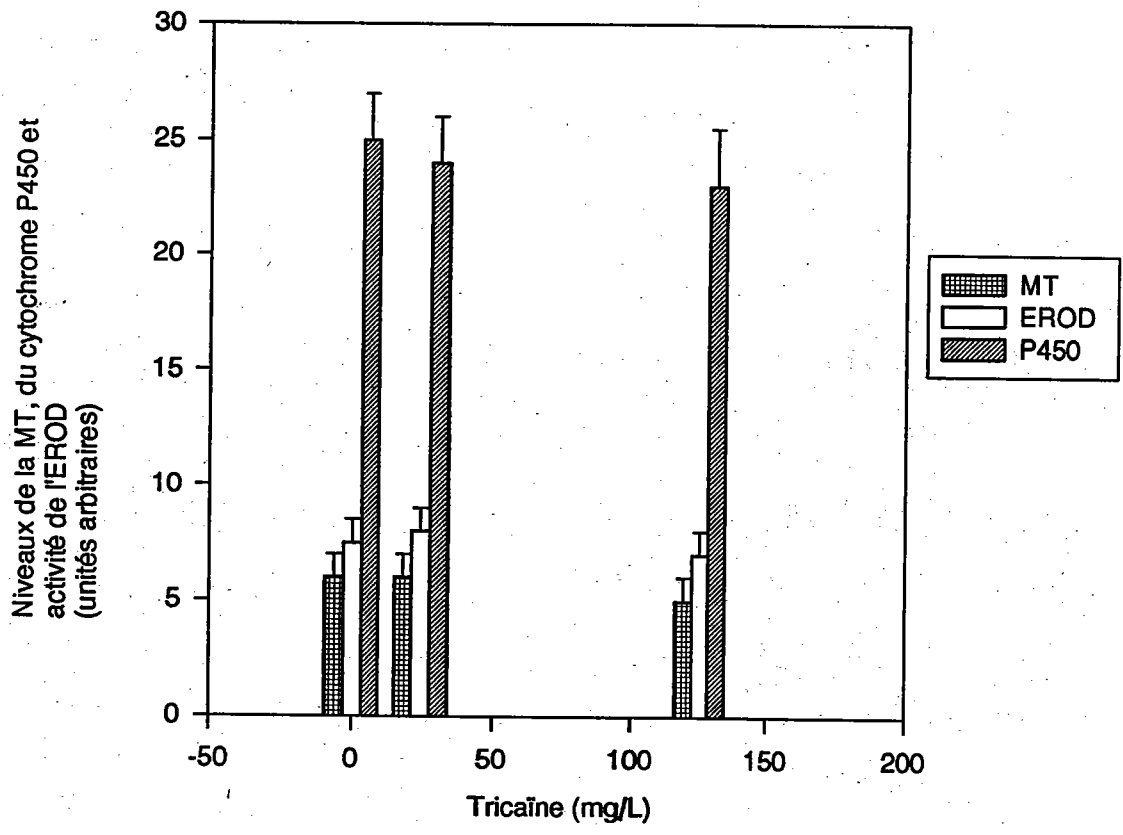


figure 3.1 Effet de la tricaine sur les niveaux de la MT, de l'EROD et du cytochrome P450 total. Les truites ont été exposées à la tricaine pendant 50 sec. Les barres représentent la moyenne de 4 sous-échantillons subdivisés avec l'erreur standard. Aucun effet significatif n'est observé.

sublétales de l'effluent. Le test *t* de Dunnett confirme une différence significative entre le groupe non-exposé et les groupes exposés à l'effluent industriel. Le seuil significatif est fixé à $p < 0,05$.

3.3 Résultats et discussion

3.3.1 Effet de l'anesthésie générale avec la tricaine

Des baisses significatives dans l'activité du cytochrome P450, dont l'EROD, peuvent survenir chez le poisson exposé à de fortes concentrations de tricaine (CHEVION *et al.*, 1977 ; FABACHER, 1982). Nous nous sommes assurés de l'absence de cette interférence dans nos analyses biochimiques (MT et EROD) en réalisant une expérience confirmant une plage de concentrations de tricaine dépourvue d'effets. Une exposition de 50 sec à 25 mg/L de tricaine n'entraîne pas de réduction significative des niveaux de MT, du cytochrome P450 total et de l'activité de l'EROD (**figure 3-1**). Aucun effet notable ne s'est produit à la concentration de 125 mg/L de tricaine pour la même période d'exposition. Cette concentration (125 mg/L) est légèrement supérieure à celle utilisée par FABACHER (1982) (112,5 mg/L) avec une durée d'exposition de 5 min. Selon ces résultats, rien n'indique que notre procédure d'anesthésie puisse donc interférer avec les analyses des paramètres biochimiques.

3.3.2 Effets toxiques des effluents d'usines de pâtes et papiers

Les douze effluents démontraient invariablement des effets (sub)létaux, quels que soient les procédés de production et le type de traitement de l'effluent (**tableau 3-1**). Sur le plan de la létalité, les effluents qui résultent d'un traitement primaire et secondaire étaient moins toxiques (effluents 10-12) que n'ayant subi qu'un traitement primaire (effluents 1-9). Cette observation correspond à d'autres études soulignant l'effet bénéfique de faire suivre le traitement primaire par un traitement secondaire (BLAISE *et al.*, 1987).

On remarque des inductions significatives de la MT et de l'EROD dans le foie de truites exposées aux effluents de fabriques de pâtes et papiers, sauf pour l'effluent 1, pour lequel l'activité de l'EROD était significativement réduite, et pour les effluents 10 et 12 où aucune induction significative de l'EROD n'a été obtenue. La MT et l'EROD sont induites généralement à des concentrations plus élevées pour les effluents ayant subi un traitement primaire et secondaire que pour ceux issus d'un traitement primaire seulement. Quoique le choix des concentrations des effluents dépende en partie du test préliminaire de 24 h, des seuils d'induction plus faibles des effets sublétaux sont observés à mesure que la toxicité létale de l'effluent augmente. Ceci corrobore des observations déjà obtenues avec d'autres indicateurs biochimiques sublétaux (BLAISE *et al.*, 1986).

Le quotient de la létalité sur la sublétalité (L/S) du **tableau 3-1** indique que la CMEQ d'induction de la MT et de l'EROD correspond aux concentrations d'effluents qui sont respectivement de 3,8

à 33 et de 3,3 à 59 fois plus faibles que les CL50 correspondantes. Les quotients L/S les plus élevés provenaient des effluents 6 (L/S de 25 pour la MT et l'EROD) et 8 (L/S de 33 et 59 pour la MT et l'EROD, respectivement). Dans ces mélanges complexes (i.e. effluents industriels), les substances responsables de la toxicité létale ne sont pas nécessairement les mêmes que celles induisant les effets sublétaux (induction de la MT et de l'EROD). Néanmoins, l'étude des quotients L/S pour entrevoir des liens entre la létalité et la sublétaleté est un domaine intéressant de recherche car il pourrait amener à la possibilité de prédire l'intensité de certains effets sublétaux à partir d'un effet sublétalet. Les objectifs à court terme de notre laboratoire, cependant, se limitent à optimiser l'essai de sublétaleté avec le test réglementé de létalité avec la truite en l'appliquant à d'autres secteurs industriels tels que la pétrochimie, la production de produits organiques et inorganiques et la métallurgie.

Après une exposition de 96 h à des effluents d'usines de pâtes et papiers, des inductions significatives de la MT (de 1,3 à 2,5 fois par rapport aux truites non exposées) et de l'EROD (1,3 à 9,4 fois par rapport aux truites non exposées) sont observées (**tableau 3-1**). Ces facteurs d'induction sont généralement plus faibles par rapport à ceux observés chez des poissons exposés pendant de longues périodes à des effluents semblables (LINDSTROM-SEPPA et OIKARI, 1989). Nos résultats indiquent néanmoins que des substances présentes dans les effluents d'usines de pâtes et papiers peuvent induire la MT et l'EROD soit par absorption de substances à partir de la colonne d'eau, soit par ingestion de particules en suspension dans l'effluent.

Les résultats obtenus avec l'EROD concordent avec d'autres études chez des poissons exposés à des rejets de papeteries. Chez *Myoxocephalus quadricornis* exposé de 5 à 9 mois à un effluent de pins et de bouleaux, l'activité de l'EROD était augmentée de 3 à 5 fois par rapport aux poissons non exposés (ANDERSSON *et al.*, 1987). Chez des truites immatures (*Oncorhynchus mykiss*) exposées 7 semaines à 2 concentrations (0,05 et 0,25 p.100 v/v) de 6 effluents de pâtes et papiers, l'induction était augmentée de 6 fois par rapport aux truites témoins (LEHTINEN *et al.*, 1990). MATHER-MHAICH et DIGIULIO (1991) ont pour leur part observé des inductions d'EROD qui étaient de 3 à 10 fois supérieures au groupe des témoins sur des poissons chats (*Ictalurus punctatus*) exposés à un effluent (10, 20 et 40 p.100 v/v) pendant 1, 3, 7 et 14 jours, ce qui se rapproche de notre durée d'exposition (96 h). Leurs résultats montraient des inductions d'EROD de 3 à 8 fois la valeur du groupe de référence après 1 et 3 jours d'exposition. Enfin, l'induction de l'activité du «arylhydrocarbon hydroxylase» (AHH), qui constitue une autre façon de mesurer enzymatiquement l'induction du cytochrome P4501A1, chez des suceurs blancs (*Catostomus commersoni*) pêchés à 9,5 km et à moins de 100 m de la source d'émission d'un rejet blanchi par chloration était de 5 à 10 fois celle notée chez les poissons non-exposés (HODSON, 1992).

Étant les premiers à nous être intéressés à l'induction de la MT par les effluents industriels, il est difficile de lancer une discussion comparative de nos résultats. Cependant, le niveau de la MT hépatique chez la truite arc-en-ciel vivant dans des lacs contaminés par le Zn, le Cu et le Cd était

plus élevé, mais les inductions ne dépassaient pas 4 fois le niveau hépatique chez des truites de référence qui vivaient dans un lac non contaminé par ces métaux (ROCH *et al.*, 1986). Selon ces chercheurs, l'induction maximale obtenue lors d'une exposition en laboratoire ressemblait à celle obtenue dans le milieu naturel après une exposition continue à un mélange identique de métaux pendant 4 semaines. Dans une autre étude, l'induction de la MT chez la truite *Salvelinus fontinalis*, suite à une exposition au Cd (0 à 19 µg/L) pendant 30 jours, était de 1 à 1,6 fois la valeur notée chez des truites de référence (HAMILTON *et al.*, 1987). En général, les facteurs d'induction obtenus dans ces études (1 à 4) ressemblent à ceux que nous avons obtenus lors d'une exposition de 96 h à des effluents industriels (1 à 2,5), qui contiennent des métaux reconnus pour leurs potentiels à induire la MT (tableau 3.1).

Dans cette étude, nous n'avons pas élaboré une cinétique d'induction optimale pour la mesure spécifique de la MT ou des OFM. Le profil des inductions dans le temps peut varier selon l'effluent utilisé. Par exemple, l'induction optimale de la MT avec un effluent d'usines de pâtes et papiers aurait pu se produire après 72 h d'incubation alors que pour l'EROD, elle aurait pu survenir au bout de 120 h d'incubation. En revanche, pour un autre effluent, une exposition plus prolongée aurait pu entraîner une dégradation des cytochromes P450 à cause de la présence de substances inhibitrices. Il est clair que des études plus approfondies sur la cinétique d'induction de la MT et des OFM sont nécessaires pour mieux comprendre l'impact des contaminants sur le métabolisme hépatique chez les poissons exposés aux effluents industriels.

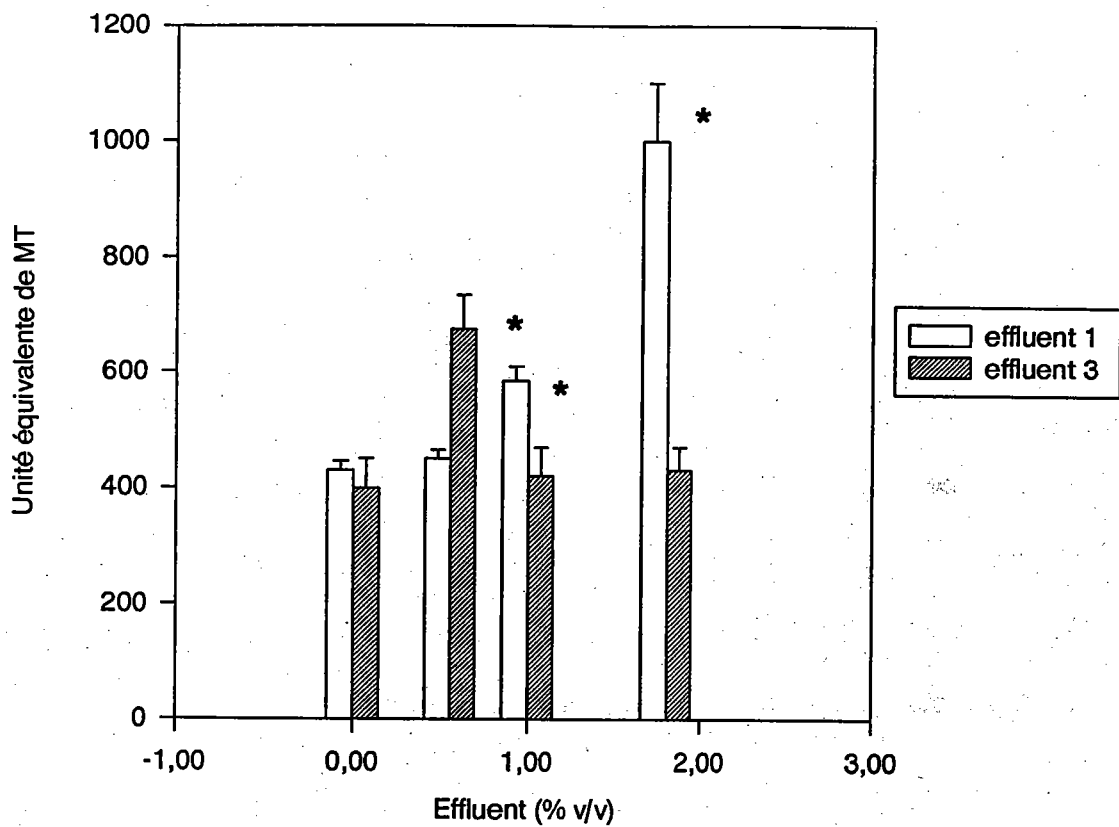


figure 3.2 Types de réponses observés pour la MT après une exposition sub létale aux effluents.
 Les barres représentent la moyenne avec l'erreur standard. * indique un effet significatif à $p < 0,05$.

3.3.3 Profils d'induction de la MT et de l'EROD

Une élévation de la MT hépatique chez la truite exposée à un effluent suggère que des métaux divalents comme le Cu, le Cd, le Zn ou le Hg étaient biodisponibles. Ces métaux sont reconnus comme étant des inducteurs de la MT (HAMER, 1986 ; DUNNS *et al.* , 1987). Parmi la douzaine d'effluents étudiés, on obtient des inductions significatives de la MT en présence ou non d'une concentration-réponse linéaire (tableau 3.1). Les facteurs d'induction de la MT et de l'EROD furent calculés selon l'équation suivante : niveau ou activité du groupe traité / niveau ou activité du groupe des témoins. Cependant, seuls trois effluents montraient une induction significative de la MT à la concentration d'exposition la plus faible, alors qu'une réduction était manifeste pour les deux concentrations plus élevées (tableau 3.1). Ces deux profils distincts d'induction de la MT sont illustrés à la figure 3.2 pour les effluents 1 (réponse linéaire) et 3 (réduction aux fortes concentrations d'effluent).

Une exposition à des effluents, qui sont des mélanges complexes de substances (in)organiques, peut entraîner toutes sortes d'interférences (antagonisme, synergisme, additivité et potentialisation) sur les niveaux de la MT et l'activité de l'EROD hépatique. En partant de cette prémisse, il est tout à fait plausible que certains produits puissent entraîner une répression des niveaux de la MT chez les poissons exposés à des concentrations sublétales plus élevées d'un effluent industriel (e.g. effluent 3, figure 3.2).

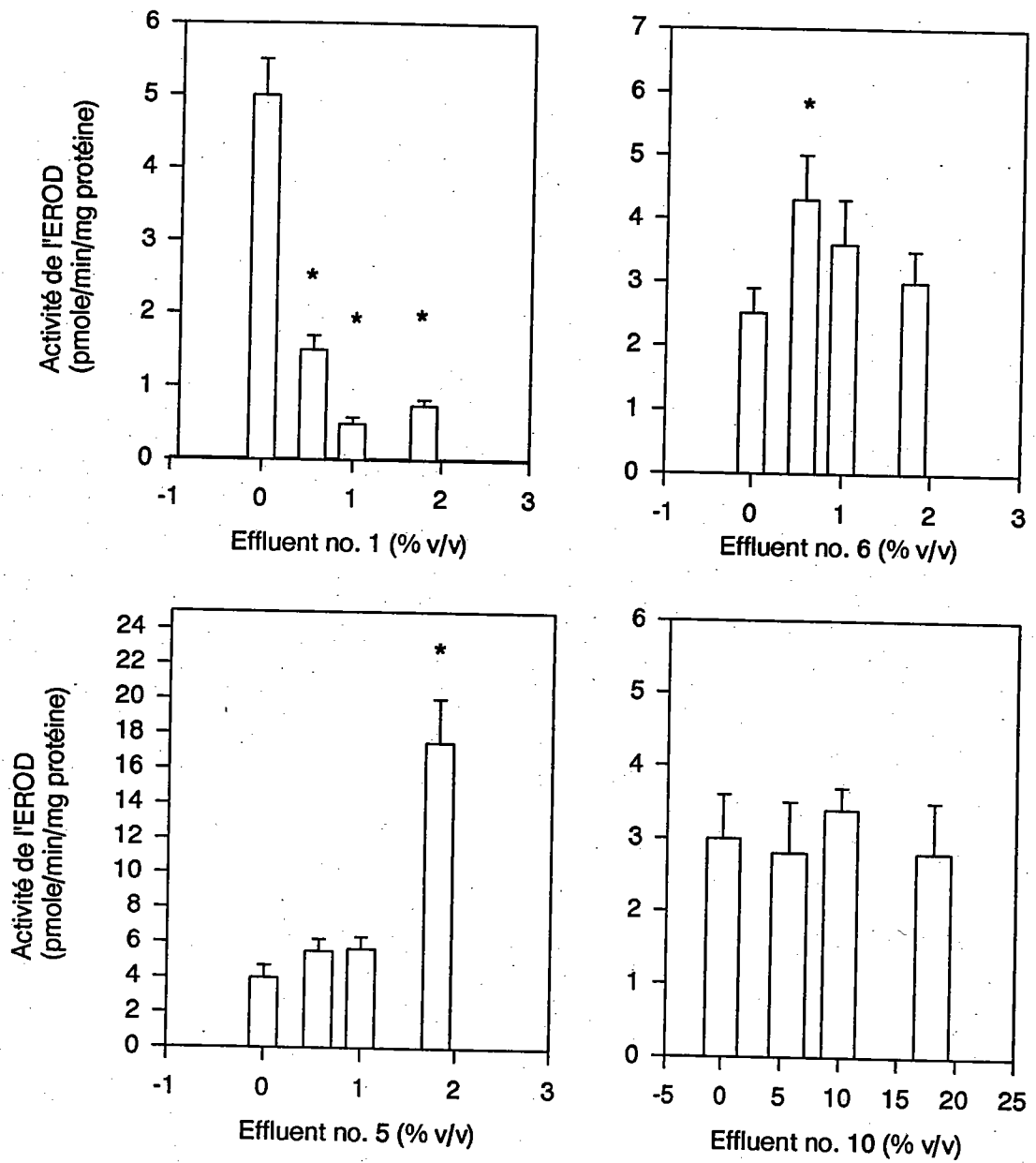


figure 3.3 Types de réponses observées pour l'activité de l'EROD après une exposition aux effluents industriels.

Les barres indiquent la moyenne de 4 sous-échantillons avec l'erreur standard. * indique un effet significatif à $p < 0,05$.

La **figure 3.3** illustre les types de réponse observés pour l'activité de l'EROD en se basant sur les données du **tableau 3-1**. Ces réponses allaient de la répression complète de l'EROD (effluent 1) jusqu'à l'absence d'induction (effluent 10), en passant par des réponses intermédiaires d'induction significative suivant la concentration d'exposition (effluent 5), et par une induction significative suivie d'une répression avec l'accroissement de la concentration d'exposition de l'effluent (effluent 6). Ces observations tendent à démontrer que l'activité de l'EROD est probablement davantage susceptible aux interférences résultant d'une exposition aux effluents industriels que la MT. On constate des inhibitions de l'activité de l'EROD avec les effluents 1, 3, 6, 7, 8, 9 et 11 (**tableau 3.1**).

L'activité de l'EROD, notre mesure des OFM, reflète la quantité du cytochrome P4501A1, anciennement connu sous les noms cytochrome P448 ou bien isoforme LM4b de la famille du cytochrome P450 (MIRANDA *et al.*, 1990). Cette isoforme du cytochrome P450 est induite principalement par les HAP, PCB, dioxines et les furannes (VODICNIK *et al.*, 1981 ; MELANCON *et al.*, 1989 ; HANSEN et ADDISON, 1990) et possède une excellente affinité pour le substrat 7-éthoxyrésorufine ($K_m = 100$ nM). Une hausse de la vitesse de dééthylation par unité de protéine dans le S_{10} témoigne donc d'une induction du cytochrome P4501A1 (BUHLER et WILLIAMS, 1988) et cette isoforme est susceptible aux interférences chimiques de certains effluents. De telles interférences ont été observées au niveau de la quantité totale du cytochrome

P450 avec les effluents 3, 8 et 10 (résultats non-publiés), ce qui suggère que d'autres isoformes du cytochrome P450 puissent être dégradées également.

La difficulté de prédire les effets biochimiques d'une exposition à des effluents complexes est partiellement documentée. Une étude réalisée en milieu naturel à l'aide de la Barbotte brune (*Ictalurus nebulosus*) vivant dans un secteur pollué par des métaux et des substances organiques d'un effluent municipal montrait des répressions du cytochrome P450 total et de l'EROD par rapport à une population contrôle. Les auteurs de cette étude suggéraient que les métaux étaient vraisemblablement responsables de la diminution de la synthèse ou bien du catabolisme du cytochrome P450, sans toutefois empêcher une certaine induction de l'EROD (GALLAGER et DIGIULIO, 1989). Bien que la littérature ne contienne que très peu d'information sur les effets des métaux sur les niveaux et les activités du cytochrome P450, MAINES et KAPPAS (1976) et EATON *et al.* (1980) ont toutefois démontré que plusieurs métaux (Cd, Zn, Cu, Co et Hg) diminuaient la quantité totale du cytochrome P450 dans le foie du rat. Dans une étude plus récente chez la Plie (*Pleuronectes platessa*), une exposition simultanée au Cd et au méthyl-3-cholanthrène, un inducteur classique du cytochrome P4501A1, diminuait la quantité totale du P450 et de l'activité de l'EROD, tandis qu'une exposition au méthyl-3 cholanthrène seul augmentait l'activité de l'EROD (GEORGE et YOUNG, 1986). Ainsi, la présence de métaux dans les effluents de fabriques de pâtes et papiers pourrait certainement contribuer à la réduction de l'activité de l'EROD.

Effluent	Métaux ^a (ug/L)				N°	HAP totaux ^b (ug/L) Concentration	Dioxines (pg/L)	Furannes (pg/L)	BPC (µg/L)
	Cu	Cd	Zn	Hg					
1	40	<30	300	5	1	1,3 (naphthalène seulement)	NA°	NA	NA
2	<30	<30	350	<0,2	11	6,6 (naphthalène : 0,7; benzo(a)pyrène : 0,13)	NA	NA	<0,1
3	<30	<30	160	<0,2	4	2,2 (naphthalène: 1,3)	NA	NA	<0,1
4	<30	<30	220	<0,2	1	0,6 (naphthalène seulement)	NA	NA	<0,1
5	<30	<30	130	<0,2	2	0,2 (naphthalène: 0,13)	NA	NA	<0,1
6	<30	<30	220	<0,2	2	0,6 (naphthalène: 0,5)	NA	NA	<0,1
7	<30	<30	<100	<0,2	2	0,3 (naphthalène: 0,2)	760 (O ₈ CDD)	41 (2,3,7,8) TCDF	<0,5 Aroclor 1254 <0,5 Aroclor 1242 <0,02 Aroclor 1260
8	<30	<30	120	<0,2	2	0,6 (naphthalène: 0,5)	NA	NA	0,2 Aroclor 1242
9	<30	<30	90	<0,2	2	0,4 (naphthalène: 0,3)	NA	NA	<0,1
10	<30	<30	200	<0,2	2	0,5 (naphthalène: 0,4)	NA	NA	<0,1
11	<30	<30	190	<0,2	6	12 (naphthalène: 6,9)	NA	NA	<0,2 Aroclor (1242, 1248, 1260)
12	<30	<30	60	<0,2	2	0,4 (naphthalène: 0,3)	390(O ₈ CDD)	<10	<0,1

a. Les concentrations des métaux totaux dont les anions correspondants sont inconnus. Les métaux ci-haut mentionnés sont reconnus comme des inducteurs de la MT (DUNNS *et al.*, 1987; HAMER, 1986).

b. La concentration totale des HAP est représentée avec le N° qui donne le nombre de HAP qui était analysé. Les HAP, dioxines, furannes et BPC entre parenthèses sont ceux qui sont reconnus comme étant inducteurs d'EROD (FINGERMAN *et al.*, 1983; SMOLOWITZ *et al.*, 1991; ELCOMBE et LECH, 1987).

c. NA : non analysé.

tableau 3.2 Caractéristiques chimiques des effluents d'usines de pâtes et papiers.

Le groupe AHOKAS *et al.* (1976) observa aussi un effet antagoniste dans le système de détoxification associé à l'activité des OFMs chez le Brochet (*Esox lucius*) pêché dans un lac pollué par un rejet provenant d'une usine de pâtes et papiers et d'une usine de produits chimiques. Chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), les activités d'EROD étaient réduites suite à une exposition à un effluent de pâtes et papiers dont l'usine utilisait un procédé de blanchiment au chlore (LEHTINEN *et al.*, 1990) ; réduction peut-être attribuable aux acides résiniques présents dans cet effluent. Ce groupe de chercheurs concluait que le profil particulier d'activités d'EROD dans le foie après exposition à ce type d'effluent résultait d'une réponse globale provenant de la présence de substances à la fois inductrices et inhibitrices du cytochrome P4501A1 ainsi que des autres isoformes. Les résultats de notre étude démontrent aussi que différentes classes de substances dans les effluents étudiés peuvent exercer des effets combinés (induction et inhibition) sur la MT et les OFM dans le foie des truites (**tableau 3.2**). Par exemple, les effluents 7 et 12 montrent les quantités les plus élevées en dioxines mais les niveaux d'EROD ne sont pas pour autant plus élevés que ceux des autres effluents. Il est donc possible que des substances inhibitrices aient contribué à atténuer la réponse d'induction. D'autres recherches sur les interactions des xénobiotiques (in)organiques seraient très utiles pour mieux comprendre la toxicité (sub)létale associée à des mélanges complexes. Par contre, la sélection de seulement trois concentrations d'exposition pour la mesure de la MT et de l'EROD en se basant sur la toxicité létale peut influencer le type de réponse observée. Si nous avons mesuré les OFM à des

concentrations inférieures à celles retenues pour l'effluent 1 par exemple, nous aurions peut être pu obtenir une relation concentration-réponse linéaire au lieu d'obtenir des inhibitions de l'EROD (**tableau 3-1**). Néanmoins, nous pouvons apprécier les difficultés inhérentes aux mesures biochimiques réalisées sur des organismes exposés à des effluents complexes et nous suggérons d'évaluer à l'avenir les concentrations minimales d'induction où ces interférences sur la mesure de la MT, du cytochrome P450 total et de l'EROD pourraient être minimisées, tout au moins.

3.4 Conclusions

Puisque la MT et l'EROD sont induites par des classes chimiques spécifiques de polluants (VARANASI *et al.*, 1981 ; ROCH *et al.*, 1982 ; NEFF, 1985 ; HANSEN et ADDISON, 1990), leur introduction dans le milieu aquatique est indésirable. L'application éventuelle d'un bioessai de subléthalité comprenant les mesures de la MT et de l'EROD devient un outil important pour contrôler, et possiblement réglementer, la présence de substances nocives dans ces sources de pollution. Ce travail démontre que les truites peuvent être utilisées à cette fin de façon rentable lors de l'entreprise des essais de toxicité létale (96 h) exigés par la réglementation. Leur exposition à des concentrations sublétales de 12 effluents de fabriques de pâtes et papiers a entraîné une induction significative de la MT (pour tous les effluents) et de l'EROD (pour 9 effluents). Dans cette étude préliminaire, l'utilisation de seulement trois concentrations sublétales d'exposition n'a pas permis une discrimination entre la toxicité sublétale et les divers procédés

ou traitements industriels. D'autres travaux pourraient être intéressants à cet égard pour déterminer d'une façon plus précise la CMSEO. Des recherches visant le raffinement de ce bioessai combiné de (sub)léthalité s'avéreraient utiles pour préciser le seuil d'induction de la MT et de l'EROD pour plusieurs types d'effluents industriels. Ces travaux nous informeront alors sur la possibilité d'emploi de cette approche bioanalytique pour permettre son application éventuelle par les instances de réglementation.

Ce bioessai combiné de (sub)léthalité peut aussi servir de référence pour valider de nouveaux bioessais alternatifs. Ainsi, dans la suite de nos travaux, les hépatocytes de truite serviront de modèle alternatif pour évaluer l'induction de la MT, de l'EROD et de la génotoxicité. Ces effets observés à l'échelle cellulaire font donc l'objet d'une comparaison avec ceux du bioessai avec la truite plus loin. Cette comparaison est essentielle pour la validation des méthodes alternatives en écotoxicologie.

4. Développement de critères de mesures (sub)létales avec hépatocytes de truite

4.1 Introduction et objectifs

L'évaluation des effets sublétaux et de la toxicité létale contribuent à mieux comprendre l'écotoxicité des effluents industriels. En effet, la MT et l'activité du cytochrome P4501A1 dans les hépatocytes représentent des systèmes reconnus de défense contre l'action de classes spécifiques de xénobiotiques. La MT est généralement induite par les métaux lourds divalents (HAMER, 1986) sans toutefois exclure la possibilité d'une induction par des substances non métalliques telles que des substances oxydantes (SATO et BREMNER, 1993). Le cytochrome P4501A1 est plutôt induit par des composés organiques coplanaires aromatiques (exemples : HAP, BPC, dioxines et furannes). Ainsi, la mesure de la MT et du cytochrome P4501A1 intracellulaire greffée à la cytotoxicité (mesure de la viabilité), constitue un complément intéressant pour la caractérisation écotoxicologique des mélanges complexes. L'induction de ces protéines peut être suivie à l'échelle traductionnelle (mesure de protéine ou d'activité enzymatique spécifique, selon le cas) ou transcriptionnelle (ARNm). Celle-ci (ARNm) présente l'avantage qu'elle contourne les interférences inhibitrices ou stimulatrices de l'activité catalytique (GAGNÉ et BLAISE, 1993 ; BOON *et al.* , 1992) tout en offrant une mesure très spécifique du biomarqueur. La quantification des ARNm dans chaque cellule se réalise par hybridation fluorescente *in situ* (HFIS), laquelle fait appel à une sonde d'ADN biotinylée complémentaire à un ARNm spécifique. La technique consiste à hybrider une sonde d'ADN sur les ARNm intracellulaires dans des cellules préalablement fixées et perméabilisées. Par la suite, une réaction streptavidine-fluorescéine avec la sonde d'ADN biotinylée permet alors à la cytométrie en flux de détecter et de quantifier l'ARN transcrit.

L'évaluation de la génotoxicité s'avère aussi un paramètre de cytotoxicité sublétales crucial pour la caractérisation écotoxicologique des mélanges complexes. Les dommages à l'ADN s'évaluent à l'échelle moléculaire de différentes façons. Par exemple, la mesure d'adduits sur l'ADN (MASFARAUD *et al.*, 1992), la synthèse non-programmée d'ADN (WEISBURGER et WILLIAMS, 1991) et le déroulement de l'ADN en milieu alcalin (OLIVE *et al.*, 1988) représentent des critères d'effet intéressants en ce sens. A un niveau d'organisation plus élevé (aux niveaux des cellules et des tissus), la formation de micronoyaux, d'aberrations chromosomiques et l'échange de chromatides-soeurs (AL-SABTI et HARDIG, 1990 ; MEANS *et al.*, 1988 ; LOBILLO *et al.*, 1991 ; GODET *et al.*, 1993) témoignent de dommages directs sur l'ADN. La formation de cassures simples sur la chaîne d'ADN peut être aussi examinée à l'échelle moléculaire selon le «nick translation assay» (NTA) ou le principe de la translation de brèches (SNYDER et MATHESON, 1985) avec le complexe enzymatique de l'ADN polymérase I (PolI). Cet essai est théoriquement très sensible parce que l'enzyme PolI incorpore des nucléotides dans les petites brèches en plus de les déplacer le long de la macromolécule. Ceci entraîne une incorporation accrue de nucléotides en rapport avec le nombre de nucléotides correspondant à la brèche initiale. Par contre, l'essai original utilise la thymidine tritiée (³H-thymidine) comme nucléotide marqueur. La formation de brins simples et doubles de l'ADN peut être aussi suivie par une version simplifiée du déroulement de l'ADN en milieu alcalin : la précipitation alcaline (PA) de l'ADN (OLIVE, 1988). Ce test est rapide, peu coûteux et s'adapte

à plusieurs tissus ou cellules. Cependant, cet essai emploie aussi le nucléotide ^3H -thymidine comme moyen de détection des simples/doubles brins. L'utilisation de nucléotides non radioactifs pour détecter les brins ou l'incorporation de nucléotides rendrait ces tests beaucoup plus flexibles et économiques dans les études écotoxicologiques.

Dans cette partie du travail avec les hépatocytes de truite arc-en-ciel, nous avons étudié la toxicité d'échantillons environnementaux incluant des effluents industriels, des extraits de sédiments et des eaux fluviales. Leur toxicité létale a été évaluée par un test de viabilité décrit plus loin. Leur potentiel d'induction de la MT et du P4501A1 a été mesuré à l'échelle transcriptionnelle (ARNm) par HFIS ou traductionnelle (protéine ou activité enzymatique). Leur génotoxicité a été déterminée par le test de la translation de brèches d'ADN (NTA) et par le test de la précipitation de l'ADN en milieu alcalin (PA), suivant une nouvelle procédure qui mesure les brins d'ADN par fluorescence plutôt que par radioactivité. Par ailleurs, on a réalisé des études de corrélation entre certaines données chimiques d'extraits organiques de sédiments et les réponses (géo)toxiques obtenues avec notre modèle cellulaire.

4.2 *Méthodologie*

4.2.1 Préparation et exposition des hépatocytes

Des cultures primaires d'hépatocytes sont préparés selon la méthode de la double perfusion de KLAUNING *et al.* (1985) avec quelques modifications. Les truites sont anesthésiées par une immersion dans une solution d'eau non-chlorée contenant 25 mg/L de tricaine pendant 50 sec. Le foie est perfusé à l'aide d'une solution de salin citrate ou SSC (150 mM NaCl et 15 mM citrate de sodium). Le foie est ensuite retiré de la cavité abdominale puis découpé en petits morceaux. Ceux-ci sont ensuite mélangés dans le milieu de culture L-15 contenant 100 unités de collagénase pendant 20 min à la température de la pièce. Les hépatocytes sont séparés mécaniquement à l'aide d'un séparateur cellulaire muni d'un tamis de porosité de 50 μm (« Sigma chemical company »). Les hépatocytes sont ensuite lavées par trois centrifugations/resuspensions successives dans le milieu PBS. Les hépatocytes sont placés dans des microplaques à une densité de 1×10^6 cellules par mL du milieu L-15 contenant 1 % de sérum de veau foetal, 100 unités de pénicilline, 10 g/mL de streptomycine et 2,5 $\mu\text{g/mL}$ d'amphotéricine B. Les cellules sont incubées en présence ou non de substances/mélanges dans une chambre humidifiée à 15 °C pendant 24 à 72 h selon l'expérience.

4.2.2 Évaluation de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est évaluée par cytométrie en flux selon le test d'exclusion à l'iodure de propidium (ZUCKER *et al.* , 1988). Environ 50×10^3 cellules sont recueillies puis centrifugées et finalement resuspendues dans 200 μL d'iodure de propidium (IP) à une concentration de 10

$\mu\text{g/mL}$ dans le milieu « phosphate buffered saline » ou PBS, pendant 10 min à la température de la pièce. Par la suite, on analyse les hépatocytes par cytométrie en flux ce qui permet de discriminer entre cellules vivantes et mortes. Ces dernières n'excluent plus l'IP et deviennent fluorescentes (610 nm) après excitation à 488 nm (longueur d'onde optimale d'un laser d'argon). La proportion de cellules mortes en % est calculée en normalisant avec la digitonine, un puissant détergent, qui accroît considérablement la perméabilité membranaire. La même quantité de cellules est traitée avec 0,02 % de digitonine dans le milieu PBS pendant 5 min et elles sont alors incubées en présence d'IP. On calcule la proportion de cellules viables ainsi :

$$\text{Proportion de cellules viables} = [1 - (X - A) / (B - A)] \times 100,$$

où X est la fluorescence totale de la population chez le groupe d'hépatocytes exposé à l'échantillon. A correspond au groupe d'hépatocytes témoin (non exposé) et B correspond au groupe d'hépatocytes traité avec la digitonine.

4.2.3 Détermination de la métallothionéine (MT)

La concentration de la métallothionéine intracellulaire peut se mesurer tant au niveau de la transcription par hybridation fluorescente HFIS qu'au niveau de la traduction par la méthode de saturation à l'argent.

4.2.3.1 Mesure de la MT au niveau traductionnel

La méthode de saturation à l'argent, décrite en 3.2.3, permet la quantification des niveaux intracellulaires de la MT. Par contre, une légère modification dans la préparation de l'échantillon est introduite pour les hépatocytes. Brièvement, environ $2,5 \times 10^5$ hépatocytes sont centrifugés puis resuspendus dans 50 μL d'une solution tampon de Tris-acétate 10 mM, pH 8, contenant 10 mM de dithiothréitol. Cette lyse cellulaire est ensuite saturée avec 50 μL de la solution d' Ag^{1+} 20 ppm dans une solution de tampon glycine, tel que décrit dans le chapitre 3 au sujet de la quantification de la MT dans le foie de truite.

4.2.3.2 Mesure de l'expression génétique de la MT selon la méthode «FISHES»

Après la période d'exposition des hépatocytes, on retire le milieu de culture par aspiration et on resuspend les cellules dans 200 μL de solution saline contenant du citrate (SSC 1X: 150 mM de NaCl et 15 mM de citrate de sodium, pH 7,2). La suspension cellulaire est centrifugée (200 x g, 2 min), le surnageant est retiré et les cellules sont fixées pendant 10 min à 22 °C dans 150 μL de fixatif qui contient 3,7 % de formaldéhyde et 5 mM de MgCl_2 dans le milieu PBS. Les cellules sont ensuite transférées dans une microplaque en pyrocarbonate, centrifugées de nouveau puis fixées pendant 45 min à 4 °C dans 100 μL d'éthanol à 70 % contenant 0,05 % de diéthylpyrocarbonate qui est inhibiteur des ribonucléases (RNases). Le surnageant est enlevé et les cellules sont réhydratées/perméabilisées pendant 15 min à 22 °C dans 100 μL du milieu PBS contenant 0,1 % de tween-20. Après centrifugation, on ajoute 500 ng de la sonde d'ADN

biotinylée (dans le milieu SSC 4 X contenant 0,1 % de SDS, de polyvinylpyrrolidone, de Ficoll et d'albumine bovine) aux hépatocytes. La sonde est produite par la méthode de la RCP sur l'ADN obtenu préalablement par la transcription inverse de l'ARNm de la MT (voir l'article FISHES en l'annexe). On recouvre le mélange avec 50 μ L d'huile minérale légère, puis on traite les cellules à 85 °C pendant 2 min et ensuite à 58 °C pendant 1 h. Les cellules sont lavées avec 150 μ L de milieu PBS contenant 0,1 % d'albumine et de tween-20 pendant 5 min. Après centrifugation, les cellules sont exposées pendant 30 min à 37 °C à 1 μ g de streptavidine-fluorescéine dans le milieu PBS contenant 0,1 % d'albumine et de tween-20. Les hépatocytes sont lavés deux fois dans le milieu PBS contenant 0,1 % d'albumine et de tween-20 et lavés une dernière fois dans le milieu PBS pendant 10 min. Finalement, les hépatocytes sont centrifugés puis resuspendus dans 25 μ g/mL d'IP dans le milieu PBS pour l'analyse cytométrique. Les cellules contenant davantage de l'ARNm de la MT deviennent plus fluorescentes à cause de la plus grande quantité du complexe ternaire : MT-ARNm/sonde d'ADN-biotine/streptavidine-fluorescéine. La quantité totale d'acide nucléique bicaténaire peut être aussi mesurée et ce paramètre peut servir à mieux cerner la population d'hépatocytes lors de l'analyse cytométrique (voir l'article FISHES en annexe). L'intensité d'hybridation dans les hépatocytes, exposés à des inducteurs reconnus (Cd pour la MT et le β -naphtoflavone pour le CYP1A1), est aussi comparée avec le degré d'induction au niveau de la traduction (voir section 4.2.3.1).

4.2.4 Détermination de l'activité du cytochrome P450 1A1

Compartiment	Activité*	Facteur d'enrichissement**
Homogénat***	5,2	1,0
Surnageant S ₁₀	7,2	1,4
Cytosol	0	0
Microsomes	15	2,9

* L'activité enzymatique est définie en unité de fluorescence x (min x mg protéine)⁻¹.

** Le facteur d'enrichissement est le rapport entre l'activité du compartiment sur l'activité du compartiment de l'homogénat.

*** Les différents compartiments intracellulaires sont obtenus par la méthode de centrifugation différentielle (annexe 2).

tableau 4.1 Distribution intracellulaire de l'activité de MCFOD dans les hépatocytes de truites arc-en-ciel.

Cd ²⁺ (% v/v)	Activité	Butanol (ugmL ⁻¹)	Activité	β-NF (ngmL ⁻¹)	Activité	BaP (ngmL ⁻¹)	Activité
0	300±10	0	295±5	0	297±10	0	290±10
400	289±11	0.01	300±8	0.1	314±10	50	305±9
800	283±9	0.05	292±9	0.4	327±14*	100	315±11*
1000	273±8*	0.1	300±8	1	320±12*	200	320±10*
1600	260±10*	0.5	304±10	10	295±10	300	310±8

* Significatif par rapport au groupe témoin à p < 0.05.

tableau 4.2 Exposition des hépatocytes (2 x 10⁴ cellules par puits pendant 48 h) au Cd²⁺, butanol, β-NF et BaP. L'activité est exprimée par la moyenne d'unités de fluorescence de la population après une exposition de 20 min avec le substrat MCF (= UF.20 min⁻¹).

4.2.4.1 Mesure enzymatique

L'activité enzymatique du cytochrome P4501A1 peut être suivie, ainsi qu'expliqué à la section 3.2.4, par la mesure de l'activité de l'EROD. La quantité du cytochrome P4501A peut aussi être suivie indirectement dans la cellule en mesurant la méthoxycarboxyfluorescéine O-déméthylase (MCFOD). Pour la mesure de l'EROD, on utilise environ $2,5 \times 10^5$ cellules et l'essai est réalisé tel que décrit en 3.2.4. La mesure de l'activité de la MCFOD requiert beaucoup moins de cellules (2×10^4) et elle se fait sur la cellule vivante par cytométrie en flux (MILLER, 1983). Le substrat méthoxycarboxyfluorescéine est plutôt spécifique à la famille du cytochrome P4501A et incluant les membres 1A1 et 1A2 (MAYER *et al.*, 1977) contrairement au substrat éthoxyrésorufine qui, lui, est plutôt spécifique au membre P4501A1. Néanmoins, l'inducteur classique du P4501A1 (β -naphthoflavone) induit bien l'activité du MCFOD intracellulaire (**tableau 4.2**). De plus, sa mesure est relativement aisée. Il s'agit simplement d'incuber environ 20×10^3 hépatocytes avec 30 mM du substrat pendant 20 min et la quantité de produit formé dans chaque hépatocyte est ensuite mesurée par cytométrie en flux. Le substrat diffuse dans le milieu intracellulaire et est déméthylé en carboxyfluorescéine par les cytochromes de la famille 1A, localisés dans le réticulum endoplasmique lisse (SMOLOWITZ *et al.*, 1991), ce qui provoque une élévation de la fluorescence dans les hépatocytes.

4.2.4.2 Mesure de l'expression génétique du P4501A1

L'évaluation des niveaux d'ARNm du cytochrome P4501A1 est réalisée de façon similaire à celle pour la détermination de l'ARNm de la MT (section 4.2.3.2), sauf que la sonde d'ADN biotinylée correspond à l'ARNm du cytochrome P4501A1 (voir article FISHES en annexe).

4.2.5 Détermination des dommages génétiques

Les dommages génétiques sont évalués par deux tests : le test de translation de brèches (« nick translation assay » ou NTA) et le test de la précipitation alcaline (PA) de l'ADN.

4.2.5.1 Test de translation de brèches sur l'ADN nucléaire

Une réparation intracellulaire de l'ADN selon le principe de la translation de brèche est décrite ci-après. Le complexe enzymatique Pol1 ajoute des nucléotides dans la brèche produite lors des dommages génétiques, dans la direction 5' vers 3' (activité ADN polymérase ADN dépendante) et en même temps la brèche est déplacée dans la même direction (activité exonucléase 5' vers 3'). Ainsi, l'ADN Pol1 incorpore considérablement plus de nucléotides (incluant la biotine-dUTP) que le nombre de nucléotides initialement contenu dans la brèche.

Après leur exposition, les hépatocytes sont lavés dans le milieu SSC (voir la section 4.3.2.2). Les cellules sont centrifugées (200 x g pendant 2 min et pour les centrifugations subséquentes) puis

fixées dans l'éthanol à 70 % pendant 45 min à 4°C. Les cellules sont ensuite centrifugées puis perméabilisées dans 0,1 % de tween-20 dans le milieu PBS pendant 15 min à la température de la pièce. Les cellules sont centrifugées de nouveau puis incubées avec 20 unités de Pol1 dans le tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contenant 10 mM de dithiothréitol, 1 mM de MgCl₂, 0,1 % d'albumine bovine et 50 mM de chacun des nucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Le mélange réactionnel contient aussi 10 µM de biotine-dUTP (analogue de la dTTP) et la réaction est maintenue pendant 1 h à 37 °C. Après cette période d'incubation, les cellules sont lavées dans 200 µL de PBS contenant 0,1 % de tween-20 et d'albumine bovine pendant 5 min. Les cellules sont centrifugées et un volume de 2 µg de streptavidine-fluorescéine dans le milieu PBS contenant 0,1 % de tween-20 et d'albumine leur est ajouté pendant 30 min à 37 °C. Les cellules sont lavées deux fois dans le milieu PBS (5 minutes d'attente entre les lavages) et finalement resuspendues dans le milieu PBS contenant 25 µg/mL d'IP et 50 unités/mL de RNase. Après une incubation de 30 minutes pour permettre la dégradation des ARN, les cellules sont analysées par cytométrie en flux. La quantité de fluorescéine (incorporation de biotine-dUTP dans l'ADN) dans la population d'hépatocytes est déterminée en plus de la quantité totale de l'ADN (IP/RNase A). Dans certains cas, la désoxyribonucléase 1 (DNase 1) est ajoutée au mélange réactionnel pour confirmer l'augmentation significative de l'incorporation de biotine-16-dUTP dans l'ADN par l'ADN Pol1.

4.2.5.2 Test de la précipitation alcaline de l'ADN

La génotoxicité est aussi évaluée selon le test de la PA de l'ADN avec certaines modifications. La détection des brins d'ADN est mesurée par fluorométrie avec la sonde Hoescht (WEST *et al.*, 1985) au lieu d'utiliser la ^3H -thymidine. Après leur exposition, les cellules sont lavées dans 200 μL de SSC. Avant de pratiquer l'essai PA dans les cellules, leur nombre est déterminé par la mesure de la densité optique à 600 nm. Des tubes « blancs » et « standard » ne contiennent pas de cellules mais seulement de la SSC. Les cellules sont solubilisées pendant 1 min avec 250 μL de SDS à 2 % contenant 10 mM de EDTA et de Tris-HCl, pH 12,3. On ajoute ensuite 250 μL de KCl 0,12 M et le mélange est chauffé à 60°C pendant 10 min. Après, le mélange est placé sur glace pendant 20 min et centrifugé à 8 000 x g pendant 5 min pour séparer les brins d'ADN des nucléoprotéines associées à l'ADN nucléaire. Un sous-échantillon de 250 μL du surnageant est prélevé, en prenant soin de ne pas resuspendre le culot de SDS, et il est mélangé avec 2500 μL de KH_2PO_4 à une concentration de 75 mM, pH 6,75, contenant 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Hoescht. Le complexe ADN-Hoescht se mesure par fluorescence à 460 nm après excitation à 350 nm (fente optique de 10 nm). La quantification d'ADN est réalisée avec des solutions étalons d'ADN de sperme de saumon dans le même mélange sans ajout d'hépatocytes.

4.2.6 Traitement statistique

Les hépatocytes ont été disposés en quatre sous-échantillons subdivisés ($n=4$). Les données cytométriques (moyenne de la fluorescence d'une population de 5000 cellules) sont soumises à un test de normalité et à un test d'homogénéité de variance (test de Barlett). Dans le cas où les données sont normales avec une homogénéité des variances, elles sont soumises à une analyse de variance et la différence avec le groupe témoin (cellules non exposées) est vérifiée avec le test t de Dunnett. Lorsque les variances sont hétérogènes ou qu'elles ne sont pas distribuées normalement, une analyse de variance non-paramétrique (Kruskal-Wallis) est pratiquée et la différence avec le groupe témoin est déterminée avec un test de comparaison multiple de Dunns. La significativité est fixée à $p < 0,05$ dans les deux cas. La CMEO et la CMSEO sont ainsi déterminées et un seuil de toxicité (ST) est déterminé selon la formule $ST = (CMSEO \times CMEO)^{1/2}$. Les données sont ensuite transformées en unités toxiques (UT) selon la relation $UT = 100/ST$. Ceci traduit mieux l'intensité toxique des échantillons. Les corrélations entre les données chimiques et toxicologiques sont étudiées avec le test de corrélation non paramétrique (coefficient de corrélation des rangs de « Spearman ») ou bien avec le test de corrélation paramétrique (coefficient de corrélation de « Pearson »). La significativité de la pente est fixée à $p < 0,05$ et marginalement significative à $0,1 < p < 0,05$.

4.3 Résultats et discussions des bioessais réalisés avec substances pures

4.3.1 Viabilité cellulaire

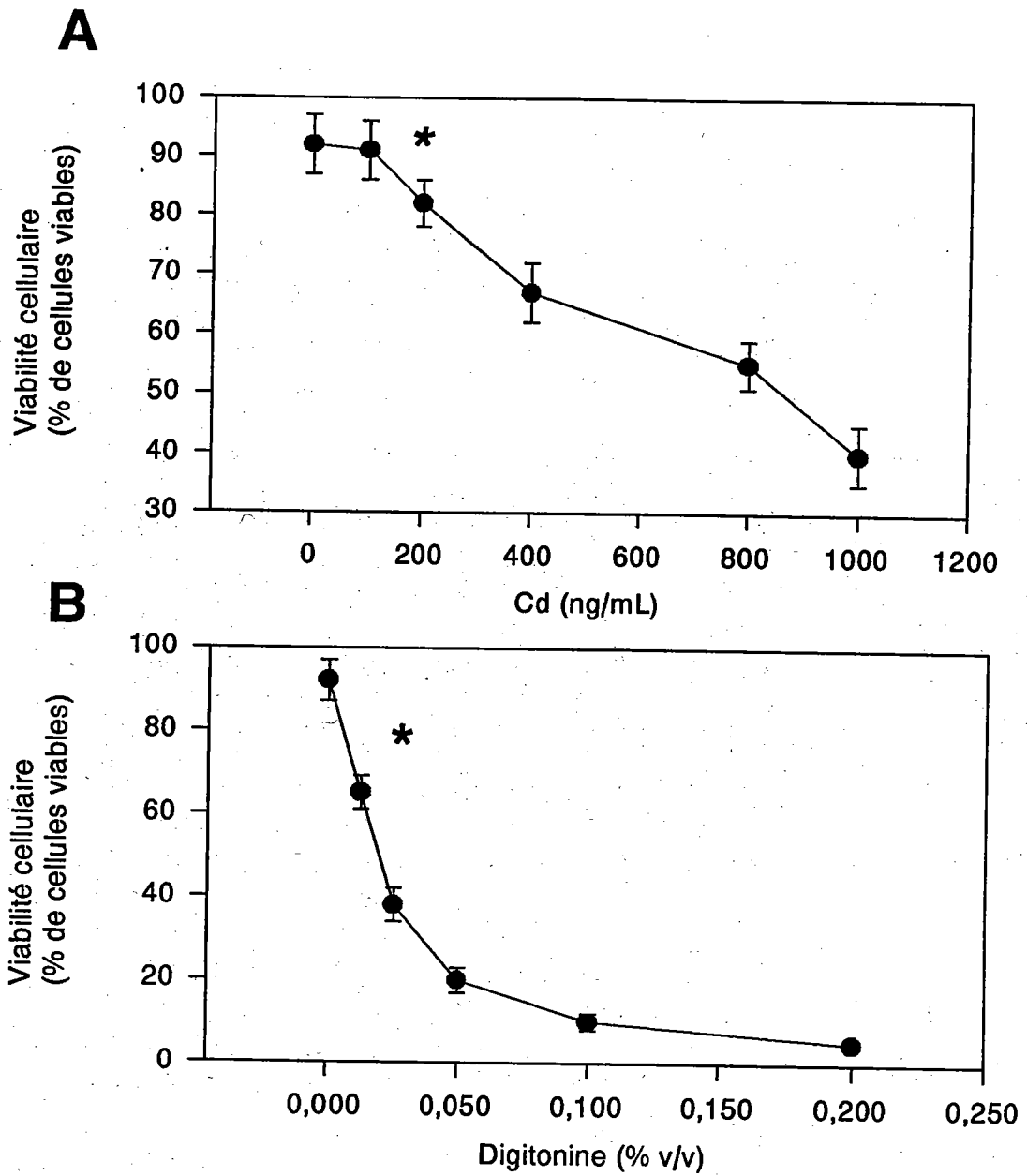


figure 4.1 Mesure de la viabilité cellulaire.

Les hépatocytes sont exposés au Cd (24 h) et à la digitonine (15 min). La viabilité est déterminée selon le test d'exclusion à l'IP. Le symbole * indique la CME0.

Afin de démontrer des effets sublétaux (induction de la MT et du P4501A, de la génotoxicité), il est essentiel de réaliser ces mesures sur des hépatocytes dont la viabilité n'a pas été trop altérée. Chez des cellules dont la viabilité est compromise, il y aura arrêt de la synthèse générale des protéines, ce qui implique la MT et le P4501A1, et aussi la probabilité accrue d'obtenir une dégradation de l'ADN typique de l'apoptose. Le test d'exclusion à l'IP nous permet donc de cerner le seuil de cytotoxicité et de mieux situer la fourchette de concentrations où l'on retrouvera les effets sublétaux. On ne pourra toutefois exclure le phénomène de l'apoptose. Une exposition à la digitonine ou au Cd peut entraîner une perte de viabilité cellulaire (figure 4,1 a et b). La digitonine et le Cd peuvent ainsi servir de toxiques cellulaires de référence dans le contrôle de qualité des préparations d'hépatocytes. La digitonine est un puissant détergent qui tue les hépatocytes en augmentant leur perméabilité membranaire lorsqu'ils sont exposés à une solution de 0,02 % pendant seulement 15 min. Nous avons donc retenu ce détergent comme toxique de référence pour normaliser la proportion de cellules fluorescentes (témoignant d'effets sublétaux) en fonction du pourcentage de viabilité cellulaire.

4.3.2 Activité du cytochrome P4501A

Afin de déterminer une induction ou une répression du cytochrome P4501A en conditions d'expérimentation, il est nécessaire de quantifier son activité enzymatique par l'étude de ses caractéristiques cinétiques avec le substrat MCF (méthoxycarbonylfluorescéine) dans les

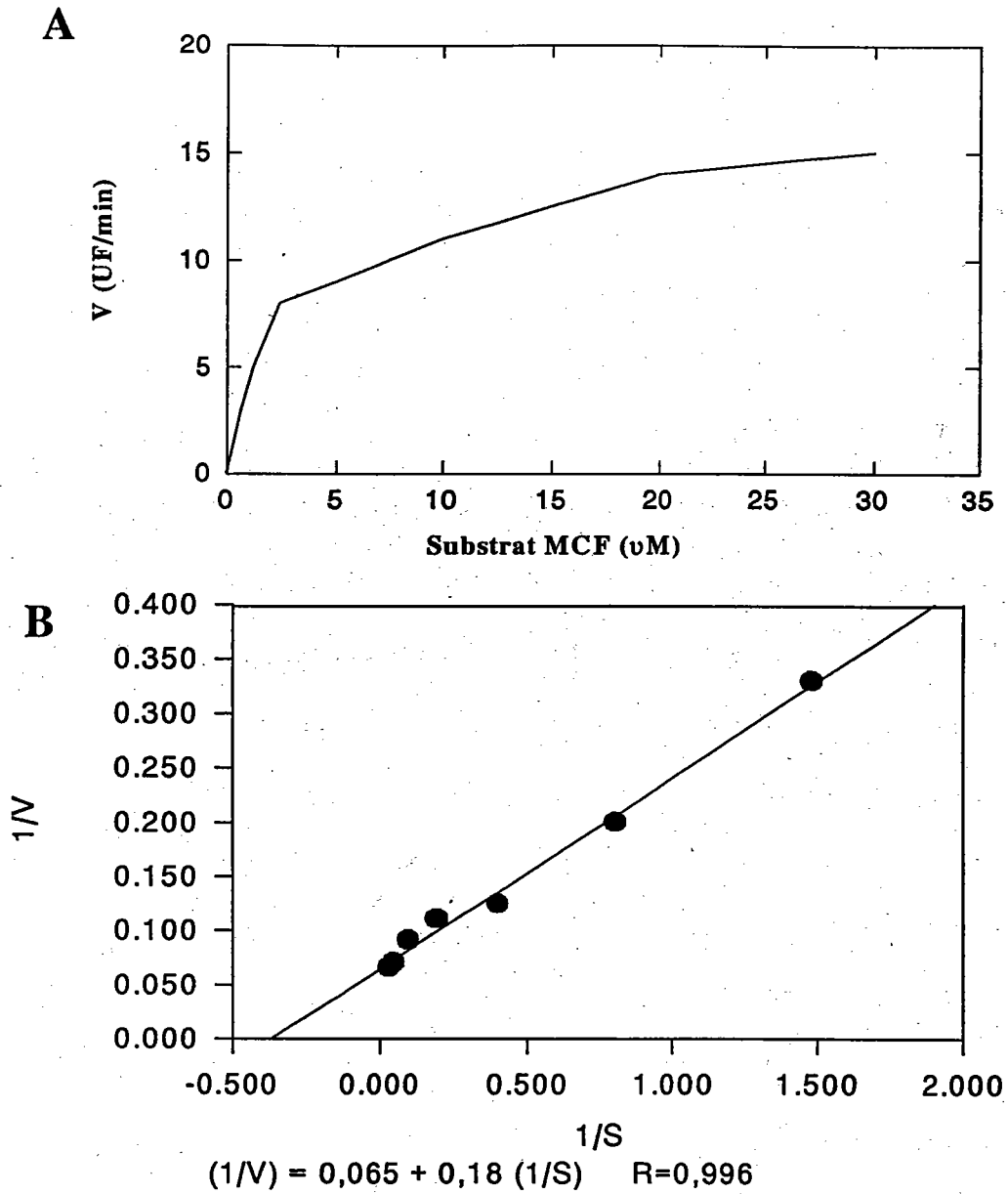


figure 4.2 Paramètres cinétiques de l'activité de MCFOD.

Les hépatocytes sont incubés pendant 20 min à plusieurs concentrations du substrat MCF. A : vitesse de la réaction avec la concentration de MCF. B : transformation de Lineweaver-Burk de A.

hépatocytes vivants. L'activité du MCFOD (méthoxycarbonylfluorescéine O-déméthylase) dans les hépatocytes de truite intactes est illustrée avec sa représentation de Michaelis-Menten (**figure 4.2A**) ou de Lineweaver-Burk (**figure 4.2B**). La constante d'affinité K_M de la réaction catalytique MCFOD est de 2,7 mM avec une vitesse maximale V_{MAX} de 15 unités de fluorescence/min. Puisque la concentration du substrat doit saturer le site actif de l'enzyme pour favoriser une réaction à l'équilibre, elle doit être d'au moins cinq fois la valeur du K_M . Une concentration de 30 mM (un peu plus de 10 fois la valeur du K_M) a donc été choisie pour mesurer l'activité MCFOD dans les hépatocytes. La constante d'affinité du cytochrome P450 pour le substrat MCF (2,7 mM) est supérieure à celle obtenue pour le substrat 7-éthoxyrésorufine (144 nM) dans les microsomes de truite arc-en-ciel (ELCOMBE et LECH, 1979). Plusieurs raisons peuvent expliquer cette différence. Ainsi, même si leur structure est similaire (MILLER, 1983), le MCF diffère de l'éthoxyrésorufine principalement par sa partie méthoxy. De plus, l'environnement cellulaire vis-à-vis de l'accessibilité du substrat (absorption/élimination et liaison non-spécifique du substrat) n'est pas identique. Les conditions expérimentales telles que la concentration intracellulaire du NADPH, l'oxygène, de même que la température d'incubation par laquelle les constantes cinétiques sont dérivées ne sont pas les mêmes (22 °C pour les hépatocytes et 30 °C pour l'essai EROD). La température d'incubation pour les hépatocytes a été sélectionnée parce que des températures supérieures à 25 °C sont généralement incompatibles pour l'intégrité métabolique et la viabilité cellulaire des hépatocytes de truite (KLAUNING *et al.*, 1985). Des essais ultérieurs sur l'influence de la température en fonction de l'activité de MCFOD dans les

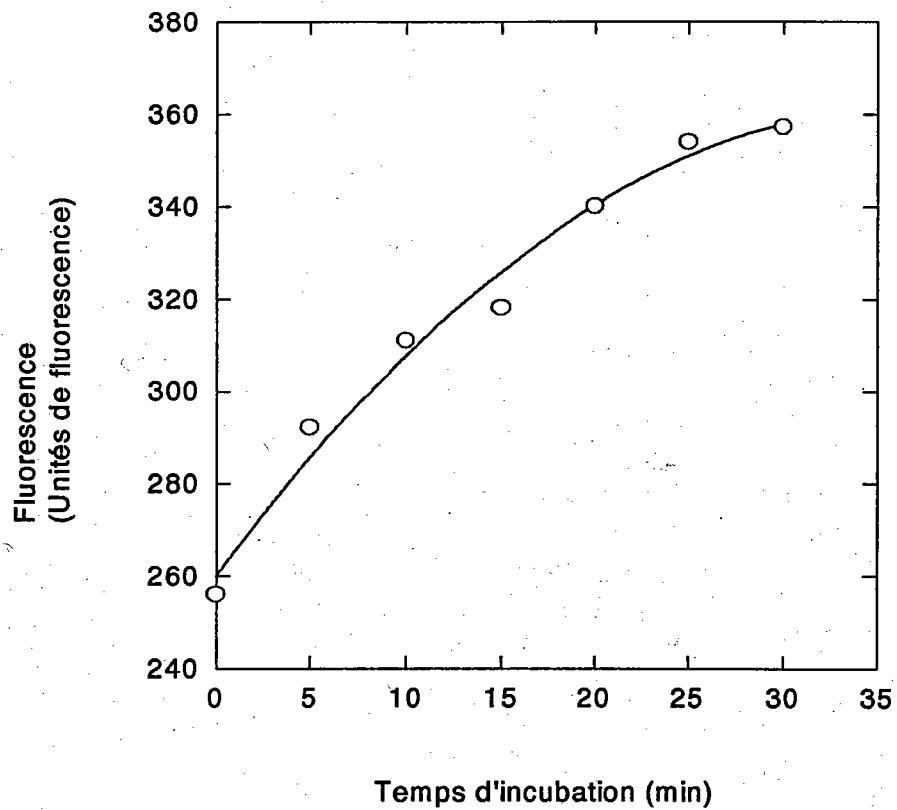


figure 4.3 Linéarité de la déméthylation du substrat MCF dans le temps.

Les hépatocytes (50×10^3) sont incubés avec $30 \mu\text{M}$ du substrat pendant 30 min. Les unités de fluorescence relative correspond à la conversion du MCF en carboxyfluorescéine.

hépatocytes vivants, bien qu'intéressants, n'ont pas été entrepris. Avec la concentration de 30 mM choisie pour le substrat, la réaction de déméthylation est linéaire jusqu'à 25 min (figure 4.3).

Parce que le substrat diffère de celui utilisé pour l'EROD, nous avons aussi vérifié son activité relative vis-à-vis de certains compartiments intracellulaires de l'hépatocyte en présence de 0,5 mM de NADPH (tableau 4.1). Une activité MCFOD est concentrée dans les microsomes selon un facteur d'enrichissement de 3. Ce résultat est logique parce que le P4501A se trouve normalement dans ce compartiment (c'est-à-dire le réticulum endoplasmique). L'activité MCFOD dans les mitochondries n'a pas été vérifiée ici.

Des expériences préliminaires nous ont permis d'établir que la culture d'hépatocytes peut être maintenue pendant 72 h à 15 °C sans aucune perte importante de viabilité (résultats non publiés). Lors de ces essais, la diminution de l'activité du cytochrome P450 était moins prononcée durant les premières 48 h. Ces résultats sont en accord avec ceux de LORENZEN et OKEY (1990) qui ont constaté que les hépatocytes conservent leurs capacités à induire le cytochrome P4501A1 pendant deux jours en maintenant le récepteur Ah (« Aromatic hydrocarbon »), impliqué dans le mécanisme d'induction du P4501A1, dans ces cellules eucaryotes. Une période d'exposition de 48 h traduit donc un compromis optimal entre la viabilité cellulaire et la capacité d'induire le cytochrome P450 1A1. Une culture primaire d'hépatocytes de truite arc-en-ciel maintient

également sa capacité d'induire le P4501A1 pendant au moins 48 h. Le β -naphthoflavone (β -NF) et le benzo(a)pyrène (BaP), deux inducteurs classiques du cytochrome P450 1A1 dans les hépatocytes et le foie de truite (BUHLER et WILLIAMS, 1988 ; ELCOMBE et LECH, 1979 ; PESONEN *et al.* , 1992), nous ont servis à confirmer la spécificité du substrat MCF. Ils nous ont aussi été utiles pour valider l'essai cytométrique visant à détecter des inductions significatives avec le MCF. Une induction, qui se traduit par une élévation significative de la fluorescence moyenne de la population d'hépatocytes, est manifeste après une exposition à ces inducteurs (tableau 4.2).

Si la mesure d'induction des OFM est possible avec le substrat MCF et des inducteurs spécifiques du cytochrome P4501A1, la spécificité du substrat à cette sous-famille reste à établir. L'analogue éthoxy du MCF initialement utilisé par MILLER (1983) est réputé être spécifique aux HAPs en général, ce qui induit le P4501A1, mais il n'est pas clairement défini si le MCF se comporte de la même façon. Il se peut que le MCF puisse être spécifique pour le P4501A2 également (ROBERTS et al., 1993). Nos résultats indiquent incontestablement une réponse avec le β -NF et le BaP mais d'autres expériences devront confirmer la spécificité du substrat vis-à-vis du P4501A1. Des essais avec du cytochrome P4501A1 reconstitué ou bien avec des anticorps monoclonaux pourraient, en autres, confirmer cette spécificité. On remarquera que le butanol (et l'éthanol : résultats non inclus), ne provoquent pas une élévation de l'activité MCFOD (tableau 4.2).

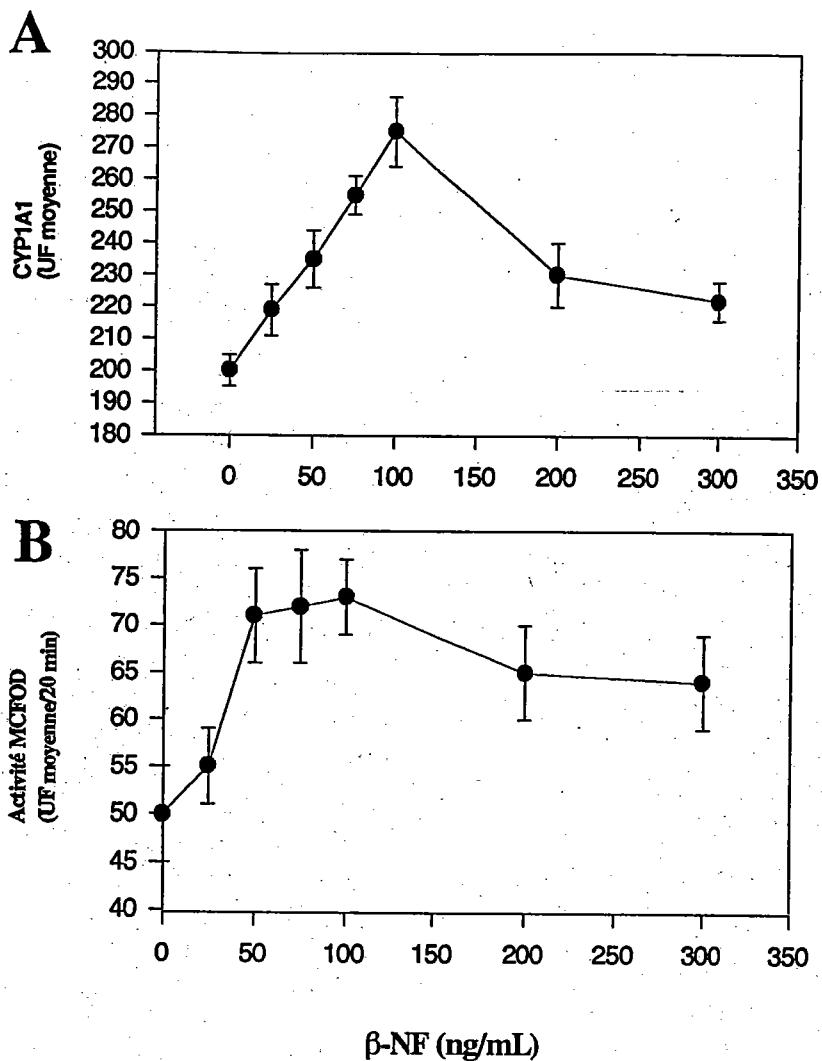


figure 4.4 Induction du cytochrome P4501A1 par le β -NF dans les hépatocytes.

Les hépatocytes de Truite sont exposés au β -NF pendant 48 h à 15 °C. Le cytochrome P4501A1 est évalué au niveau de la transcription (A) et de la traduction (B). Les données représentent la moyenne des unités de fluorescence (UF) obtenues à partir de 4 sous-échantillons subdivisés.

Tel que soupçonné, l'exposition au Cd entraîne une baisse dans l'activité MCFOD (tableau 4.2). Le Cd a déjà été reconnu comme inhibiteur de la quantité du cytochrome P450 total dans le foie de rat (EATON *et al.*, 1980). Une étude plus récente démontre que la Plie traitée avec le Cd et le 3-méthylcholanthrène administrés de façon concomitante réduit l'activité de l'EROD et la quantité du cytochrome P450 total (GEORGE et YOUNG, 1986). Nos résultats démontrent aussi l'antagonisme du Cd envers l'expression des cytochromes P450 dans les hépatocytes.

L'activité du cytochrome P4501A1 peut être aussi suivie par la mesure de son ARNm, le CYP1A1 ARNm. Une exposition au β -NF entraîne une élévation de fluorescence qui représente une élévation du nombre de la sonde d'ADN qui s'est hybridée sur l'ARNm du CYP1A1 dans les hépatocytes (figure 4.4). Après une exposition de 48 h au β -NF, les hépatocytes ont été recueillis pour l'analyse de leur contenu en activité MCFOD et en CYP1A1 ARNm. L'intensité d'hybridation est plus élevée dans les cellules exposées à 50 ng/mL et plus de β -NF. Une corrélation significative est obtenue entre l'activité MCFOD et les niveaux relatifs d'ARNm ($R = 0,906$; $p=0,0129$). Celle-ci indique que l'intensité d'hybridation augmente avec l'activité MCFOD et suggère qu'il n'y a pas de régulation post-transcriptionnelle significative de l'ARNm du CYP1A1 dans les hépatocytes. Ces résultats suggèrent aussi que la mesure d'ARNm par hybridation fluorescente *in situ* (HFIS) peut servir à dépister le potentiel d'induction d'échantillons environnementaux contenant des substances inductrices telles que les HAP, BPC,

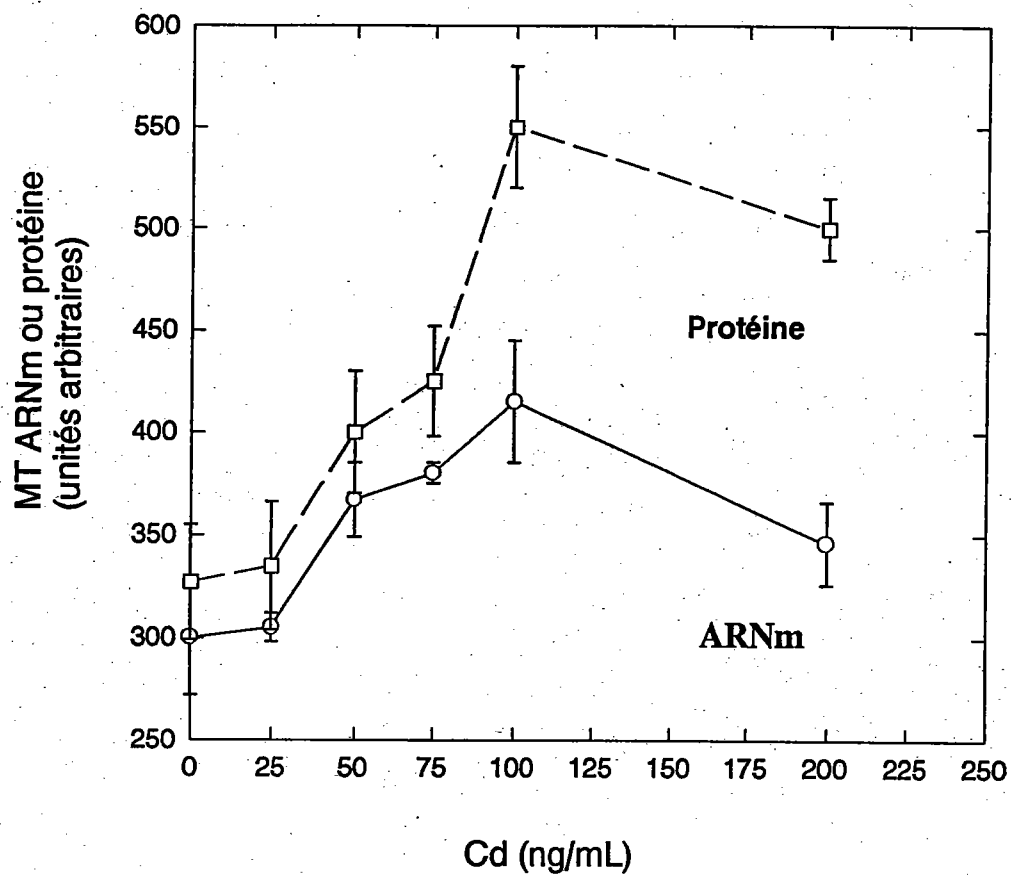


figure 4.5 Induction de la MT par le Cd dans les hépatocytes de Truite.

Les hépatocytes sont exposés à plusieurs concentrations de Cd pendant 48 h. La MT est évaluée au niveau de la transcription (—) et de la traduction (---).

dioxines et furannes. Cette méthode offre un moyen rapide d'évaluer semi-quantitativement (i.e. pas entièrement quantitatif parce qu'on ne connaît que la valeur relative des ARNm) l'expression génétique dans chaque cellule. La génération de sondes d'ADN par réaction en chaîne de la polymérase asymétrique (RCP) présente les avantages de générer des sondes de longueurs variées (180 nucléotides pour la MT et environ 1500 nucléotides pour le CYP1A1) afin d'obtenir une grande spécificité sans toutefois compromettre son entrée dans l'environnement intracellulaire. Nos travaux démontrent que des sondes allant de 180 à 1400 bases peuvent être utilisées pour l'hybridation *in situ* avec les hépatocytes de truite arc-en-ciel.

4.3.3 Induction de la métallothionéine

La MT se détermine au niveau de la protéine selon la méthode de la saturation à l'Ag et au niveau de son ARNm avec la méthode HFIS. Les hépatocytes exposés à un inducteur bien connu de la MT (HAMER, 1986), le Cd, montrent une élévation de l'hybridation de la sonde de la MT dans les hépatocytes exposés pendant 48 h au Cd à partir de 50 ng/mL (figure 4.5). L'induction de la MT ARNm suit les niveaux de MT à l'échelle traductionnelle. En effet, il existe une corrélation positive entre les niveaux intracellulaires de la protéine et de l'ARNm ($R = 0,830$; $p = 0,04$), ce qui suggère qu'il n'y a pas de régulation post-transcriptionnelle significative dans les hépatocytes traités au Cd. La mesure de l'ARNm de la MT dans chaque cellule est donc possible par HFIS avec une sonde produite par la méthode RCP asymétrique.

Conditions	fluorescence (Unités relatives) ^a
Cellules et IP	10±5
Cellules, fluorescéine-streptavidine, et IP	95±7
Cellules, fluorescéine-streptavidine, biotine-dUTP, et IP	95±8
Cellules ^b , fluorescéine-streptavidine, biotine-dUTP, Pol 1, et IP	225±12
Cellules ^b , fluorescéine-streptavidine, biotine-dUTP, Pol 1 + DNase ^c , et IP	418±30

a. Unités relatives de fluorescence normalisées par la quantité totale de l'ADN.

b. Cellules exposées à 200 ng/mL de BaP pendant 48 h à 15 °C.

c. DNase : Déoxyribonucléase 1.

tableau 4.3 Translation *in situ* de brèche d'ADN.

4.3.4 Génotoxicité

Nos travaux ont porté sur la mesure de la réparation intracellulaire de l'ADN suivant le principe de la translation de brèche. L'enzyme Pol1 incorpore des nucléotides dans la brèche formée lors d'un dommage à la chaîne de l'ADN selon son activité de polymérase ADN-dépendante tout en déplaçant la brèche en direction de son activité exonucléase. Ainsi, le complexe enzymatique Pol1 incorpore considérablement plus de nucléotides, dont la biotine-dUTP, que le nombre initial de nucléotides contenu dans la brèche, à condition toutefois qu'il n'y ait pas trop d'empêchement stérique. La fixation des cellules à l'éthanol suivie d'une étape de perméabilisation se sont avérées nécessaires pour conserver la morphologie cellulaire et faciliter la diffusion de Pol1 dans le compartiment nucléaire. Une fixation avec le formaldéhyde n'est pas recommandée car elle limite la diffusion des macromolécules. Les fixatifs qui contiennent des aldéhydes forment des ponts ou réseaux intramoléculaires de sorte que la diffusion de la Pol1 est limitée et rejoint difficilement l'ADN dans le noyau. En fait, d'autres chercheurs ont trouvé que la fixation avec le formaldéhyde nécessite une incubation de 12 h avec l'enzyme Pol1 (GOLD *et al.*, 1993), tandis qu'une fixation à l'éthanol suivie d'une perméabilisation ne requiert qu'une incubation de 0,5 à 2 h. Lorsque les hépatocytes sont incubés avec la Pol1 en présence de biotine-dUTP ou de fluorescéine-dUTP pendant 1 h à 37 °C, une incorporation significative de nucléotides est observée par rapport aux cellules non exposées à la Pol1 (**tableau 4.3**). En plus, l'addition de la déoxyribonucléase 1 dans le milieu d'incubation augmente significativement l'incorporation de nucléotides dans l'ADN, telle qu'exprimée par une élévation de la fluorescence (de la

fluorescéine) de la population cellulaire. La déoxyribonucléase 1 est quelquefois ajoutée avec la Pol1 pour faciliter son action par la production de brèches additionnelles. L'essai NTA de l'ADN peut détecter la présence de trous à simple brin dans la chaîne d'ADN (SNYDER et MATHESON, 1985) qui constitueraient des dommages précoces (FENECH, 1993). Étant donné que la Pol1 nécessite un brin complémentaire pour incorporer un nucléotide complémentaire et pour déplacer la brèche, cet essai ne permet pas de détecter des cassures à double brins sur l'ADN ou bien des conformations simple brin dans l'ADN qui surviennent lors du mauvais appariement des bases résultant de mutations, d'adduits ou d'incorporation de substances entre les deux chaînes. L'inclusion d'un deuxième test, la précipitation alcaline (PA) de l'ADN, qui peut détecter la présence de doubles et de simples brins d'ADN et possiblement de régions à simple brin, à cause de leur fragilité, peut s'avérer utile dans certaines situations. Lors de l'évaluation de composés très toxiques, on observe quelquefois une diminution significative de l'incorporation de biotine-dUTP par rapport aux cellules témoins tout en démontrant des effets lors de l'essai de la PA de l'ADN. Cette observation suggère que les dommages soient de nature double brins plutôt que simple brin. La présence de certains adduits peut bloquer l'activité exonucléase et entraîner une baisse de l'incorporation de nucléotides. Ce phénomène peut être observé avec des substances ou concentrations très toxiques avec lesquelles des baisses significatives de la viabilité cellulaire sont rencontrées. Une baisse significative de nucléotides par rapport aux cellules non exposées pourrait donc être interprétée comme une autre forme de génotoxicité. Dans certains cas, l'addition de la déoxyribonucléase 1 peut contrecarrer

l'inhibition de l'activité de la Pol1 et démontrer une incorporation accrue de nucléotides par rapport aux cellules témoins en sa présence.

La formation de double brins peut résulter d'une mort cellulaire par apoptose (GOLD *et al.*, 1993). Les deux tests de génotoxicité (NTA et PA) peuvent aussi détecter ce type de dommage. Durant l'apoptose, le dommage à l'ADN ne provient pas d'une interaction avec des xénobiotiques mais plutôt d'une auto-dégradation intranucléaire de l'ADN. Les cellules apoptotiques contiennent un ADN dégradé mais leur perméabilité membranaire demeure intacte et elles continuent donc à exclure l'IP, du moins pour un certain temps. Une baisse significative de l'ADN dans des cellules apparemment viables peut suggérer l'occurrence de ce phénomène. Pour le diagnostiquer, il faut évaluer le contenu total de l'ADN (IP et RNase) dans les hépatocytes. En plus, une dégradation de l'ADN peut survenir lorsque la concentration d'exposition est proche de celle engendrant la cytotoxicité. En effet, une dégradation rapide a été observée chez les hépatocytes de rat traités avec des substances toxiques (ELIA *et al.*, 1994). Lorsque la cellule perd sa viabilité en raison d'un ralentissement métabolique des mitochondries, il y aurait dégradation de l'ADN par l'action des nucléases intracellulaires qui libèrent des fragments d'ADN double brins à poids moléculaire élevé, lesquels sont détectés par électrophorèse à champs électriques pulsés (ELIA *et al.*, 1994). La mort cellulaire par nécrose et apoptose représenterait deux extrêmes ou pôles liés de l'expression de la cytotoxicité. Enfin, la génotoxicité devient plus pertinente pour l'évaluation du risque de la toxicité à long terme

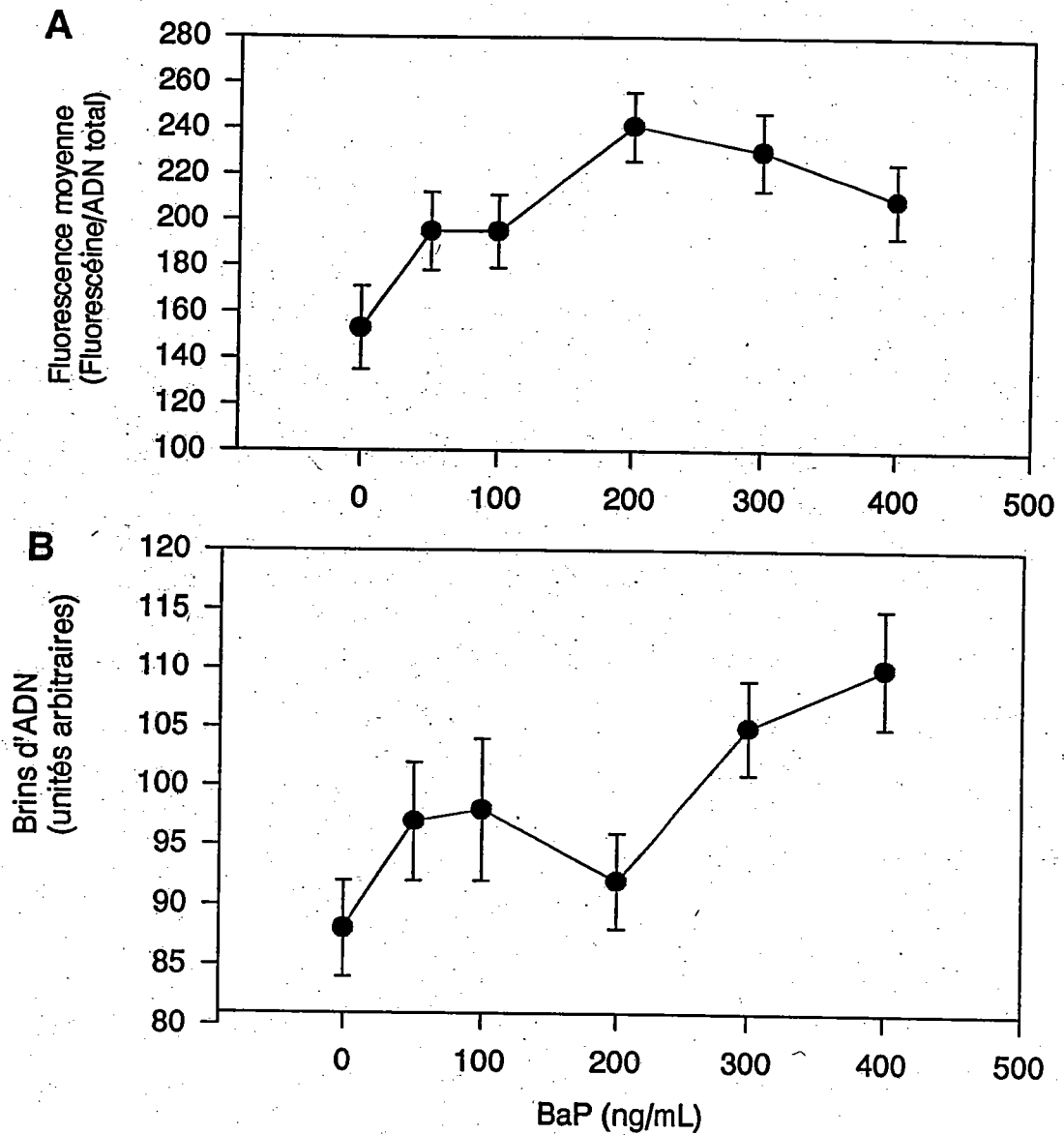


figure 4.6 Génotoxicité du BaP dans les hépatocytes.

Les cellules sont exposées au BaP pendant 24 h et le dommage à l'ADN est évalué par le test NTA (A) et PA (B) de l'ADN. Les données représentent la moyenne de 4 sous-échantillons avec l'écart-type.

lorsque les dommages surviennent en l'absence de cytotoxicité. Dans le cas où la génotoxicité se manifeste en même temps que la cytotoxicité (nécrose ou apoptose), l'interprétation devient plus difficile sur le plan du risque puisque la fragmentation de l'ADN devient possiblement le mécanisme responsable de la mort cellulaire. L'apoptose peut être mesurée en ajoutant une deuxième sonde - la fluorescéine diacétate - lors de l'évaluation de la viabilité cellulaire (MORRIS *et al.*, 1995). Les cellules apoptotiques excluent l'IP et leurs activités estérasiqes sont négligeables tandis que les cellules viables présentent une activité estérasiqes tout en excluant l'IP. Les cellules nécrotiques sont perméables à l'IP et leurs activités estérasiqes sont négligeables. Les cellules intactes présentent une activité estérasiqes tout en excluant l'IP.

Une exposition des hépatocytes au BaP, un génotoxique/cancérogène reconnu, entraîne un effet génotoxique (CMEO = 50 ng/mL) avec le test NTA (**figure 4.6A**) et le test de la PA (**figure 4.6.B**). Les résultats de ces deux tests montrent aussi qu'une exposition au N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), un génotoxique qui ne requiert pas d'activation métabolique, s'avère également génotoxique (**figure 4.7**). Les tests NTA et PA présentent des CMEO de 50 µg/mL. Le BaP est environ 1000 fois plus génotoxique que le MNNG vis-à-vis des hépatocytes. Le β-NF possède aussi un potentiel génotoxique (CMEO de 100 ng/mL : voir article sur la mesure du P4501A dans le hépatocytes à l'aide de la cytométrie en flux à l'annexe 2) pour les hépatocytes de truite. Le β-NF est un puissant inducteur du P4501A1, responsable du métabolisme des xénobiotiques de type HAP (PESONEN *et al.*, 1992). Par contre, le potentiel mutagénique du β-

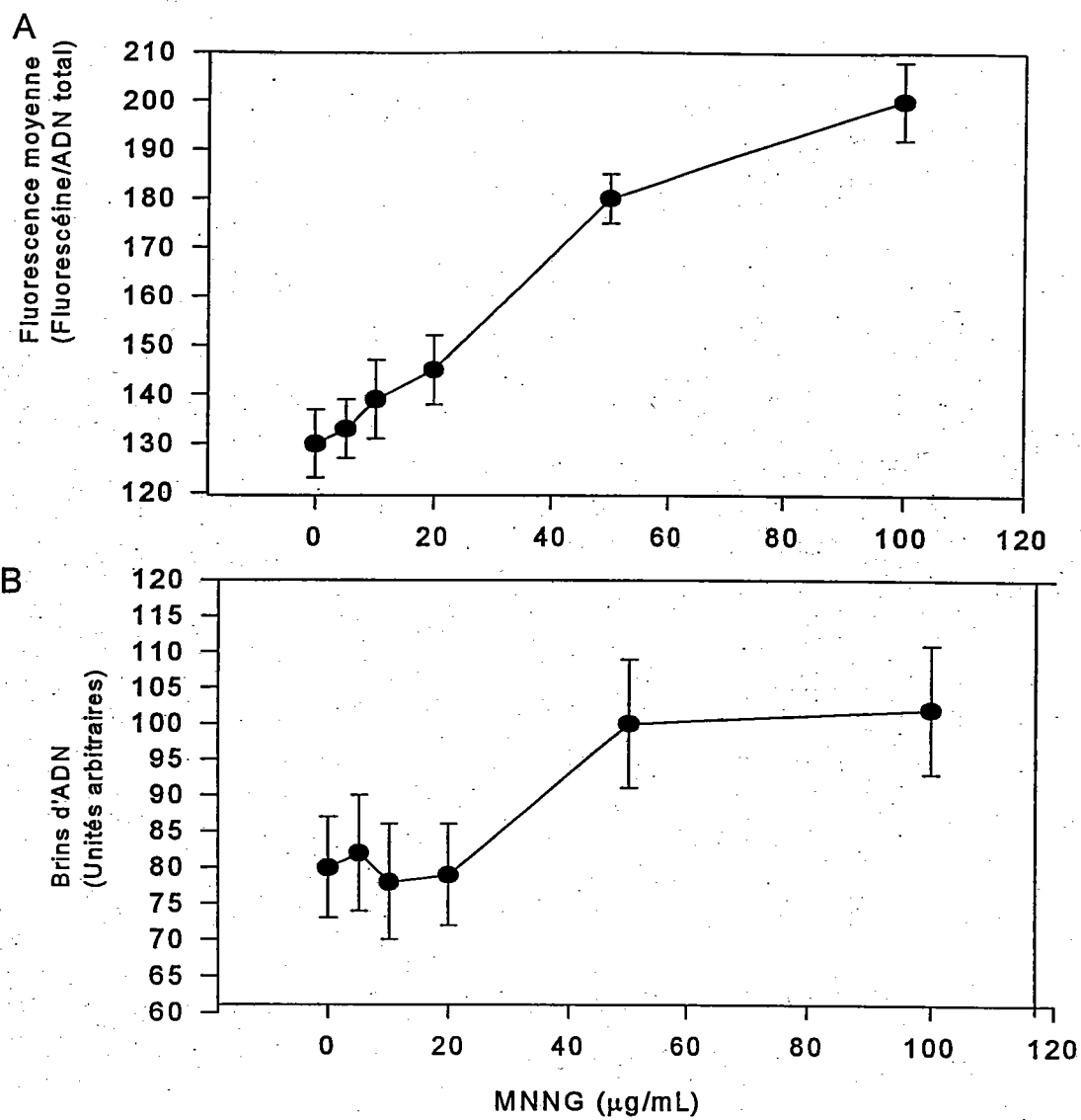


figure 4.7 Génotoxicité du MNNG.

Les hépatocytes sont exposés au MNNG pendant 24 h et le dommage à l'ADN est évalué par le test NTA (A) et de la PA (B) de l'ADN. Les données représentent la moyenne de 4 sous-échantillons avec l'écart-type.

NF n'est pas clairement établi (MC KILLOPP et CASE, 1991) mais il est génotoxique pour les hépatocytes exposés *in vitro*.

4.3.5 Conclusions

La viabilité des hépatocytes a été évaluée en mesurant l'exclusion à l'iodure de propidium. Cette méthode évalue la mort cellulaire qui résulte d'un dommage nécrotique. Ce dommage se traduit par une perte significative de la perméabilité membranaire, d'un arrêt de la synthèse de protéines et d'un arrêt du métabolisme énergétique. Cependant, cette méthode ne peut détecter la mort cellulaire apoptotique qui se traduit par une autodégradation de l'ADN tout en maintenant, pour un certain moment, sa perméabilité membranaire et son métabolisme énergétique. Toutefois, cette mort cellulaire par apoptose pourrait être mesurée indirectement par une baisse de l'ADN total lors de l'essai NTA. La cellule apoptotique perdra éventuellement sa perméabilité membranaire et son métabolisme énergétique et sera finalement détectée avec le test de viabilité cellulaire.

Nous avons démontré trois façon de mesurer l'induction du cytochrome P4501A1 à l'aide 1) de l'essai enzymatique EROD sur foie de truitelles, 2) de l'essai MCFOD sur hépatocytes par la cytométrie en flux et 3) de l'essai HFIS de l'ARNm sur hépatocytes. Pour estimer ce biomarqueur, on devrait idéalement le faire au niveau de l'ARNm, de la protéine et de l'activité catalytique. Dans certains cas d'exposition à des mélanges, la présence de substances induira

l'expression d'une enzyme tandis que d'autres inhiberont l'activité catalytique. Au niveau cellulaire, ceci veut dire que l'induction se manifestera par une élévation des ARNm et de la protéine alors que l'activité enzymatique demeurera inchangée à cause de la présence de produits inhibiteurs. Par exemple, certains congénères de BPC induiront la protéine mais son activité sera inhibée si ces derniers sont suffisamment concentrés (GOKSOYR *et al.*, 1991). La mesure exclusive de l'induction enzymatique comporte donc le risque de rapporter des résultats négatifs malgré une induction de la synthèse du P4501A1. L'ajout d'une mesure à l'échelle protéique (anticorps) ou bien à l'échelle de l'ARNm s'avère donc recommandable dans l'étude de mélanges toxiques.

Étant donné que la MT s'avère dépourvue d'activité catalytique connue, la mesure de cette protéine par l'essai de saturation à l'Ag ne présente donc pas de risque d'interférence enzymatique. Néanmoins, cette mesure au niveau transcriptionnel présente l'avantage d'une plus grande spécificité que l'essai de saturation à l'Ag et d'une plus grande sensibilité que celui-ci car sa mesure se réalise au niveau de chaque cellule avec une biomasse cellulaire moins importante. L'essai de saturation à l'Ag est malgré tout un essai sensible, rapide et d'une spécificité relativement bonne, bien que le ratio exact de liaison de l'Ag sur la MT d'origine ichthyenne soit encore inconnu. Selon la proportion de cystéine dans les MT de truite arc-en-ciel (PRICE-HAUGHEY *et al.*, 1986), le ratio de liaison d'Ag monovalent pourrait se situer dans l'intervalle de 15 à 17 moles d'Ag /mole de MT tout comme dans les MT mammaliennes.

La génotoxicité peut être évaluée selon le test NTA qui détecte principalement de petits dommages à simples brins et le test PA qui détecte des dommages simples et doubles brins. Ces deux bioessais détectent des dommages primaires à l'ADN qui peuvent diriger les cellules vers la formation de mutations potentiellement néfastes pour la cellule. Par contre, ces essais s'avèrent inappropriés pour estimer le potentiel cancérigène de substances cancérigènes non génotoxiques. Ainsi, la prolifération de la division cellulaire par activation/suppression d'oncogènes ou par action hormonale, les proliférateurs de peroxysomes et les altérations de la différenciation cellulaire doivent se mesurer autrement. Dans ce cas, il devient alors essentiel d'appliquer des bioessais spécifiques pour l'étude de ces substances cancérigènes qui sont parfois non génotoxiques.

5. Application du modèle hépatocyte sur diverses matrices environnementales: résultats et discussion

5.1 Effluents industriels

5.1.1 Effet sur la viabilité cellulaire

Types d'effluent	Modèle hépatocyte (ST % en v/v) ^a	Truite (ST % en v/v)
CI ₁ ^b	nd ^g	nd
CI ₂	0,06	0,42
CI ₃	0,03	0,5
CI ₄	nd	nd
TS ₁	0,3	8,9
TS ₂	nd	nd
TS ₃ ^c	nd	nd
TS ₄	0,3	0,3
PP ₁ ^d	0,3	25
PP ₂	3,2	32
PP ₃	0,32	71
PP ₄	0,7	33
PP ₅	22	41
CO ₁ ^e	nd	nd
CO ₂	32	nd
CO ₃	32	nd
CO ₄	32	nd
CO ₅	32	nd
M ₁ ^f	nd	nd
M ₂	nd	nd
M ₃	nd	nd
M ₄	32	nd
M ₅	32	nd
M ₆	nd	nd
M ₇	nd	nd

a. seuil toxique, exprimé en % v/v, obtenu selon la formule du seuil toxique $(ST) = (CMEO \times CMSEO)^{1/2}$.

b. CI : chimie inorganique.

c. TS : traitement de surface.

d. PP : pâtes et papiers.

e. CO : chimie organique incluant le secteur pétrochimique.

f. M : métallurgie.

g. nd : non détecté.

tableau 5.1 Cytotoxicité des rejets industriels.

La cytotoxicité des effluents industriels est étudiée sur 25 effluents. Ceux-ci proviennent de plusieurs secteurs : chimie organique, chimie inorganique, traitement de surface, pâtes et papiers et métallurgie. Environ 64 % des effluents industriels étudiés présentaient une cytotoxicité vis-à-vis des hépatocytes comparativement à 35 % vis-à-vis du test de létalité avec truite (**tableau 5.1**). La toxicité des secteurs industriels décroît selon l'ordre suivant : chimie inorganique > traitement de surface > pâtes et papiers > chimie organique > métallurgie. Ces résultats concordent généralement avec d'autres bioessais couramment appliqués lors d'évaluations écotoxicologiques d'effluents industriels (COSTAN *et al.*, 1993).

5.1.2 Induction de la métallothionéine

Bien que les effluents des usines de pâtes et papiers soient bien connus pour leur capacité à induire la MT (section 3.3.2), ceux d'autres secteurs industriels peuvent aussi l'induire dans les hépatocytes (**tableau 5.2**). Certains effluents de deux secteurs en particulier (chimie inorganique et pâtes et papiers) ont démontré de fortes inductions. Contrairement aux effluents des usines du secteur des pâtes et papier, il existe peu de données documentant la capacité d'effluents d'autres secteurs à induire la MT. Ces résultats préliminaires démontrent cependant que celle-ci est induite chez des effluents des secteurs de la chimie inorganique, traitement de surface, chimie organique et métallurgie, lesquels contiennent vraisemblablement des métaux lourds biodisponibles. Le modèle hépatocyte apparaît ici suffisamment sensible pour justifier son

Type d'effluent	Modèle hépatocyte (ST %v/v) ^a	Truite (ST % v/v)
CO ₁ ^b	0,3	3
TS ₁ ^c	32	nd ^g
TS ₂	4,5	3,2
TS ₃	32	nd
PP ₁ ^d	0,032	0,32
PP ₂	0,032	3,2
PP ₃	nd	nd
PP ₄	nd	nd
CI ₁ ^e	nd	nd
CI ₂	0,003	0,03
M ₁	22	71
M ₂ ^f	nd	nd

a. seuil toxique, exprimé en % v/v, obtenu selon la formule du seuil toxique (ST) = (CMEO_xCMSEO)^{1/2}.

b. CO : chimie organique et pétrochimie.

c. TS : traitement de surface.

d. PP : pâtes et papiers.

e. CI : chimie inorganique.

f. M : métallurgie.

g. nd : non détecté.

tableau 5.2 Induction de la MT par les effluents industriels.

emploi lors d'investigations futures visant à estimer la contamination par les métaux de sources industrielles variés.

5.1.3 Induction du cytochrome P4501A par les effluents industriels

Dix-neuf effluents industriels provenant de plusieurs secteurs ont été retenus pour évaluer l'induction du cytochrome P4501A1 avec le MH (tableau 5.3). Les résultats sont exprimés en seuils toxiques en % v/v (ST) comme décrit à la section 4.2.6. Environ 44 % des effluents ont produit des inductions après une exposition de 48 h des hépatocytes. Il semble que les rejets des secteurs des pâtes et papier, chimie organique et traitement de surface sont de bons inducteurs du cytochrome P4501A1 autant chez l'hépatocyte que chez la truite. La nature chimique des effluents du secteur chimie inorganique peut expliquer le faible potentiel d'induction du cytochrome P4501A1. La forte induction du P4501A1 par l'un de ces effluents est intrigante car la quantité de substances organiques coplanaires dans ce secteur industriel ne devrait pas être importante. Il est évident que des investigations futures visant à établir des liens de cause-effet pour cet effluent et pour d'autres s'avèreraient informatives.

5.1.4 Génotoxicité des effluents industriels

Le potentiel génotoxique des effluents industriels a aussi été évalué avec le MH et avec le bioessai truite (tableau 5.4). Environ 50 % des rejets présentaient une activité génotoxique vis-à-

Types d'effluent	Modèle hépatocyte MCFOD (ST % v/v) ^a	Truite EROD (ST %v/v)
CI ₁ ^b	nd ^g	nd
CI ₂	nd	nd
CI ₃	0,002	0,002
CI ₄	nd	nd
CI ₅	nd	nd
PP ₁	0,32	3
PP ₂	0,32	0,32
PP ₃	nd	0,32
PP ₄ ^c	0,01	0,05
PP ₆	nd	nd
CO ₁	0,003	0,3
CO ₂	nd	nd
CO ₃ ^d	nd	nd
TS ₁	3	2,2
TS ₂	0,03	16
TS ₃	32	0
TS ₄ ^e	nd	nd
TS ₅	nd	nd
M ₁ ^f	nd	nd

a. seuil toxique, exprimé en % v/v, obtenu selon la formule du seuil toxique (ST) = (CMEOxCMSEO)^{1/2}.

b. CI : chimie inorganique.

c. PP : pâtes et papiers.

d. CO : chimie organique incluant l'industrie pétrochimique.

e. TS : traitement de surface.

f. M : métallurgie.

g. nd : non détecté.

tableau 5.3 Induction du cytochrome P4501A1 par les effluents industriels.

vis du MH. Le test de la précipitation alcaline de l'ADN fut comparé pour les deux systèmes bioanalytiques étant donné sa réalisation plus facile sur l'homogénat des foies de truitelles. Nos résultats confirment bien la présence d'activité génotoxique dans certains effluents avec nos deux essais ichtyens. Celle-ci a également été rapportée pour divers types de rejets industriels avec des tests bactériens (HOUK, 1992; WHITE *et al.*, 1995).

5.2 Eaux de surface : rejet municipal et son panache

Le MH a été utilisé pour mesurer la génotoxicité, le potentiel d'induction de la MT et du P4501A1, ainsi que la viabilité cellulaire après une exposition de 48 h des hépatocytes à plusieurs concentrations d'échantillons d'eau (0, 1, 10 et 50 % v/v), prélevés à même l'effluent municipal, à 1 km en amont du point de rejet, et à 0,3, 4 et 8,5 km dans son panache (en aval du point de rejet). Un échantillon d'eau fut aussi recueilli à 8,5 km en aval de la source mais à l'extérieur du panache. Les résultats sont présentés à la **figure 5.1**.

5.2.1 Effets sur la viabilité cellulaire

Des effets faiblement cytotoxiques sont observés lorsque les hépatocytes sont exposés aux échantillons prélevés dans le panache du rejet municipal à 0,3, 4 et 8,5 km. Ces effets n'y apparaissent pas liés puisqu'aucun effet de dilution n'est apparent. Ceci suggère qu'il existe d'autres sources de substances toxiques en aval de l'émissaire municipal.

Types d'effluent	Modèle hépatocyte (% v/v) ^a	Truite (% v/v)
CO ₁ ^b	0,3	3
TS ₁ ^c	0,003	0,032
TS ₂	0,03	16
TS ₃	22	0,32
PP ₁ ^d	3,2	0,32
PP ₂	nd ^g	nd
PP ₃	nd	nd
PP ₄	nd	nd
CI ₁ ^e	nd	nd
M ₁	0,32	16
M ₂ ^f	nd	nd

a. seuil toxique, exprimé en % v/v, obtenu selon la formule du seuil toxique (ST) = (CMEOxCMSEO)^{1/2}.

b. CO : chimie organique et pétrochimique.

c. TS : traitement de surface.

d. PP : pâtes et papiers.

e. CI : chimie inorganique.

f. M : métallurgie.

g. nd : non détecté.

tableau 5.4 Génotoxicité des effluents industriels selon la précipitation alcaline de l'ADN.

5.2.2 Induction de la métallothionéine

Les niveaux de la MT (ARNm) sont significativement induits par l'effluent municipal et ce potentiel d'induction baisse au fur et à mesure qu'on s'éloigne du point de rejet. Ce résultat suggère que l'effluent renferme des métaux biodisponibles et qui induisent la MT dans les hépatocytes. Nous savons que celle-ci peut être induite par des métaux lourds (HAMER, 1986) ou par des produits qui occasionnent un stress oxydant (SATO et BREMNER, 1993). La quantification de métaux dans l'effluent étudié serait donc pertinente pour confirmer ce type d'effet observé. L'échantillon d'eau prélevé à 8,5 km en aval à l'extérieur du panache, ne montrait aucun effet significatif sur les hépatocytes, ce qui semble indiquer une qualité aqueuse similaire à celle de l'amont.

5.2.3 Induction du P4501A1

L'exposition des hépatocytes à l'effluent municipal entraîne une induction du CYP1A1 et comme pour la MT, le potentiel d'induction diminue lorsqu'on s'éloigne du point de rejet. L'effluent étudié contient des HAP, BPC et dioxines, substances pouvant induire ce système. Sa concentration totale en HAP, calculée à partir de 21 HAP considérés prioritaires, était de $4 \pm 0,3$ $\mu\text{g/L}$ et celle des BPC totaux, calculée à partir de 13 congénères prioritaires, s'élevait à $0,6 \pm 0,015$ $\mu\text{g/L}$. Même si ce dernier est reconnu comme pouvant induire le P4501A1 (ELCOMBE et

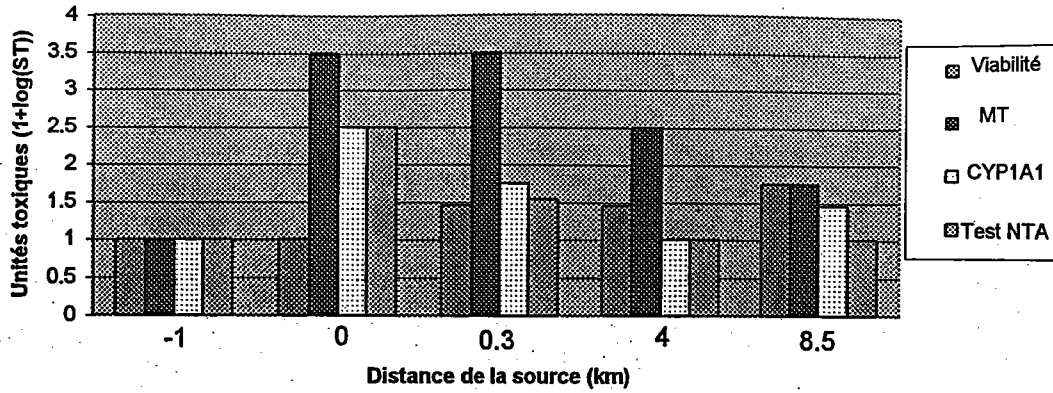


figure 5.1 Cytotoxicité d'un rejet municipal

Les hépatocytes sont exposés à plusieurs concentrations d'un rejet municipal et à des échantillons obtenus à différentes distances de son origine. Les résultats de la viabilité, de la génotoxicité (test NTA) et de l'induction de la MT et du P4501A1 au niveau de la transcription par la méthode HFISH sont rapportés. Les unités toxiques sont exprimés sous forme seuil toxique (ST).

LECH, 1987), il reste toutefois à établir si de telles concentrations peuvent induire ce système dans les hépatocytes de truite. Il est possible que d'autres substances soient aussi responsables de l'induction du P4501A en plus des HAP et BPC identifiés. Un prélèvement à 4 km et 8,5 km ne montrait aucun effet significatif sur les hépatocytes par rapport aux sites localisés en amont et à 8,5 km à l'extérieur du panache.

5.2.4 Génotoxicité

L'activité génotoxique s'est avérée significativement présente au niveau de l'effluent municipal ainsi qu'à une distance de 0,3 km en aval. Celle-ci a été mise en évidence avec le test NTA dans le cas présent, comme pour la MT et le P4501A1, l'établissement de liens cause-effet constituerait une suite logique à ces travaux.

Dans l'ensemble, cette étude d'un effluent municipal et de son panache démontre la valeur du MH pour mesurer divers effets cytotoxiques le long d'un gradient décroissant de polluants d'origine urbaine. Le MH est d'ailleurs pratique pour ce genre d'étude puisqu'il ne requiert que 10 mL d'échantillon contrairement au bioessai truite qui en nécessiterait 100 L.

5.3 Extraits organiques de sédiments marins

Sédiment extrait no.	Viabilité UT*	Test NTA UT	Test PA UT
1	320	nd**	nd
2	32000	32000	32000
3	320	nd	320
4	3200	32000	3200
5	320	32000	32000
6	320	nd	32000
7	3200	nd	nd
8	320	320	nd
9	3200	nd	nd
10	320	3200	nd
11	32000	3200	nd
12	320	3200	3200
13	320	nd	nd
14	nd	nd	nd

* UT : unités toxiques obtenues selon la formule $UT = 100(CMEO \times CMSEO)^{-1/2}$.

** Aucun effet mesuré à la plus forte concentration testée (1 %).

tableau 5.5 Caractéristiques toxicologiques des extraits organiques de sédiments marins.

L'étude d'extraits de sédiments avec le MH visait l'estimation de leur toxicité relative en fonction des critères de viabilité et de génotoxicité. La viabilité a été étudiée avec le test d'exclusion à l'IP et la génotoxicité par les tests PA et NTA. Des associations statistiques ont été réalisées entre les propriétés chimiques et toxicologiques des sédiments afin de tenter de dégager des informations sur les causes de leur contamination.

5.3.1 Viabilité cellulaire

Les résultats de cytotoxicité des extraits organiques de sédiments avec le MH est rapportée au **tableau 5.5**. L'analyse chimique sur ces mêmes extraits est détaillée au **tableau 5.6**. Les sédiments 1 à 8 représentent différents sous-échantillons d'un site portuaire marin, tandis que les sédiments 9 à 12 sont des sédiments de référence ayant des teneurs connues en pesticides organochlorés (Oc), HAP et BPC. L'échantillon 13 est un sable blanc supposément exempt de contaminants et l'échantillon 14 est un blanc analytique contenant du diméthylsulfoxyde (DMSO). Les extraits de dichlorométhane sont échangés dans le DMSO qui s'avère un véhicule compatible pour la réalisation d'essais avec les hépatocytes (i.e. ce solvant est un bon milieu de solubilisation des substances hydrophobes tout en n'étant pas très toxique vis-à-vis des hépatocytes). À l'exception de l'extrait 14, tous les extraits (93 %) s'avéraient cytotoxiques avec le test de viabilité. Les extraits 2 et 11 étaient les plus cytotoxiques (32 000 UT) suivis des

Échantillon	BPC ^a T ^d (ng/g)	HAP ^b T (µg/g)	OC ^c T (µg/g)
1	14,1 g, e, a, c, b, (i, f) h, d ^e	0,15 b, c, a	0,13 a
2	0,73 b, e, (a, c), h, g, d	nd ^f	0,12 a
3	7,4 e, (c, g), a, b, f, i, h, d, j	2,38 b, c, a, h, m, j, (l, i), (g, k), (f, d), e	0,61 d, a
4	4,61 e, a, c, b, g, f, h, d i, j	0,53 b, c, a, (d, h, i)	1,22 e, a, d
5	3,22 e, a, c, b, g, d, i, f, h, j	0,5 b, c, a, (d, h, j)	1,22 c, a, b
6	1,11 b, e, a, c, g, h, d	0,67 e, b, a, c, m, (l, d, a)	49,5 d, e, b, c
7	2,94 a, l, b, c, g, d, i, f h, j	1,78 b, c, k, (m, i), (l, j) a, h	3,1 d, (c, a)
8	3,17 f, b, c, a, g, d, (f, j, h), i	4,05 b, c, a, l, m, h, i, j, o, n, k, g, d, f, e	1,03 a, c, d
9	8,45 e, g, a, b, h, i, d, j, c, f	150,1 a, b, c, j, k, l, i, g, h, d m, n, o, f, e, p	18,1 d, a
10	29,82 e, a, b, c, g, d, h, f, j, i	6,38 b, c, k, l, a, j, i, (m, o), n, h, g, d, f	11,5 d, a
11	192,5 e, g, (c, a), h, d, (b, f), j, i	17,44 b, c, a, k, l, j, i, m, o, n, h, q, g, (d, e), f	270 d, c, a
12	11,82 e, g, b, a, h, j, f, d, i, c	3,36 k, b, l, a, m, g, i, (n, o), q (h, e, d)	27,2 a, d
13	nd	nd	nd
14	nd	nd	nd

a. les congénères de BPC analysés sont : a. 101, b. 118, c. 153, d. 105, e. 138, f. 183, g. 180, h. 170, i. 194, j. 128, k. 77, l. 126, m. 169.

b. les HAP analysés sont : a. phénanthrène, b. fluoranthrène, c. pyrène, d. naphthalène, e. 2-methylnaphtalène, f. acénaphthalène, g. fluorène, h. anthracène, i. benzo(a)anthracène, j. chrysène, k. benzo(b)fluoranthrène, l. benzo(k)fluoranthrène, m. benzo(a)pyrène, n. indénol(1,2,3,-cd)pyrène, o. benzo(ghi)pérylène, p. 1-methylnaphtalène, q. dibenzo(ah)anthracène, r. 1,2,3,4-tétrahydronaphtalène et s. 2-chloronaphtalène.

c. les OC analysés sont : a. p, p'-DDE, b. o,p'-DDT, c. o, p'-DDD, d. p,p'-DDD, e. p,p'-DDT, f. l'heptachlor, g. aldrin, h. Mirex, i. a-BHC, j. B-BHC, k. lindane, l. trans et cis chlordane, m. méthoxychlor, n. a-endosulfan, o. dieldrine, p. endrin, q. oxychlordane, r. orthochlorostyrène, s. photomirex et t. p,p'-DDT.

d. T : Somme des composés en ng ou µg / g de poids sec du sédiment.

e. les composés sont classés selon leurs concentrations décroissantes dans le sédiment ; les substances entre les parenthèses ont des concentrations identiques.

f. nd : non détecté.

tableau 5.6 Caractéristiques chimiques des extraits organiques de sédiments marins.

extraits 4, 7 et 9 (3200 UT). Les autres extraits étaient faiblement cytotoxiques (320 UT). Avec les échantillons 1 à 8, on obtient des corrélations significatives entre la diminution de la viabilité et la quantité totale de OC, (o, p)/ p'-DDE, p, p'-DDD, la quantité totale de BPC avec certains de leurs congénères et les Aroclor 1254 et 1260 (tableau 5-7). Malgré le petit nombre d'extraits de sédiments de référence (échantillons 9-12), certaines associations peuvent être dégagées : la diminution de la viabilité cellulaire et la quantité totale de Oc ($R = 0,998$; $p < 0,001$) et la quantité totale de BPC ($R = 0,942$; $p < 0,005$). Les effets sur la viabilité cellulaire semblent donc être associés à la présence de pesticides Oc et des BPC. Aucune association n'est cependant notée avec les HAPs totaux malgré leurs présences en plus grandes quantités. Il aurait été intéressant de reconstituer ce mélange de substances organiques pour en dégager des effets de synergie, d'antagonisme ou de potentialisation.

5.3.2 Génotoxicité des extraits de sédiments marins

A l'aide des tests « nick translation assay » et de la précipitation alcaline de l'ADN, la génotoxicité dans les extraits organiques de sédiments marins a été observée dans 50 % des cas avec l'essai NTA et dans 42 % des cas avec l'essai PA (tableau 5.5). Dans l'ensemble, 64 % des extraits étaient génotoxiques d'après l'un ou l'autre de ces deux tests. Un potentiel mutagénique avec le test d'Ames a été rapporté sur des extraits en phase organique de sédiments d'eaux douces qui contenaient des OC, HAP et BPC (METCALFE *et al.*, 1990; MACCUBIN *et*

Viabilité	Test PA ^b	Test NTA ^c
OC Totaux (R = 0,522)	o,p'-DDT (R = 0,529)	AC ^d
BPC Totaux (R = 0,593)	p,p'-DDT (R = 0,529)	
PCB cong 101 (R = 0,617)		
cong 118 (R = 0,460) ^e		
cong 153 (R = 0,593)		
cong 105 (R = 0,635)		
cong 138 (R = 0,631)		
cong 183 (R = 0,636)		
cong 128 (R = 0,637)		
cong 180 (R = 0,656)		
cong 194 (R = 0,646)		
p, p'-DDE (R = 0,628)		
o, p'-DDE (R = 0,673)		
p, p'-DDD (R = 0,650)		
Aroclor 1254 (R = 0,569)		
Aroclor 1260 (R = 0,638)		

a. Corrélation paramétrique de «Pearson product-moment». Une corrélation est considérée significative seulement si $p < 0,05$ et marginalement significative si $0,1 < p < 0,05$.

b. Test PA : test de la précipitation alcaline de l'ADN.

c. Test NTA : test de la translation de brèches.

d. AC : aucune corrélation n'est observée.

e. Marginalement significative.

tableau 5.7 Corrélations^a entre les données chimiques et toxicologiques.

ERSING, 1991; LANGEVIN *et al.*, 1992). Seule la génotoxicité mesurée avec le test PA étaient corrélée avec les teneurs en o, p'-DDT et le p, p'-DDT pour les extraits 1 à 8 (**tableau 5.7**), alors que celle observée avec le test NTA ne montrait aucune corrélation avec les substances analysées. Ces résultats suggèrent que les substances ou classes de substances qui sont responsables de la génotoxicité différaient selon le test employé bien que certains pesticides Oc, HAP et BPC soient reconnus génotoxiques ou cancérigènes (SHARMA et GAUTAM, 1991; WALTON *et al.*, 1988; HOUK et DEMARINI, 1987). La vérification de cette hypothèse est difficilement réalisable. Les HAP sont génotoxiques à l'exception du naphthalène, de l'acénaphthylène, et du benzo(g,h,i)pérylène (SODERMAN, 1987). Les pesticides Oc comme l'endosulfan sont reconnus génotoxiques. Les BPC sont connus tant pour leur génotoxicité que pour leur potentiel cancérigène (WILLIAMS et WEISBURGER, 1986). Avec les sédiments de référence (échantillons 9 à 12), aucune corrélation n'est obtenue avec les deux tests entre la génotoxicité et les données chimiques. Des études additionnelles s'avèreraient utiles afin de préciser les liens existant entre la génotoxicité et certaines substances chimiques de ces sédiments. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que la génotoxicité n'est pas expliquée par les teneurs en pesticides Oc (excepté o,p'-DDT et p,p'-DDT), en HAP et en BPC. Il faut reconnaître la limite des tests de corrélation dans le sens qu'une association, ou une absence d'association, n'indique pas obligatoirement un lien de cause à effet entre les deux variables dites indépendantes mais plutôt une association ou une coïncidence probable entre ces dernières. Les différents résultats générés avec les deux tests de génotoxicité utilisés pourraient aussi s'expliquer

par le fait que ces essais seraient autrement affectés par des interactions chimiques particulières (antagonisme, synergisme ou la potentialisation, selon l'essai).

Discussions et Conclusions

Paramètres	Valeur	Corrélation	Modèle prédictif
A) Modèle hépatocyte			
Sensibilité	100 %	R = 0,70	MH = -0,47 + 0,24T ^a
Spécificité	60 %	p = 0,002	
Valeur prédictive	60 %	n = 18	
Concordance	70 %	Puissance = 95 %	
Incidence	64 %		
B) Modèle Microtox[®]			
Sensibilité	100 %	R = 0,70	M _r = 0,99 + 0,77 T _r ^b
Spécificité	60 %	p = 0,01	
Valeur prédictive	58 %	n = 12	
Concordance	75 %	Puissance = 99,9 %	
Incidence	35 %		

a. Équation de régression sur la valeur en % v/v de l'effluent où T est la valeur CL₅₀ obtenue avec la truite et MH est la valeur des seuils toxiques (ST) avec le modèle hépatocyte.

b. Équation de régression sur la valeur en rang de la concentration (% v/v) de l'effluent où T: rang de CL₅₀ avec la truite, M la valeur ST transformée en rang avec le test Microtox[®].

tableau 6.1 Comparaison de deux modèles alternatifs (MH et Microtox) vis-à-vis du bioessai avec la Truite en fonction du critère de létalité.

6. Validation du modèle hépatocyte

Nous avons démontré que le MH est un bioessai sensible qui peut servir dans l'étude de rejets industriels, d'extraits de sédiments et d'eaux d'un site contaminé par un effluent municipal. En plus d'estimer la toxicité létale, il peut mesurer des effets cytotoxiques pertinents, qui sont à la base de la manifestation de la toxicité chronique. Dans nos travaux, nous avons évalué l'induction de la MT, du P4501A1 et la génotoxicité selon les tests NTA et PA. Cependant, pour que le modèle cellulaire puisse éventuellement se substituer au bioessai avec la truite, il faut connaître dans quelle mesure on peut l'utiliser comme alternative. Il doit donc être validé avec ce bioessai de référence.

6.1 Évaluation de la toxicité létale

Nous avons comparé les modèles hépatocyte et Microtox® dans l'optique d'alternatives au bioessai avec truite (**tableau 6.1**). La sensibilité du MH est excellente avec une valeur de 100 %. On entend par sensibilité la capacité du modèle à mesurer un effet positif indépendamment de l'intensité de sa réponse toxique par rapport au bioessai avec la truite. Cette grande sensibilité s'explique par le fait que le MH mesure des effets toxiques qui ne se traduisent pas encore par

une mortalité chez la truite (voir les effluents du secteur CO et M au **tableau 5.1**). Ainsi, lorsqu'on observe une cytotoxicité à des concentrations supérieures de 25 % v/v, les effets toxiques ne sont pas observés chez la truite. Cependant la spécificité du MH est un peu faible. Ce paramètre nous indique que le MH est moins apte à confirmer une présence de toxicité chez la truite lorsque la valeur du seuil de toxicité est élevée. La valeur prédictive du modèle est bonne dans la mesure où l'on peut délimiter un seuil de sensibilité adéquat (25 % v/v). En effet, une régression linéaire significative est mesurée pour les effluents dont les seuils d'effet sont inférieurs à 25 % v/v, la variable indépendante étant composée des résultats de toxicité létale chez la truite. Donc le MH peut prédire la concentration létale pour les truites avec une puissance statistique de 95 %. Notons que la puissance statistique d'un test de corrélation représente la capacité du test à ne pas faire une erreur (de type 1) sur l'hypothèse d'une absence de corrélation. Le calcul de la puissance d'un test de corrélation tient compte du nombre d'échantillons, du degré d'association des valeurs et de la probabilité de signification ($p = 0,01$ ou $0,05$). Ainsi, une puissance de 95 % nous informe que la corrélation est réelle dans la plupart des cas, mais que dans 5 % des cas une fausse corrélation pourrait survenir. Le concept de la puissance statistique d'un test nous fournit un indice de fiabilité de la corrélation calculée et nous permet de confirmer si le nombre d'échantillons est adéquat pour un coefficient de corrélation donné. Normalement, une puissance supérieure à 80 % est jugée satisfaisante pour la corrélation. Le MH possède une bonne capacité à concorder ses résultats positifs ou négatifs avec le test avec la truite (concordance). Enfin, l'incidence du MH nous informe que 64 % des rejets industriels présentent

une toxicité avec le MH. Bien que cette étude rapporte les premiers résultats relatifs à la validation d'un modèle cellulaire avec des mélanges complexes, les modèles cellulaires sont reconnus pour leurs corrélations positives avec des substances pures. Par exemple, la toxicité du phénol et du pentachlorophénol avec la lignée RTG-2 est significativement corrélée avec la toxicité de la truite (BOLS *et al.*, 1985). Des corrélations sur la toxicité des métaux sont aussi obtenues avec la lignée de cellules «bluegill» ou BF-2 (BABICH *et al.*, 1987; BABICH et BORENFREUND, 1991). La cytotoxicité d'une cinquantaine de produits appartenant à diverses classes chimiques incluant les pesticides, les métaux lourds et les phénols a démontré une corrélation positive entre les données de toxicité chez les alevins de Tête de boule et celles d'une lignée cellulaire de mené du même organisme (BRANDAO *et al.*, 1992). Toutes ces lignées cellulaires représentent de bons modèles pour la mesure de la toxicité générale des substances pures sans nécessairement l'être avec les effluents industriels. En plus, ces lignées cellulaires possèdent de faibles activités d'EROD (RTG-2). En revanche, les hépatocytes de truite conservent leurs caractéristiques *in vivo* et peuvent induire le cytochrome P4501A1 de sorte qu'ils maintiennent la capacité de bioactiver les xénobiotiques. Le MH est aussi pertinent pour mesurer la toxicité générale et spécifique au foie, organe cible vis-à-vis des agressions toxiques (BAKSI et FRAZIER, 1990).

Le bioessai bactérien Microtox® s'avère aussi un bon candidat comme technique alternative au test de létalité avec la truite arc-en-ciel. Il est corrélé avec le test truite et ses caractéristiques de

Paramètres	Valeur	Corrélation	Modèle prédictif
<i>Modèle hépatocyte</i>			
Sensibilité	88 %	R = 0,87	MH = 1,437 + 0,84 T*
Spécificité	83 %	p < 0,001	
Valeur prédictive	80 %	n=18	
Concordance	85 %	Puissance = 99 %	
Incidence	40 %		

* Équation de régression sur la valeur en % v/v de l'effluent qui est transformée en rang où T correspond à l'activité de l'EROD hépatique, exprimée en seuil toxique, chez la truite et MH est l'activité MCFOD chez l'hépatocyte.

tableau 6.2a Validation du modèle hépatocyte pour la mesure de l'induction du cytochrome P450 1A1.

Hépatocytes : Seuil d'induction	Rang	Truite : Seuil d'induction	Rang
0	5,5	0	5
0,002	11	0,002	10
0,003	12	0,05	11
0,01	13	0,3	12
0,03	14	0,32	13
0,32	15,5	2,2	15
3	17	3	16
		16	17

tableau 6.2 b Transformation en rang des seuils d'induction obtenus avec le MH.

sensibilité, de spécificité, de valeur prédictive, de concordance et d'incidence sont semblables à celles du MH (tableau 6.1). Par contre, la corrélation n'est valable que pour les valeurs transformées en rang. Nos résultats suggèrent donc que le Microtox® et le MH constituent des alternatives valables au bioessai avec la truite en ce qui a trait à la toxicité létale. Cependant, le MH devient plus utile et pertinent puisqu'il s'avère apte à évaluer des effets sublétaux.

6.2 Évaluation de l'inductibilité du cytochrome P4501A1

Le MH s'avère une bonne alternative pour mesurer le potentiel d'induction du cytochrome P4501A1 des rejets industriels. En effet, la sensibilité du modèle est de 88 % avec une valeur de 83 % en spécificité (tableau 6.2a). La valeur prédictive est bonne (80 %) de même que la concordance (85 %). L'incidence de ce critère d'effet est de 50 % avec ce modèle. Une relation semi-quantitative existe ($R = 0,87$) lorsque les données sont transformées en rang. L'analyse paramétrique des données transformées en rang a déjà été utilisée pour des tests employant des cellules cultivées *in vitro* (MITCHELL *et al.*, 1994). Cette relation nous permet alors de prédire un intervalle de concentration qui peut induire l'EROD dans le foie de truite plutôt qu'une concentration précise. Par exemple, une induction de l'activité MCFOD chez l'hépatocyte à une concentration de 0,32 % correspond à un rang de 15,5 et une induction de l'EROD chez la truite à un rang de 16,7 (i.e. rang 16 et 17), soit à un intervalle de concentration situé entre 3 à 17 % v/v (tableau 6.2b). Néanmoins, cet intervalle n'est pas conséquente parce qu'un effet positif avec le MH se traduit le plus souvent (83 % des cas) par un effet au niveau de la truite. Il est plus

Paramètres	Valeur	Corrélation	Modèle prédictif
<i>Modèle hépatocyte</i>			
Sensibilité	100 %	R = 0,985	MH = 0,28 + 0,308 T*
Spécificité	70 %	p < 0,0001	
Valeur prédictive	75 %	n = 12	
Concordance	83 %	Puissance = 100 %	
Incidence	50 %		

* Équation de régression sur la valeur des seuils toxiques (ST) de l'effluent en % v/v où T correspond à la valeur ST de la MT hépatique chez la Truite et MH est la valeur ST de la MT chez l'hépatocyte.

tableau 6.3 Validation du modèle hépatocyte pour la mesure de l'induction de la MT.

important de savoir qu'un effet se produira chez le poisson plutôt que de connaître la concentration exacte d'induction. Nous ne pouvons comparer ces résultats à ceux de la littérature puisque la corrélation d'effets sublétaux avec un modèle hépatocyte et un bioessai poisson pour des effluents industriels n'a pas encore été rapportée. Ces corrélations s'avèrent cependant essentielles pour valider des tests alternatifs aptes à l'étude de mélanges complexes.

6.3 Évaluation de l'inductibilité de la MT

Le MH s'avère aussi une alternative intéressante pour mesurer l'induction de la MT chez la truite arc-en-ciel (tableau 6.3). Ici, le nombre d'effluents ($n=12$) est plus restreint que celui exploité avec le P4501A1 ou la létalité et une validation additionnelle serait requise pour confirmer nos résultats actuels, quoique la puissance de la corrélation soit plus que satisfaisante (100 %). Ici, le MH présente une très bonne sensibilité et spécificité. La concordance est une fois de plus adéquate (83%), étant donné que le MH est plus sensible pour détecter ce type d'effet que le bioessai avec la truite. Un résultat positif avec le MH à une concentration supérieure à 25 % n'indique pas nécessairement une induction chez la truite. L'incidence d'induction de MT est de 50 %. Une corrélation significative est obtenue avec ce modèle où l'on observe une régression linéaire quantitative. L'induction de la MT semble provenir des fonctions fondamentales des cellules puisque l'exposition de fibroblastes de truite RTG-2, une lignée cellulaire qui ne supporte pas de fonction spécifique, peut induire la MT (ZARAFULLAH *et al.*, 1990; GEORGE

Paramètres	Valeur	Corrélation	Modèle prédictif
<i>Modèle hépatocyte</i>			
Sensibilité	100 %	R = 0,83	MH = 1 + 0,833 T [*]
Spécificité	100 %	p = 0,0016	
Valeur prédictive	100 %	n=11	
Concordance	100 %	Puissance = 92 %	
Incidence	54 %		

* Équation de régression sur la valeur des seuils toxiques (ST) de l'effluent en % v/v (transformée en rang) où T correspond à la valeur ST de la génotoxicité dans le foie de Truite et MH est la valeur ST de la génotoxicité chez l'hépatocyte.

tableau 6.4a Validation du modèle hépatocyte pour la mesure de la génotoxicité avec le test de la précipitation alcaline de l'ADN.

Hépatocyte	Rang	Truite	Rang
0	3	0	3
0,003	6	0,032	6
0,03	7	0,32	7,5
0,32	8,5	3,2	9
3,2	10	16	10,5
16	11		

tableau 6.4b Transformation des données en rang.

et al., 1992). Les hépatocytes de truite en culture primaire conservent aussi leur capacité d'induire la MT *in vitro* (GAGNÉ *et al.*, 1990). Celle-ci a d'ailleurs été créditée d'un rôle important dans la régulation de l'homéostasie du Cu et du Zn qui est une fonction fondamentale chez les cellules (KAGI, 1991; GAGNÉ *et al.*, 1990).

Le MH semble donc s'avérer une alternative valable pour la mesure de la MT hépatique chez la truite arc-en-ciel exposée à des effluents industriels. Ici, une corrélation paramétrique existe et elle nous permet de proposer un modèle prédictif simple basé sur la régression linéaire.

6.4 Mesure de la génotoxicité

La génotoxicité obtenue avec le MH se compare bien avec le test de génotoxicité effectué sur le foie de truite exposé à des effluents industriels (**tableau 6.4**). La sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive et la concordance sont excellentes (100%). Ces résultats indiquent que le MH prédit correctement autant un résultat négatif que positif chez la truite. Malgré le faible nombre d'effluents étudiés (n=11), une corrélation significative est obtenue sur les données transformées en rang et la puissance statistique de la corrélation est plus que satisfaisante (92 %). Un modèle de régression basé sur les données transformées en rangs nous permet d'établir une relation semi-quantitative entre la génotoxicité du MH et celle du bioessai avec la truite. L'incidence de la génotoxicité est d'environ 50 %. Nos travaux offrent une première tentative d'utiliser une

alternative pour évaluer le potentiel génotoxique des effluents industriels chez la truite. Cependant, le potentiel génotoxique d'effluents industriels a déjà été rapporté par d'autres groupes (HOUK, 1992; RAABE *et al.*, 1993) qui l'ont évalué avec des essais bactériens tels que le test SOS Chromotest et le test d'Ames. La génotoxicité a aussi été observée *in vivo* avec le test micronoyau dans les hématies d'amphibien ainsi que dans la moelle osseuse de souris (GAUTHIER *et al.*, 1993; NYLUND *et al.*, 1994). Nos résultats indiquent que le MH peut prédire un intervalle de concentrations entraînant un dommage génétique significatif dans le foie de la truite exposée à des rejets industriels. Par exemple, un effet génotoxique à 0,32 % (rang 8,5 environ) avec le MH correspond à un dommage génétique pour la truite dans un intervalle de 0,32 à 3,2 % (rang 7,5 à 9) selon les données du **tableau 6.4b**. Les résultats suggèrent donc que le MH pourrait devenir une bonne alternative pour prédire des effets génotoxiques sur le foie de truite.

7. Intégration et conclusions

7.1 Potentiel du modèle hépatocyte comme alternative au test avec truite

Selon les résultats présentés dans ces travaux, le MH aurait le potentiel de servir d'alternative pour la mesure de la toxicité létale, de la génotoxicité avec le test PA et des inductions de la MT et du CYP1A1. Le MH présente plusieurs avantages par rapport au bioessai avec truite. Sur le

plan de l'éthique, son emploi réduit considérablement le nombre de poissons (à 3 truites par échantillon à analyser au lieu de 120 truites). On pourrait aisément ramener ce nombre à une truite par expérience, si ce n'était des variabilités inhérentes à chaque individu. Néanmoins, cette variabilité pourrait être réduite sans toutefois être entièrement éliminée en utilisant des truites d'une population homogène et d'une même pisciculture. Le coût du bioessai alternatif est aussi avantageux. Alors que la réalisation d'un bioessai avec la truite coûte environ 400 \$ par échantillon, il n'en coûte qu'environ 75 \$ pour un test de viabilité cellulaire. Le temps d'exposition est aussi réduit (48 h avec le MH comparativement à 96 h pour le bioessai avec truite). Dans la même optique, le bioessai Microtox® serait aussi pertinent pour estimer la mortalité chez la truite, grâce à son temps d'exposition très court (15 min). Son coût, cependant, reste élevé (200 \$ par échantillon). Le MH renseigne également sur les dommages causés aux fonctions fondamentales aussi bien que spécifiques de l'hépatocyte. En principe, le MH devrait être un modèle pertinent pour évaluer l'hépatotoxicité, car le foie est souvent un organe cible dans l'agression des xénobiotiques chez les poissons et les mammifères (BAKSI et FRAZIER, 1990), tout comme les branchies et les reins. L'agression sur les fonctions spécifiques du foie peut ainsi se traduire par un effet de létalité chez les poissons. La corrélation entre la mesure de la viabilité cellulaire et la toxicité des truites (CL_{50}) est positive ($R=0,7$) et suggère que la cytotoxicité affecte autant les fonctions fondamentales que spécifiques. Par ailleurs, le MH peut prédire le potentiel toxique des rejets industriels chez la truite. Par contre, il est difficile de connaître les fonctions spécifiques ou basales qui sont à l'origine de la mortalité de la truite, ou

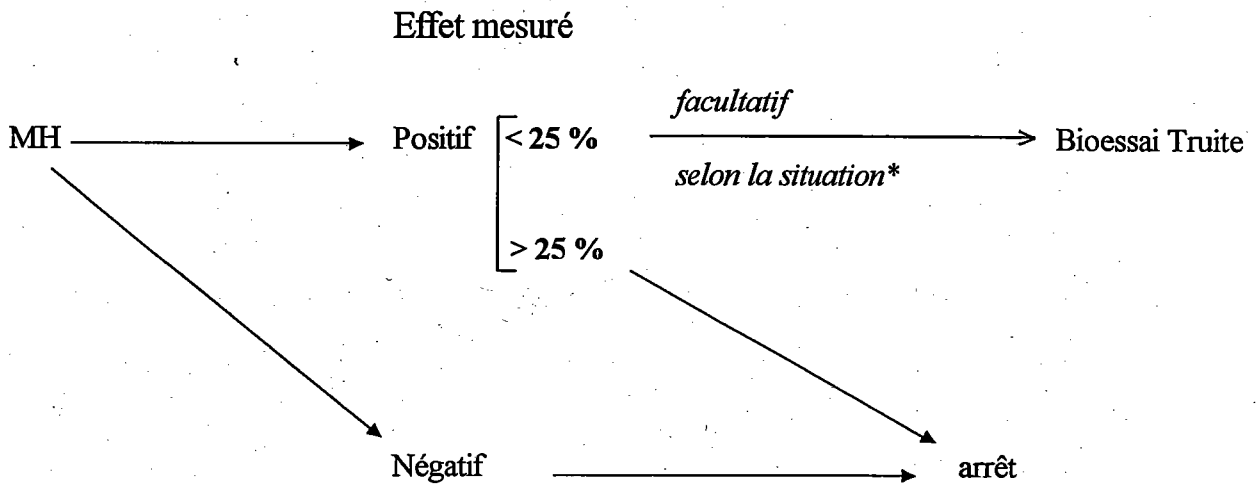


figure 7.1 Utilité du modèle hépatocyte dans une approche étagée.

* La poursuite du test *in vivo* peut être désirable pour les tests qui se sont avérés toxiques seulement. Dans les autres cas, la confirmation avec le BT n'est pas nécessaire, par exemple dans le cas d'une évaluation du danger potentiel.

l'ensemble de ces fonctions. Le MH s'avère un outil de prédiction intéressant pour mesurer la génotoxicité, l'induction de la MT et l'induction du cytochrome P450 hépatique. Le modèle de prédiction doit parfois employer une analyse paramétrique sur des données transformées en rang. Dans ce cas, le modèle prédit alors un intervalle de concentrations susceptibles de produire un effet chez la truite. Nos résultats représentent une première tentative à valider un modèle *in vitro* sur des rejets industriels complexes.

Nous pensons que le MH pourrait s'insérer dans une approche étagée selon des paramètres à valider (**figure 7.1**). Puisque que la spécificité du MH est adéquate, sauf pour la toxicité létale avec une spécificité de 60 %. Néanmoins, une réponse négative avec le MH traduit essentiellement une réponse négative chez la truite. Selon le critère d'effet à mesurer, un résultat positif entraînera généralement un effet positif chez la truite, tel que l'ont confirmé les paramètres de sensibilité, de valeur prédictive et de concordance. La spécificité s'est avérée le paramètre le plus faible en général, quoiqu'acceptable, et s'explique du fait que la limite de détection du MH est plus basse que celle du bioessai truite. Ce constat exige donc la définition d'une zone de sensibilité à l'intérieur de laquelle un effet avec le MH ne traduira pas un effet chez la truite à cause de leur sensibilité différente. Ce seuil s'établirait autour d'une concentration de 25 % v/v d'un effluent industriel. Un effet enregistré par le MH à des concentrations supérieures de 25 % pourrait donc ne pas signifier un effet similaire chez la truite. A l'inverse, un seuil d'effet positif inférieur à 25 % v/v avec le MH se traduit le plus souvent par un effet

similaire chez la truite. Ce seuil est aussi valable pour le microbioessai Microtox®. On pourrait d'ailleurs combiner les résultats du bioessai Microtox® à ceux du MH pour confirmer un effet similaire chez la truite, toujours à un seuil limite de 25 %, mais uniquement basé sur le critère d'effet de la létalité. Ainsi, en comparant la toxicité des effluents pour la truite avec le MH et le bioessai Microtox la spécificité des deux tests alternatifs serait augmentée à 80 % au lieu de 60 % pour le MH et le bioessai Microtox® respectivement.

7.2 Conclusions : sa valeur comme outil préventif

La prévention des effets toxiques doit tenir compte du type d'effet mesuré et de son implication dans le mécanisme d'action de la toxicité. Par exemple, l'initiation de dommages génétiques constitue la toute première étape de la transformation néoplasique ou de mutations néfastes et une exposition répétée et continue favorise ces altérations. Dans ce contexte, diminuer le potentiel génotoxique d'un effluent par différents traitements biologiques, chimiques ou technologiques aura pour effet de prévenir une partie des facteurs qui favorisent la formation de cancer ou la formation de mutations néfastes chez les organismes (KURELEC, 1993). L'élévation du cytochrome P450 est aussi un paramètre de prédiction de cancer (KITCHIN *et al.*, 1994) et témoigne de la présence et de la biodisponibilité de substances organiques aromatiques polycycliques. Une induction de la MT traduit une agression aux métaux lourds de sorte que

l'élimination du potentiel inducteur de la MT d'une source de pollution quelconque préviendra des problèmes écotoxiques plus sérieux liés, par exemple, à la susceptibilité aux infections, au succès reproducteur et à la survie de l'organisme. Ainsi, une toxicologie préventive est assurée en passant par des étapes qui identifient et contrôlent les mécanismes d'action des agressions toxiques. Ces effets débutent à l'échelle biochimique et cellulaire pour ensuite s'exprimer au niveau de l'organisme. En ce sens, l'exploitation d'indicateurs moléculaires par l'entremise de bioessais alternatifs constituent des outils précieux pour la prévention de la pollution aquatique.

8. Références

- ADAMS, S.M. (1990).** Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. *Amer. Fish. Soc. Sympos.* 8, 1-8.
- ADAMS, S.M., SHEPARD, K.L., GREELEY, M.S., JIMENEZ, B.D., RYON, M.G., SHUGART, L.R., MC CARTHY, J.F. (1989).** The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Mar. envir. Res.* 28, 459-464.
- ADDISON, R.F., ZINCK, M.E., WILLIS, D.E. (1981).** Time and dose-dependence of hepatic mixed function oxidase activity in brook trout *Salvenius fontinalis* on polychlorinated biphenyl residues : implications for " biological effects monitoring ". *Envir. Pollut. Ser. A* 25, 211-218.
- AHOKAS, J.T., KARKI, N.T., OIKARI, A., SOVIO, A. (1976).** Mixed function monooxygenase of fish as an indicator of pollution of aquatic environment by industrial effluent. *Bull. Envir. Contam. Toxicol.* 16, 270-274.
- ALDENBERG, T., SLOB, W. (1993).** Confidence limits for hazardous concentrations based on logistically distributed NOEC toxicity data. *Ecotox. Envir. Saf.* 25, 48-63.

AL-SABTI, K., HARDIG, J. (1990). Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects from industrial waste products in the Baltic sea, Sweden. *Comp. Biochem. Physiol.* 97C, 179-182.

ANDERSSON, T., BENGTTSSON, B.E., FORLIN, L., HARDIG, J., LARSSON, A. (1987). Long-term effects of bleached kraft mill effluents on carbohydrate metabolism and hepatic xenobiotic biotransformation enzymes in fish. *Ecotoxic. Envir. Saf.* 13, 53-60.

APHA, AWWA, WPCF (1989). Standard methods for the examination of water and wastewater, 17^e édition, American Public Health Association, Washington D.C.

ARCHAKOV, A.I., DEGTYARENKO, K.N. (1993). Structural classification of the P450 superfamily based on consensus sequence comparison. *Biochem. Molec.Biol. Int.* 31, 1071-1080.

BABICH, H., BORENFREUND, E. (1991). Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells : a review. *Toxic. In vitro* 5 : 91-100.

BABICH, H., BORENFREUND, E. (1987). Cultured fish cells for the ecotoxicity testing of aquatic pollutants. *Toxic. Assess.* 2, 119-133.

BABICH, H., PUERNER, J.A., BORENFREUND, E. (1987). *In vitro* cytotoxicity of metals to Bluegill (BF-2) cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 15, 31-37.

BAKSI, S.M., FRAZIER, J.M. (1990). Isolated fish hepatocyte - model systems for toxicology research. *Aquat. Toxic.* 16, 229-256.

BERGMAN, H.L., KIMERLE, R.A., MAKI, A.W. (1986). Environmental Hazard Assessment of Effluents. Pergamon Press, New York.

BLAIR, J.B., MILLER, M.R., PACK, D., BARNES, R., TEH, S.J., HINTON, D.E. (1990). Isolated trout liver cells: establishing short term primary cultures exhibiting cell to cell interactions. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26, 237-249.

BLAISE, C., van COILLIE, R., BERMINGHAM, M., COULOMBE, G. (1987). Comparaison des réponses toxiques de trois indicateurs biologiques (bactéries, algues, poissons) exposés à des effluents industriels de fabriques de pâtes et papiers. *Rev. Int. Sci. Eau* 3, 9-17.

BLAISE, C., COSTAN, G. (1987). La toxicité létale aiguë des effluents vis-à-vis de la truite arc-en-ciel. *Wat. Pollut. Res. J. Can.* 22, 385-402.

BLAISE, C., SERGY, G., WELLS, P., BERMINGHAM, N., van COILLIE, R. (1988). Biological testing-development, application and trends in canadian environmental protection laboratories. *Toxic. Assess.* 3, 385-406.

BLAISE, C., TROTTIER, B., van COILLIE, R., COUTURE, P. (1986). Évaluation de la toxicité sublétales des effluents industriels vis-à-vis du poisson en mesurant l'ATP du muscle squelettique. *Wat. Pollut. Res. J. Can.* 21, 71-90.

BOLS, N.C., BOLISKA, S.A., DIXON, D.G., HODSON, P.V., KAISER, K.L.E. (1985). The use of fish cell cultures as an indication of contaminant toxicity to fish. *Aquatic Toxic.* 6, 147-155.

BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 249-251.

BRANDAO, J.C., BOHETS, H.H.L., VAN DE VYVER, I.E., DIERICHX, P.J. (1992). Correlation between the *in vitro* cytotoxicity to cultured fathead minnow fish cells and fish lethality data for 50 chemicals. *Chemosphere* 25, 553-562.

BROUWER, M., WINGE, D.R., GRAY, W.R. (1989). Structural and functional diversity of copper-metallothionein from the american lobster, *Homarus americanus*. *J. Inorg. Biochem.* 35, 289-303.

BRUSICK, D. (1994). Dans « Principles and methods of toxicology », 3e édition, édité par Wallace Hayes, Raven Press, New York.

BUHLER, D.R., WILLIAMS, D.E. (1988). The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. *Aquat. Toxic.* 11, 19-28.

CHEVION, M., STEGEMAN, J.J., PLISACH, J., BLUMBERGI, W.E. (1977). Electron paramagnetic resonance studies on hepatic microsomal cytochrome P450 from a marine teleost fish. *Life Sci.* 20, 895-900.

COOPER, G.M. (1992). Oncogenes as markers for early detection of cancer. *J. Cell Biochem.* 16G, 131-136.

COSTAN, G., BERMINGHAM, N., BLAISE, C., FERARD, J.-F. (1993). Potential ecotoxic effects probe (PEEP) : a novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents. *Envir. Toxic. Wat. Qual.* 8, 115-140.

COUILLARD, D. (1980). Évaluation de la pollution et des répercussions des rejets des industries des pâtes et papiers sur la vie aquatique. *Sci. Total Envir.* 14, 167-184.

- COYLE, P., ZALEWSKI, P.D., PHILCOX, J.C., FORBES, I.J., WARD, A.D., LINCOLN, S.F., MAHADEVAN, I., and ROFE, A.M. (1994). Measurement of zinc in hepatocytes by using a fluorescent probe, Zinquin: relationship to metallothionein and intracellular zinc. *Biochem.J.* 303,781-786.
- CURREN, R.D, SOUTHEE, J.A., SPIELMANN, H., LIEBSCH, M., FENTEM, J.H., BALLS, M. (1995). The role of prevalidation in the development, validation and acceptance of alternative methods. *ATLA* 23, 211-217.
- DARZYNCHEVICZ, Z., BRUNO, S., DEL BINO, G., GORCZYCA, W., HOTZ, M.A., LASSOTA, P., TROGANOS, F. (1992). Features of apoptotic cells as measured by flow cytometry. *Cytometry* 13, 795-808.
- DUNNS, M.A., BLALOCK, T.L., COUSINS, R.J. (1987). Metallothionein. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 185, 107-109.
- ENVIRONNEMENT CANADA (1987). Aquatic toxicity of pulp and paper mill effluent : a review. Conservation and Protection, Environnement Canada, Ottawa Report No. EPS4/PF1.
- ENVIRONNEMENT CANADA (1990a). Biological test method, acute lethality test method using rainbow trout. Conservation and Protection, Environnement Canada, Ottawa, Report No. EPS I/RM/9.
- ENVIRONNEMENT CANADA (1992). Biological test method : Toxicity test using luminescent bacteria (*Photobacterium phosphoreum*). Conservation and Protection, Environnement Canada, Ottawa, Report No. EPS I/RM/24.
- ENVIRONNEMENT CANADA (1992). Biological test method : growth inhibition test using the freshwater alga *Selenastrum capricornutum*. Conservation and Protection, Environnement Canada, Ottawa, Report No. EPS I/RM/25.
- EATON, D.L., STACEY, N.L., WONG, K.L., KLAASSEN, C.D. (1980). Dose-response effects of various metals ions on rat liver metallothionein, glutathione, heme oxygenase, and cytochrome P450. *Toxic. appl. Pharmacol.* 55, 393-402.
- ELCOMBE, C.R., LECH, J.J. (1987). Induction of monooxygenation in rainbow trout by polychlorinated biphenyls : a comparative study. *Envir. Health Persp.* 23, 309-314.
- ELCOMBE, C.R., LECH, J.J. (1979). Induction and characterization of hemoproteins P-450 and monooxygenation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxic. appl. Pharmacol.* 49, 437-450.

- EMA, M., SOGAWA, K., WATANABE, M., CHOJOH, Y., MATSUSHITA, N., GOTOH, O., FUNAE, Y., and FUJII-KURIYAMA, Y. (1992). cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 184(1):246-253.
- EVAN, G., HARRINGTON, E., FANIDI, A.L., LAND, H., AMATI, B., BENNETT, M. (1994). Integrated control of cell proliferation and cell death by the c-myc oncogene. *Phil. Trans. R. Soc. London* 345, 269-275.
- FENECH, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique : a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Res.* 285, 35-44.
- FABACHER, D.L. (1982). Hepatic microsomes from freshwater fish II. Reduction of benzo[a]pyrene metabolism by the fish anesthetics quinaldine sulfate and tricaine. *Comp. Biochem. Physiol.* 73C, 285-288.
- FINGERMAN, S.W., BROWN, L.A., LYNN, M., SHORT, C.S. (1983). Responses of channel catfish to xenobiotics : induction and partial characterization of a mixed function oxygenase. *Arch. envir. Contam. Toxicol.* 12, 195-201.
- FORLIN, L., ANDERSSON, T., BENGTSON, B., HARDING, J., LARSSON, A. (1985). Effects of pulp bleached plant effluents on hepatic xenobiotic biotransformation enzymes : laboratory and field studies. *Mar. envir. Res.* 17, 109-112.
- FORNI, A. (1994). Comparison of chromosome aberrations and micronuclei in testing genotoxicity in humans. *Toxicol. Lett.* 72, 185-190.
- FOWLER, B.A., HILDEBRAND, C.E., KOJIMA, Y., WEBB, M. (1987). Nomenclature of metallothionein. *Experientia suppl.* 52, 19-22.
- GAGNÉ, F., MARION, M., DENIZEAU, F. (1990). Metal homeostasis and metallothionein induction in rainbow trout hepatocytes exposed to cadmium. *Fund. appl. Toxic.* 14, 429-437.
- GAGNÉ, F., BLAISE, C. (1993). Hepatic metallothionein level and mixed function oxydase activity in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after acute exposure to pulp and paper mill effluents. *Wat Res.* 27, 1669-1682.
- GAGNÉ, F., BLAISE, C. (1996). Available intracellular zinc as an indicator of heavy metal exposure to rainbow trout hepatocytes. *Environ. Toxicol. Wat. Qual.* Sous presse.

- GALLAGER, E.P., DIGIULIO, R.T. (1989).** Effects of complex waste mixtures on hepatic monooxygenase activities in brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*). *Envir. Pollut.* 62, 113-128.
- GAUTHIER, L., VAN DER GAAG, M., L'HARIDON, J., FERRIER, V., FERNANDEZ, M. (1993).** In vivo detection of waste water and industrial effluent genotoxicity : use of the Newt micronucleus test (Jaylet test). *Sci. Total Environ.* 138, 249-260.
- GEORGE, S., BURGESS, D., LEAVER, M., FRERICH, N. (1992).** Metallothionein induction in cultured fibroblasts and liver of a marine flatfish, the turbot, *Scophthalmus maximus*. *Fish Physiol. Biochem.* 10, 43-54.
- GEORGE, S.G., YOUNG, P. (1986).** The time course of effects of cadmium and 3-methylcholanthrene on activities of enzymes of xenobiotic metabolism and metallothionein levels in the plaice, *Pleuronectes platessa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 83C, 37-44.
- GODET, F., VASSEUR, P., BABUT, M. (1993).** Essais de génotoxicité in vitro et in vivo applicables à l'environnement hydrique. *Rev. Sci. de L'eau* 6, 285-314.
- GOLD, R., SCHMIED, M., ROTHE, G., ZISCHLER, H., BREITSCHOPF, H., WEKERLE, H., LASSMAN, H. (1993).** Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of *In situ* nick translation to cell culture systems and tissue sections. *The J. Histochem. and Cytochem.* 41, 1023-1030.
- GOKSOYR, A., LARSEN, H.E., HUSOY, A.-M. (1991).** Application of a cytochrome P4501A1-Elisa in environmental monitoring and toxicological testing of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 157-160.
- GOODWIN, A.E., GRIZZLE, J.M. (1994).** Oncogene expression in hepatocytes of the fish *Rivulus ocellatus marmoratus* during the necrotic and regenerative phases of diethylnitrosamine toxicity. *Carcinogenesis* 15, 1985-1992.
- GRILL, E., WINNACJER, E.L., ZENK, M.H. (1985).** Phytochelatins : The principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230, 674-676.
- HAMER, D.H. (1986).** Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 913-951.
- HAMILTON, S.J., MEHRLE, P.M. (1986).** Metallothionein in fish: review of its importance in assessing stress from metal contaminants. *Trans. Amer. Fish Soc.* 115, 596-609.
- HAMILTON, S. J., MEHRLE, P.M., JONES, J. R. (1987).** Cadmium-saturation technique for measuring metallothionein in brook trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 116, 541-550.

- HANSEN, P.D., ADDISON, R.F. (1990). The use of mixed function oxidase (MFO) to support biological effects monitoring in the sea. *Marine Environmental Quality Committee. Int. Counc. Explor. Sea E* : 33.
- HODSON, P.V., MCWHIRTER, M., RALPH, K., GRAY, B., THIVIERGE, D., CAREY, J.H., VAN DER KRAAK, G., WHITTLE, D.M., LÉVESQUE, M.C. (1992). Effects of bleached kraft mill effluent on fish in the St. Maurice River, Québec. *Envir. Toxic. Chem.* 11, 1635-1651.
- HOLMBOM, B., LEHTINEN, K.J. (1980). Acute toxicity to fish of kraft pulp mill wastewaters. *Paperi ja puu-Papper och tra* 11, 725-732.
- HOUK, V.S. (1992). The genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat. Res.* 277, 91-138.
- HOUK, V.S., DEMARINI, D.M. (1987). Induction of prophage lambda by chlorinated pesticides. *Mutat. Res.* 182, 193-201.
- JOHANNESSEN, K.A., DE PIERRE, J.W. (1978). Measurement of cytochrome P450 in the presence of large amounts of contaminating hemoglobin and methemoglobin. *Anal. Biochem.* 86, 725-732.
- KAGI, J.H.R. (1991). Overview of metallothionein. *Methods. in Enzymol.* 205, 613-630.
- KAGI, J.H.R., VASAK, M., LERCH, K., GILG, D.E.O., HUNYIKER, P., BERNHARD, W.R., GOOD, M. (1984). Structure of mammalian metallothionein. *Environ. health Perspect.* 54, 93-103.
- KAGI, J.H.R., VALLE, B.L. (1960). Metallothionein: a cadmium and zinc containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.* 235, 3460-3465.
- KARIN, M. (1985). Metallothionein : protein in search of function. *Cell* 41, 9-10.
- KINSELLA, A.R., RADMAN, M. (1978). Tumor promoter induces sister chromatid exchanges : relevance to mechanisms of carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 6149-6153.
- KITCHIN, K.T., BROWN, J.L., KULKARNI, A.P. (1992). Predictive assay for rodent carcinogenicity using *in vivo* biochemical parameters : operational characteristics and complimentary. *Mutation Res.* 266, 253-272.

KITCHIN, K.T., BROWN, J.L., KULKARNI, A.P. (1993). Predicting rodent carcinogenicity of AMES test false positives by *in vivo* biochemical parameters. *Mutation Res.* 290, 155-164.

KITCHIN, K.T., BROWN, J.L., KULKARNI, A.P. (1994). Complementarity of genotoxic and non-genotoxic predictors of rodent carcinogenicity. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 13, 83-100.

KLAASSEN, C.D. (1986). Principles of toxicology. Dans : Casarett and Doull's Toxicology - The basic science of poisons. Klaassen, C.D., Amdur, M.O. et Doull, J. éditeurs. McMillan publishing company, New York, USA, p. 11-32.

KLAUNING, J.E., RUCH, R.J., GOLDBLATT, P.J. (1985). Trout hepatocyte culture : isolation and primary culture. *In vitro Cel. Dev.*, 21, 221-228.

KOVACS, T. (1986). Effects of bleached kraft mill effluent on freshwater fish : a canadian perspective. *Wat. Pollut. Res. J. Can.* 21, 91-118.

KOZA, R.A., MOORE, M.J., STEGEMAN, J.J. (1993). Elevated ornithine decarboxylase activity, polyamines and cell proliferation in neoplastic and vacuolated liver cells of winter flounder (*Pleuronectes americanus*). *Carcinogenesis* 14, 399-405.

KRINGSTAD, K., LINDSTROM, K. (1984). Soebt liquors from pulp bleaching. *Envir. Sci. Technol.* 18, 236A-248A.

KURELEC, B. (1993). The genotoxic disease syndrome. *Mar. Environ. Res.* 35, 341-348.

LADUCA, J.R., SINHA, D. K. (1994). *In vitro* carcinogenesis of mammary epithelial cells by N-Nitroso-N-Methylurea using a collagen gel matrix culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29, 789-794.

LANGEVIN, R., RASMUSSEN, J.B., BLAISE, C. (1992). Genotoxicity in water and sediments extracts from the Saint-Lawrence river systems, using the SOS chromotest. *Water Res.* 26, 419-429.

LEE, J.-S., CHOE, J., PARK, E.-H. (1995). Genomic structure of c-ki-ras proto-oncogene of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *Biochem. Molec. Biol. Int.* 35, 57-63.

LEGAULT, R., BLAISE, C., TROTTIER, S., WHITE, P. (1996). Detecting the genotoxic activity of industrial effluents with the SOS chromotest microtitration procedure. *Envir. Toxic. Water Qual.* 11, sous presse.

- LEHTINEN, K.J., KIERKEGGAARD, A., JAKOBSSON, E., WANDELL, A. (1990). Physiological effects in fish exposed to effluents from mills with 6 different bleaching processes. *Ecotoxic. Envir. Saf.* 19, 33-46.
- LERCH, K., AMMER, D., OLAFSON, R.W. (1982). Crab metallothionein : primary structures of metallothioneins 1 and 2. *J. Biol. Chem.* 257, 2420-2426.
- LIDMAN, U., FORLIN, L., MOLANDER, O., AXELSON, G. (1976). Induction of the drug metabolizing system in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) liver by polychlorinated biphenyls (PCBs). *Acta Pharmacol. Toxic.* 39, 262-272.
- LINDSTROM-SEPPA, P., OIKARI, A. (1989). Biotransformation and other physiological responses in whitefish caged in a lake receiving pulp and paper mill effluents. *Ecotoxic. Envir.Saf.* 18, 191-203.
- LINDSTROM-SEPPA, P., OIKARI, A. (1990). Biotransformation activities of feral fish in waters in receiving bleached pulp mill effluents. *Envir. Toxic. Chem.* 9, 1415-1424.
- LITCHFIELD, J. T., WILCOXON, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effects experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96, 99-103.
- LOBILLO, J., DELGADO, J.V., RODERO, A. (1991). Sister chromatid exchange test detection of toxin-induced damage in cultured fish. *Gen. Sel. Evol.* 23, 160S-162S.
- LORENZEN, A., OKEY, A.B. (1990). Detection and characterization of [³H]2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin binding to Ah receptor in a rainbow trout hepatoma cell line. *Toxic. appl. Pharmac.* 106, 53-62.
- MACCUBIN, A.E., ERSING, N. (1991). Mutagenic potential of sediments from the grand Calumet river. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 47, 308-315.
- MARON, D.M., AMES, B.N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation. Res.* 113, 173-215.
- MAINES, M.D., KAPPAS, A. (1976). Studies on the mechanism of induction of haem oxygenase by cobalt and metal ions. *Biochem. J.* 154, 125-131.
- MASFARAUD, J.-Z.F., PFOHL-LESZKOWIC, A., MALAVEILLE, C., KEITH, G., MONOD, G. (1992). 7-Ethylresorufin O-deethylase activity and levels of DNA adducts in trout treated with benzo(a)pyrene. *Mar. Envir. Res.* 34, 352-354.

- MAYER, R.T., JERMYN, J.W., BURKE, M.D., PROUGH, R.A. (1977). Methoxyresorufin as a substrate for the fluorometric assay of insect microsomal O-dealkylases. *Pest. Biochem. Physiol.* 7, 349-354.
- MC KILLOPP, D., CASE, D.E. (1991). Commentary - Mutagenicity, carcinogenicity and toxicity of β -naphthoflavone, a potent inducer of P448. *Biochem. Pharmacol.* 41, 1-7.
- MATHER-MIHAICH, E., DIGIULIO, R.T. (1991). Oxidant, mixed function oxidase and peroxisomal responses in channel catfish exposed to a bleached kraft mill effluent. *Arch. Envir. Contam. Toxicol.* 20, 391-397.
- MEANS, J.C., DANIELS, C.B., BAKSI, S.M., STEGEMAN, J.J., MOORE, M.N. (1988). Development of *in vivo* genotoxicity tests in estuarine fish and their application to aquatic toxicology. *Mar. Environ. Res.* 24, 327-331.
- MELANÇON, M.J., TURNQUIST, K.A., LECH, J.J. (1989). Relation of hepatic microsomal monooxygenase activity to tissue PCB's in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) injected with [14 C] PCB's. *Envir. Toxic. Chem.* 8, 77-82.
- METCALFE, C.D., BALCH, G.C., CAIRNS, V.W., FITZSIMONS, J.D., DUNNS, B.P. (1990). Carcinogenic and genotoxic activity of extracts from contaminated sediments in western lake Ontario. *Sci. Total Envir.* 94, 125-141.
- MILLER, A.G. (1983). Ethylated fluoresceins: assay of cytochrome P450 activity and application to measurements in single cells by flow cytometry. *Analyt. Biochem.* 133, 46-57.
- MIRANDA, C.L., WANG, J.L., HENDERSON, M.C., BUHLER, D.R. (1990). Immunological characterization of constitutive isozymes of cytochrome P-450 from rainbow trout. Evidence for homology with phenobarbital-induced rat P-450s. *Biochem. Biophys. Acta* 1037, 155-160.
- MITCHELL, I.D., AMPHLETT, N.W., REES, R.W. (1994). Parametric analysis of rank transformed data for statistical assessment of genotoxicity data with examples from cultured mammalian cells. *Mutagenesis* 9, 125-132.
- MORRIS, S.M., DOMON, O.E., MC GARRITY, L.J., CHEN, J.J., CASCIANO, D.A. (1995). Programmed cell death and mutation induction in AHH-1 human lymphoblastoid cells exposed to m-Ansa. *Mutation Res.* 329, 79-96.

MORKVE, O., HALVORSEN, O.J., STANGELAND, L., GULSVIK, A., LAERUM, O.D. (1992). Quantitation of biological tumor markers (p53, c-myc, Ki-67 and DNA ploidy) by multiparameter flow cytometry in non-small-cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 52, 851-855.

MUNKITTRICK, K.R., PORTT, C.B., VAN DER KRAAK, G.J., SMITH, I.R., ROKOSH, D.A. (1991). Impact of bleached kraft mill effluent on population characteristics, liver MFO, activity, and serum steroid levels of a Lake Superior white sucker (*Catostomus commersoni*) population. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 1371-1380.

NÉBERT, D.W., NELSON, D.R., COON, M.J., ESTABROOK, R.W., FEYERREISEN, R., FUJII-KURIYAMA, Y., GONZALES, F.J., GUENGERICH, F.P., GUNSALUS, I.C., JOHNSON, E.F., LOPER, J.C., SATO, R., WATERMAN, M.R., WAXMAN, D.J. (1991). The P450 superfamily : an update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* 10, 1-14.

NEFF, J.M. (1985). Use of biochemical measurements to detect pollutant-mediated damage to fish. Dans : *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment : Seventh Symposium ASTM STP 854* (édité par Cardwell, R.D., Purdy, R. et Bahner, R.C.), pp 155-183. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, USA.

NEMER, M., WILKINSON, D.G., TRAVAGLINI, E.C., STERNBERG, E.J. (1985). Sea urchin metallothionein sequence : key to an evolutionary diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4992-4994.

NIMS, R.W., PROUGH, R.A., LUBET, R.A. (1984). Cytosol-mediated reduction of resorufin : a method for measuring quinone oxidoreductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 229, 459-465.

NYLUND, L., ROSENBERG, C., JAPPINEN, P., VAINIO, H. (1994). Genotoxicity of kraft pulp spent liquors from different types of chlorination procedures. *Mutation Res.* 320, 165-174.

OECD, Organisation for Economic Cooperation and Development (1987). The use of biological tests for water pollution assessment and control. Environmental Monographs No. 11.

OIKARI, A., LINDSTROM-SEPPA, P., KUKKONEN, J. (1988). Subchronic metabolic effects and toxicity of a simulated pulp mill effluent on juvenile lake trout, *Salmo trutta m. lacustris*. *Ecotoxic. Envir. Saf.* 16, 202-218.

OLIVE, P.L. (1988). DNA precipitation assay : a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ. Molec. Mutagen.* 11, 487-495.

- OLIVE, P.L., CHAN, A.P.S., CU, S.S. (1988).** Comparison between the DNA precipitation and alkaline unwinding assays for detecting strand breaks and cross-links. *Cancer Res.* 48, 6444-6449.
- PARSHAD, R., SANFORD, K.K., PRICE, F.M., RHIM, J.S., TARONE, R.E., FUSENIG, N.E., BOUKAMP, P. (1994).** Association of deficient DNA repair during G2 phase with progression from benign to malignant state in a line of human skin keratinocytes transfected with ras oncogene. *Carcinogenesis* 15, 33-37.
- PAYNE, J.F. (1984).** Mixed function oxygenases in biological monitoring programs : review of the potential usage in different phyla of aquatic animals. Dans « State University of Ghent and Institute of Marine Scientific Research » (édité par Persoone, G., Jaspers, E. and Claus, C.) Volume 1, pp. 625-655. Bredene, Belgium.
- PRICE-HAUGHEY, J., BONHAM, K., GEDAMU, L. (1986).** Heavy metal induced gene expression in fish and fish cell lines. *Envir. Hlth Perspect.* 65, 141-147.
- PESONEN, M., GOKSOYR, A., ANDERSON, T. (1992).** Expression of P4501A1 in a primary culture of rainbow trout hepatocytes exposed to β -naphthoflavone and tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Arch. Biochem. Biophys.* 292, 228-233.
- PROUGH, R.A., MAYER, R.T., BURKE, M.D. (1978).** Direct fluorometric method for measuring mixed function oxidase activity. *Drug Metabol. Disp.* 5, 1-8.
- RAABE, F., JANZ, S., WOLF, G., MERTEN, H., LANDROCK, A., BIRKENFIELD, T., HERZSCHUH, R. (1993).** Genotoxicity assessment of waste products of aluminium plasma etching with the SOS chromotest. *Mutation Res.* 300, 99-109.
- RAFFRAY, M., MC CARTHY, D., SNOWDEN, R.T., COHEN, G.M. (1993).** Apoptosis as a mechanism of tributyltin cytotoxicity to thymocytes : a relationship of apoptotic markers to biochemical and cellular effects. *Toxic. appl. Pharmacol.* 119, 122-130.
- REESE, R.N., MEHRA, R.K., TARBET, E.B., WINGE, D.R. (1988).** Studies on the gamma-glutamyl Cu-binding peptide from *Schizosacharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 263, 4186-4192.
- RIXON, R. (1995).** Editorial : Validation - Now or never. Trends and alternatives testing. The Joseph F. Morgan research foundation newsletter, Winter/Wpring, 1-4.
- ROBERTS, E.A., XIE, Z.W., YANG, S., LIPA, J. (1993).** Inductibility of enzyme activities associated with the cytochrome P-450 1A family, ethoxyresorufin O-deethylase and methoxy

O-demethylase in human hepatocyte lines derived from normal liver tissue. *Drug metabolism and disposition* 21, 56-61.

ROCH, M., Mc CARTHER, J.A., MATHIESON, A. T., CLARK, M.J.R., OLAFSON, R.W. (1982). Hepatic metallothionein in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as an indicator of metal pollution in the Campbell river system. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39, 1596-1601.

ROCH, M., Mc CARTHER, J.M. (1984). Hepatic metallothionein production and resistance to heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) - II. Held in a series of contaminated lakes. *Comp. Biochem. Physiol.* 77C, 77-82.

ROCH, M., NOONAN, P., McCARTHER, J.A. (1986). Determination of no effect levels of heavy metals for rainbow trout using hepatic metallothionein. *Wat. Res.* 20, 771-774.

ROESIJADI, G., KIELLAND, S., KLERKS, P.L. (1989). Purification and properties of novel molluscan metallothioneins. *Arch. Biochem. Biophys.* 273, 403-413.

ROSENKRANZ, H., S., KLOPMAN, G. (1995). Relationships between electronegativity and genotoxicity. *Mutation Res.* 328, 215-227.

SATO, M., BREMNER, I. (1993). Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Rad. Biol. Med.* 14, 325-337.

SAWYER, T. W. (1994). Cellular methods of genotoxicity and carcinogenicity. Dans : Introduction to *In vitro* cytotoxicology, Mechanisms and methods. Édité par Barile, F.A. CRC Press, Boca Raton, USA. p. 127-173.

SCHEUHAMMER, A.M., CHERIAN, M.G. (1986). Quantitation of metallothioneins by a silver saturation assay. *Toxic. appl. Pharmacol.* 82, 417-421.

SHARMA, A.K., GAUTHAM, D.C. (1991). Chromosomal aberrations induced by phosphamidon and endolsulfan in the bone marrow cells of mice *in vivo*. *Cytologia* 56, 73-78.

SCHULTE, P.A. (1989). A conceptual framework for the validation and use of biologic markers. *Envir. Res.* 48, 129-144.

SINDERMAN, C. (1988). Biological indicators and biological effects of estuarine\coastal pollution. *Wat. Resourc. Bull.* 24, 931-939.

SMITH, M.R., MATTHEWS, N.T., JONES, K.A., KUNG, H.-F. (1993). Biological actions of oncogenes. *Pharmacol. Ther.* 58, 211-236.

SMITH, I.R., PORTT, C.B. ROKOSH, D.A. (1991). Hepatic mixed function oxidases induced in populations of white sucker, *Catostomus commersoni*, from areas of Lake Superior and the St. Mary's river. *J. Great. Lakes Res.* 17, 382-393.

SMOLOWITZ, R.M., HAHN, M.E., STEGEMAN, J.J. (1991). Immunohistochemical localization of cytochrome P-450IA1 induced by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in liver and extrahepatic tissues of the teleost *Stenotomus chrysops* (scup). *Drug Metabol. Disp.* 19, 113-123.

SNYDER, R.D., MATHESON, D.W. (1985). Nick translation - A new assay for monitoring DNA damage and repair in cultured human fibroblasts. *Environ. Mutagen.* 7, 267-279.

SODERGEN, A. (1987). Biological effects of effluents from pulp mills : preliminary results from the Swedish environment\cellulose project. *Paperi ja Puu-Papper och tra* 5, 422-426.

SODERMAN, J.V. (1987). Handbook of identified carcinogens and non-carcinogens : carcinogenicity-mutagenicity database, Vol. 1, CRC Press, USA.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1982). Methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater. National Technical Information Service, Cincinnati, Ohio, Report No. PB83-201798.

VARANASI, V., STEIN, J.E., HOM, T. (1981). Covalent binding of benzo[a]pyrene to DNA in fish liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, 780-787.

VINDIMIAN, E., GARRIC, J. (1989). Freshwater fish cytochrome P450-dependent enzymatic activities : a chemical pollution indicator. *Ecotoxic. Envir. Saf.* 18, 277-285.

VEZEAU, R. (1982). Protocoles d'échantillonnage, de préservation et de préparation des échantillons pour l'analyse des polluants prioritaires. Environnement Canada, Service de la Protection de l'Environnement, Région du Québec, Montréal.

VODICNIK, M.J., ELCOMBE, C.R., LECH, J.J. (1981). The effects of various types of inducing agents on hepatic microsomal monooxygenase activity in rainbow trout. *Toxic. appl. Pharmacol.* 59, 364-374.

WAGNER, C., LOKKE, H. (1991). Estimation of ecological protection levels from NOEC toxicity data. *Water Res.* 25, 1237-1242.

WALTON, D.G., ACTON, D.G., STICH, H.F. (1988). Chromosome aberrations in cultured central mudminnow heart cells and Chinese hamster ovary cells exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and sediment extracts. *Comp. Biochem. Physiol.* 89C, 395-402.

WEBB, M. (1986). Role of metallothionein in cadmium metabolism. *Handbook Exp.l Pharmacol.* 80, 281-337.

WEBER, D.N., SHAW III, C.F., PETERING, D.H. (1987). *Euglena gracilis* cadmium-binding proteins: recent developments. *Chem.Res. Toxicol.* 3, 281-288.

WEISBURGER, J. H., WILLIAMS, G. M. (1991). Critical effective methods to detect genotoxic carcinogens and noelasm-promoting agents. *Environ. Health Perspect.* 90, 121-126.

WEST, D.C., SATTAR, A., KUMAR, S. (1985). A simplified *in situ* solubilization procedure for the determination of DNA and cell number in tissue cultured mammalian cells. *Analyt. Biochem.* 147, 289-295.

WHITE, P.A., RASMUSSEN, J.B.,BLAISE, C. (1995). Comparing the presence, potency and potential hazard of organic compounds extracted from a broad range of industrial effluents. *Environ. Mol.Mutagen.* 26, Sous presse.

WILLIAMS, G.M., WEISBURGR, J.H. (1986). Chemical carcinogens. Dans : Casarett and Doull's Toxicology - The basic science of poisons. Klaassen, C.D., Amdur, M.O. et Doull, J. éditeurs. McMillan publishing company, New York, USA, p. 99-173.

WINGE, D.R., NIELSON, K.B., GRAY, W.R., HAMER, D.H. (1985). Yeast metallothioneins : sequence and metal-binding properties. *J. Biol. Chem.* 260, 14464-14470.

ZARAFULLAH, M., OLSSON, P.-E., GEDAMU, L. (1990). Differential regulation of metallothionein genes in rainbow trout fibroblasts, RTG-2. *BBA* 1049, 318-323.

ZUCKER, R.M., ELSTEIN, K.H., EASTERLING, R.E., MASSARO, E.J. (1988). Flow cytometric analysis of the cellular toxicity of tributyltin. *Toxic. Lett.*, 43, 201-208.

9. Annexe

Article 1

HEPATIC METALLOTHIONEIN LEVEL AND MIXED FUNCTION OXIDASE ACTIVITY IN FINGERLING RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) AFTER ACUTE EXPOSURE TO PULP AND PAPER MILL EFFLUENTS

FRANÇOIS GAGNÉ¹ and CHRISTIAN BLAISE^{2*}

¹Analex Inc., 3025 Montée St Aubin, Chomedey, Laval, Québec, H7L 4E4 and ²Centre Saint-Laurent, Conservation et Protection, Environnement Canada, 105 rue McGill, Montréal, Québec, Canada H2Y 2E7

(First received March 1992; accepted in revised form March 1993)

Abstract—Hepatic metallothionein (MT) levels and mixed function oxidase (MFO) activity (7-ethoxyresorufin-*o*-deethylase or EROD) were measured in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sublethal concentrations of 12 pulp and paper effluents, after completion of 96 h static acute lethality assays. Barring one primary-treated effluent where MFO levels were significantly depressed and two secondary-treated effluents where no significant MFO induction were observed, all other effluents triggered significant induction of MT and EROD, regardless of mill process/treatment or of effluent lethality and chemical characteristics. MT and EROD inductions were significant, however, at higher concentrations for secondary-treated effluents than for primary-treated ones. Lethal (96 h LC₅₀s) to sublethal (MT and EROD lowest observable effect concentrations) ratios were variable and indicated that significant biochemical effects were present at effluent concentrations that were roughly 4–33 (MT) and 3–59 (EROD) times lower than the LC₅₀. Enzyme induction ranged from 1.3 to 2.5-fold for MT and from 1.3 to 9.4-fold for EROD compared to controls. Limited chemical data available suggest that there were indeed classes of compounds present capable of inducing MT or EROD. Observed patterns of MT/MFO responses also suggest that contaminant interactions may have interfered with induction for some of the effluents studied. Refinements of this combined (sub)lethal bioassay procedure are envisaged to determine whether it can provide an efficient means of detecting hazardous chemicals in industrial wastewaters.

Key words—metallothionein, mixed function oxidase, EROD, fingerling rainbow trout, liver enzyme activity, acute exposure, pulp and paper effluents, LC₅₀ bioassay

INTRODUCTION

Although expanding use of multitrophic tests has clearly marked the field of aquatic toxicology in recent years (Leclerc and Dive, 1982; Persoone *et al.*, 1984; Bitton and Dutka, 1986; Blaise *et al.*, 1988; Munawar *et al.*, 1989), interest in fish as bioassay organisms to assess hazards of chemicals and liquid wastes has certainly not waned (Heath, 1987; APHA, 1989; Sprague, 1990). Salmonids, for example, have already contributed enormous knowledge in fields of pathology, physiology and toxicology (Wells and Moyses, 1981). In Canada, on-going efforts to upgrade and standardize fish bioassay protocols (Environment Canada, 1990a, b), whether for research, monitoring or regulatory purposes, are an unambiguous indication that fish will continue to play a major role as ecotoxicity indicators in the future.

While understanding the integrative effects of toxic

stress on fish populations and communities may require a comprehensive multidisciplinary approach at biochemical, physiological, behavioural, immunological, genetic, pathological and ecological levels of organization (Sindermann, 1988; Adams *et al.*, 1989), early warning systems to screen for the presence of potentially hazardous chemicals in industrial point source discharges must be at the forefront of environmental protection strategies. Metallothioneins (MTs) and mixed function oxidases (MFOs) are two such early-warning and defensive systems which may prove useful for detecting biochemical changes in fish after laboratory or field exposure to environmental pollutants (Neff, 1985).

MTs represent a family of metal-binding proteins, characterized by a 25–30% cysteine content and devoid of aromatic amino acids and histidine (Price-Haughey *et al.*, 1986). MTs are inducible by several divalent heavy metal cations (e.g. Cu²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺) and it is generally held that their role is to regulate and detoxify heavy metals (Bremner and Mehra, 1983; Cherian and Nordberg, 1983). Measuring MT levels in fish liver, the major organ of

*All correspondence should be addressed to: Dr C. Blaise. Ecotoxicologie & Écosystèmes, Centre Saint-Laurent, Environnement Canada, 1001 Pierre Dupuy, Longueuil, Québec, Canada J4K 1A1.

induction, can serve as a useful index of metallic stress (Roch *et al.*, 1982; Hamilton and Mehrle, 1986).

The cytochrome *P*-450-dependent MFO enzymatic system represents a family of hemoproteins (cytochrome *P*-450s) found on the smooth endoplasmic reticulum (deBethizy and Hayes, 1989). Cytochrome *P*-450s abound in monooxygenase activity and are involved in the phase I biotransformation of various lipophilic compounds, including xenobiotics (Neff, 1985). In particular, 7-ethoxyresorufin-*o*-deethylase (EROD), catalyzed by a specific cytochrome *P*-450 isozyme in fish livers, responds specifically (induced levels of activity) to planar organic compounds including polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, chlorinated dibenzo dioxins and chlorinated dibenzo furans (Hansen and Addison, 1990). Measuring induced hepatic cytochrome *P*-450 levels and EROD activity in fish can therefore be indicative of exposure to certain hazardous organic compounds.

Industrial wastewaters are major sources of mixed contaminants to aquatic ecosystems (Bergman *et al.*, 1986; OECD, 1987; Blaise *et al.*, 1988), and are strong candidates as potential inducers of MTs and MFOs (Payne, 1984; Neff, 1985; Vindimian and Garric, 1989). Pulp and paper mill effluents, in particular, are notorious for the (sub)lethal effects which they exert on fish (Couillard, 1980; Holmbom and Lehtinen, 1980; Blaise *et al.*, 1986; Kovacs, 1986; Blaise and Costan, 1987; Environment Canada, 1987; Södergren, 1987). These effluents contain a plethora of chemicals (Holmbom and Lehtinen, 1980; Kringstad and Lindström, 1984; Environment Canada, 1987) and have been shown to induce hepatic detoxification in both feral fish (Förlin *et al.*, 1985; Södergren, 1987; Lindström-Seppä and Oikari, 1990; Munkittrick *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1991; Hodson *et al.*, 1992) and laboratory-exposed fish (Förlin *et al.*, 1985; Andersson *et al.*, 1987; Oikari *et al.*, 1988). Several laboratory experiments with long-term exposures (weeks to months) have demonstrated the effects of effluents on fishes hepatic xenobiotic metabolism (e.g. Andersson *et al.*, 1987; Oikari *et al.*, 1988; Lehtinen *et al.*, 1990), but significant induction of cytochrome *P*-450-dependent enzyme activities after just 3–5 days' exposure to inducers has also been documented (Lidman *et al.*, 1976; Addison *et al.*, 1981; Fingerman *et al.*, 1983).

Our laboratory regularly undertakes 96 h acute lethal toxicity testing of industrial effluents with rainbow trout for monitoring, compliance and regulatory purposes with a well-established procedure (Environment Canada, 1990a). Building in a concurrently-run sublethal bioassay to measure biochemical parameters indicative of the presence and effects of certain (in)organic pollutants appeared a worthwhile objective. This would clearly optimize bioanalytical efficiency and information output. In considering this investigation, we sought answers to the following

questions: does significant induction of hepatic MT/MFO result in rainbow trout exposed for 96 h to pulp and paper effluents? If so, are there relationships between lethality and sublethality data? Can MT/MFO data discriminate between mill processes and/or treatment levels? Could such a procedure eventually have value as a useful (sub)lethal bioassay to screen industrial effluents?

In this paper, we report that hepatic MT and MFO induction occurred in rainbow trout fingerlings (*Oncorhynchus mykiss*) following a 96 h exposure to sublethal concentrations of 12 pulp and paper mill effluents. Interferences linked to MT and MFO measurements in chemically complex effluents are also discussed herein. In this initial work, we emphasize once again our wish to examine whether these two biochemical systems could prove to be practical endpoints to screen for the presence of potentially hazardous bioavailable (in)organic xenobiotics in effluents, during routine laboratory acute toxicity tests.

MATERIALS AND METHODS

Effluent samples

Twelve pulp and paper mill effluent samples, representative of various mill processes with primary or primary and secondary wastewater treatment, were used in this study (Table 1). Each was a 24 h composite collected according to an Environment Canada sampling protocol (Vezeau, 1982). Brought back to the laboratory in several Rubbermaid 60 l. containers lined with polyethylene bags, each effluent was recomposited to ensure homogeneity and separated once more to meet biological (360 l.) and chemical (40 l.) volumetric analytical requirements. Chemical characterization was performed in accordance with specific analytical procedures for metals (APHA, 1989), PAHs, PCBs, dioxins and furans (US EPA, 1982).

General bioassay procedure

Since the effluent samples studied were part of an on-going monitoring program to determine the degree of acute lethality to rainbow trout fingerlings of pulp and paper mill effluents from the province of Québec, both acutely lethal and sublethal (MT and MFO measurements) effects were determined concurrently. Acute lethality testing was performed with the standardized 96 h static LC₅₀ bioassay procedure recommended by Environment Canada (1990a) with fingerling (5.5 ± 0.3 cm; 2.3 ± 0.4 g) rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Bioassays were undertaken at 15°C in experimental vessels each of which contained 10 fish and 60 l. of a logarithmic series of effluent concentrations (100, 65, 56, 42, 24, 18, 13.5, 10, 7.5, 5.6, ... 0% v/v). Preliminary 24 h exposure tests (i.e. 4 trout placed in each of 5 l. rigid polyethylene beakers containing 4 l. of 100, 50, 10, 1 and 0% v/v effluent) were conducted prior to execution of the standard 96 h bioassays. As trout mortality predominantly occurs within the first 24 h during 96 h acute lethality bioassays with industrial effluents (Blaise and Costan, 1987), preliminary testing is useful to delineate the appropriate range of concentrations at which the definitive 96 h LC₅₀ should be carried out. It also ensured selection of a minimum of 3 sublethal concentrations for each effluent from which surviving fish, after the 96 h exposure, could be recovered for subsequent MT and MFO measurements (Table 1). After three sublethal effluent concentrations had been selected based on results of each 24 h preliminary test,

four replicates of each of these sublethal effluent concentrations (and four control replicates) were incorporated into the 96 h bioassay.

Chemicals

Chemicals for protein analysis (serum bovine albumin and Coomassie brilliant blue G-250) were purchased from Sigma Chemical Company. For MT analysis, glycine, rabbit MT and hemoglobin (Hb) were purchased from Sigma Chemical Company, and silver nitrate

was purchased from Fisher Scientific. For MFO determinations, potassium phosphate (KH_2PO_4), reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), 7-ethoxy-3H-phenoxazin-3-one ethyl ether (ethoxyresorufin) and 7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one (resorufin), phenazine ethanesulfonate, ascorbate, Triton N-101, sodium cholate, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), sucrose, potassium chloride (KCl), dithiothreitol (DTT), tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) and glycerol were purchased from Sigma Chemical Company.

Table 1. Toxicological characteristics associated with the pulp and paper mill effluents studied

Effluent No.	Mill process†	Treatment‡	96 h LC_{50} (% v/v)§	Sublethal exposure concentrations (% v/v) used for MT and MFO measurements¶ and induction factors over controls			Lethal (L) to sublethal (S)¶ ratios (L/S)†† observed with the effluents		
							L/S (MT)	L/S (MFO)	
1	TMP	1	4.2-5.6		0.56	1.0	1/8		
				MT	1.1	1.4*	2.3*	4.9	—§§
2	TMP	1	5.6-7.5	MFO	0.4*	0.1*	0.3*		
					0.56	1.0	1.8		
3	GWMP	1	6.3	MT	1.0	1.3*	1.3*	6.6	11.8
				MFO	1.3*	1.1	1.1		
4	TMP	1	8.4		0.56	1.0	1.8		
				MT	1.7	1.1	1.2	11.3	6.3
5	TMP, TCP	1	9.0	MFO	1.4	2.8*	1.8		
					0.56	1.0	1.8		
6	TMP, SCP	1	10-18	MT	1.1	1.1	1.5*	4.7	15.0
				MFO	2.2*	1.8*	2.6*		
7	KP	1	18-24		0.56	1.0	1.8		
				MT	1.7	2.0*	1.8*	9.0	5.0
8	TMP, TCP	1	24-42	MFO	1.7	1.6	5.2*		
					0.56	1.0	1.8		
9	KP	1	24-42	MT	1.6*	1.5*	1.4	25.0	25.0
				MFO	1.7*	1.5*	1.4		
10	TMP	2	42		5.6	10	18		
				MT	1.5*	2.0*	2.4*	3.8	3.8
11	SCP, GWMP	2	42-56	MFO	2.9*	2.2*	2.1*		
					0.56	1.0	1.8		
12	KP	2	65-100	MT	1.0	1.3*	1.4*	33.0	59.0
				MFO	4.5*	1.1	2.6††		
10	TMP	2	42		5.6	10	18		
				MT	1.7*	1.6*	1.8*	5.9	33.0
11	SCP, GWMP	2	42-56	MFO	2.0††	2.0*	0.8		
					5.6	10	13.5		
12	KP	2	65-100	MT	1.8*	1.8*	2.0*	8.8	8.8
				MFO	9.4*	5.3††	5.1††		
10	TMP	2	42		5.6	10	18		
				MT	1.8*	2.5*	2.3*	7.5	<2.3
11	SCP, GWMP	2	42-56	MFO	1.0	1.4	0.9		
					5.6	10	13.5		
12	KP	2	65-100	MT	1.8*	1.8*	2.0*	8.8	8.8
				MFO	9.4*	5.3††	5.1††		
10	TMP	2	42		5.6	10	18		
				MT	1.3	1.2	2.1*	4.6	<4.6
11	SCP, GWMP	2	42-56	MFO	1.6	2.1††	1.7		
					5.6	10	13.5		

*Significant difference over controls at $P < 0.05$.

†GWMP (groundwood mechanical pulping), KP (Kraft pulping), SCP (sulphite chemical pulping), TCP (thermochemical pulping), TMP (thermomechanical pulping).

‡1 (primary treatment), 2 (primary and secondary treatment).

§When insufficient numbers of effluent concentration data points displaying between 0 and 100% mortality effects were obtained, an LC_{50} range value was reported (e.g. 96 h $\text{LC}_{50} = 18-24\%$ v/v for effluent 7). Specific 96 h LC_{50} values reported were determined by Probit analysis (Litchfield and Wilcoxon, 1949).

¶MT (metallothionein), MFO (mixed function oxidase; specifically, EROD activity is considered here).

||Lowest observable effect concentration (LOEC) exhibiting a significant induction of MT or MFO (EROD activity) over control values.

††In reporting the lethal to sublethal (L/S) ratio values, a median LC_{50} value was first determined from those effluents presenting a 96 h LC_{50} range value (e.g. Table 1: effluent 1 median $\text{LC}_{50} = (4.2 + 5.6)/2 = 4.9$). The respective L/S ratios for MT and MFO were then calculated with LOECs (e.g. L/S ratio of effluent 1 for MT = 4.9% v/v/ 1% v/v = 4.9).

‡‡Although induction factor appears elevated, Dunnett's *t*-test did not show significance, owing to replicate variability.

§§Not calculable because of toxicity effects on EROD activity.

Fish liver preparation

After the bioassay had run its course, fish destined for MT and MFO measurements were anesthetized in groups of 10 with 25 mg/l of tricaine methanesulfonate (MS 222, Sandoz) for 50 ± 10 s at 15°C. This level of anesthetic treatment (as well as 125 mg/l tricaine) was tested for MT or MFO induction. After decapitation, dissected livers from 10 fingerlings present in each replicate effluent concentration were then individually rinsed in ice-cold 10 mM Tris-HCl buffer, containing 154 mM KCl and 1 mM EDTA, blotted dry and pooled in a centrifuge tube with 3 ml of a 20 mM Tris-acetate buffer containing 250 mM sucrose and 2 mM DTT. Pooling the small (pin point) livers was necessary to ensure sufficient biological material for running biochemical analyses. Livers were homogenized with a Teflon pestle tissue grinder at 4°C, and centrifuged (10,000 g, 20 min, 4°C); the S_{10} supernatant fraction was collected and stored at -80°C for analysis the next day. Aliquots of the S_{10} fraction (25 μ l) were kept for protein analysis using serum bovine albumin as standard (Bradford, 1976).

Metallothionein analysis

Levels of hepatic MT in the S_{10} fraction were determined by the silver saturation assay of Scheuhammer and Cherian (1986) as modified by Gagné *et al.* (1990). A 200 μ l volume of the S_{10} fraction was heat denatured in a boiling water bath for 3 min, after which coagulated proteins were removed by centrifugation (10,000 g, 2 min). A 50 μ l subsample of the heat denatured supernatant was then saturated with 100 μ l of 20 mg/l Ag^+ in a pH 8.5 500 mM glycine buffer and incubated for 5 min at room temperature. Afterwards, sample volume was adjusted to 1.1 ml with glycine buffer. Removal of excess Ag^+ loosely (or not) bound to MT and precipitation of other proteins were achieved by adding 100 μ l of a 2% Hb solution (w/v in water) to the sample and incubating for 5 min, followed by heating in a boiling water bath for 2.5 min, cooling on ice and centrifuging (10 000 g, 2 min). The Hb addition, heat denaturation and centrifugation steps were repeated once more. The total Ag in the supernatant was quantified using a graphite furnace atomic absorption spectrophotometer equipped with a Zeeman effect background corrector (Varian AA-300/400). The levels of MT were determined assuming that 17 mol of Ag^+ bind to 1 mol of MT (Scheuhammer and Cherian, 1986), as is the case for mammalian MT. Results are expressed in units of mammalian MT equivalents, where 1 unit of mammalian MT corresponds to 1 pmol of MT/mg protein in the S_{10} fraction. The exactness of this ratio was confirmed with standard additions of rabbit MF (0.5–3 μ g) in the S_{10} fraction in triplicate.

Mixed function oxidase analysis

EROD activity was measured by a direct enzymatic assay (Prough *et al.*, 1978). The assay buffer contained 10 μ M dicoumarol to prevent further metabolism of the fluorescent product (i.e. resorufin) to a non-fluorescent molecule (Nims *et al.*, 1984). EROD activity was expressed as pmol of resorufin formed/min/mg protein (total) in the S_{10} fraction. In addition to total protein, levels of cytochrome P-450 protein in the S_{10} fraction were measured according to the sodium dithionite difference spectrum principle in the presence of ascorbate and phenazine ethanesulfonate, which corrects for hemoglobin and methemoglobin spectral interferences (Johannessen and De Pierre, 1978). In order to reduce turbidity owing to microsomes and other membranous vesicles, 300 μ l of the S_{10} fraction were mixed with 700 μ l of a pH 7.4 100 mM potassium phosphate buffer containing 0.4% sodium cholate, 0.2% Triton N-101, 1 mM EDTA and 20% glycerol.

Data analysis

Four pooled biochemical values (S_{10} fraction protein, MT, cytochrome P-450 content and EROD activity) from each of the control and three sublethal effluent concentrations were tested by analysis of variance and significant differences between controls and treatments were determined by Dunnett's *t*-test ($P < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Fish anesthesia with tricaine methanesulfonate (MS 222)

MS 222 as an anesthetic for fish subjected to mixed function oxidase analysis has been reported to produce interferences, resulting in significant depression of subsequent *in vitro* activities of cytochrome P-450 (Chevion *et al.*, 1977; Fabacher, 1982) and of EROD (Fabacher, 1982). To ensure no effects of this anesthetic on the biochemical data generated in this study, an experiment was conducted with both anesthetized and unanesthetized (blow on head followed by decapitation) fish.

As shown in Fig. 1, anesthesia with a 25 mg/l solution of tricaine for 50 ± 10 s (the exposure concentration and time adhered to throughout this study) had no significant effects on either MT, cytochrome P-450 or EROD in relation to unanesthetized control fish. Neither were any effects noted for these parameters with a 125 mg/l tricaine solution applied to fish with the same exposure time. The latter concentration is slightly higher than that employed by Fabacher (1982) who had demonstrated effects on the MFO system of immature brook trout with 112.5 mg/l tricaine following a 5 min exposure. On the basis of Fig. 1 results, however, there is no evidence to suggest that the anesthetic procedure applied in this investigation may have interfered with the hepatic parameters measured.

Toxicological effects of the pulp and paper effluents studied

All effluents tested (Table 1) invariably displayed (sub)lethal effects, regardless of mill characteristics (process and treatment). Effluents subjected to primary and secondary treatment (effluents 10–12) were less toxic than those receiving primary treatment only (effluents 1–9), corroborating earlier findings on the benefits of secondary treatment (Blaise *et al.*, 1987).

Significant induction of both MT and MFO occurred in one or more of the three sublethal concentrations tested in nine effluents, barring effluent 1, where MFO levels were significantly depressed, and effluents 10 and 12, where no significant MFO induction was observed. MT and MFO induction generally occurred at higher concentrations for secondary-treated effluents than for primary-treated effluents, in part through the selection of sublethal effluent exposure concentrations based on results of preliminary 24 h LC₅₀ tests. Although our experimentation at this time was not designed to specify sublethal (MT and MFO) effluent threshold effects concentrations,

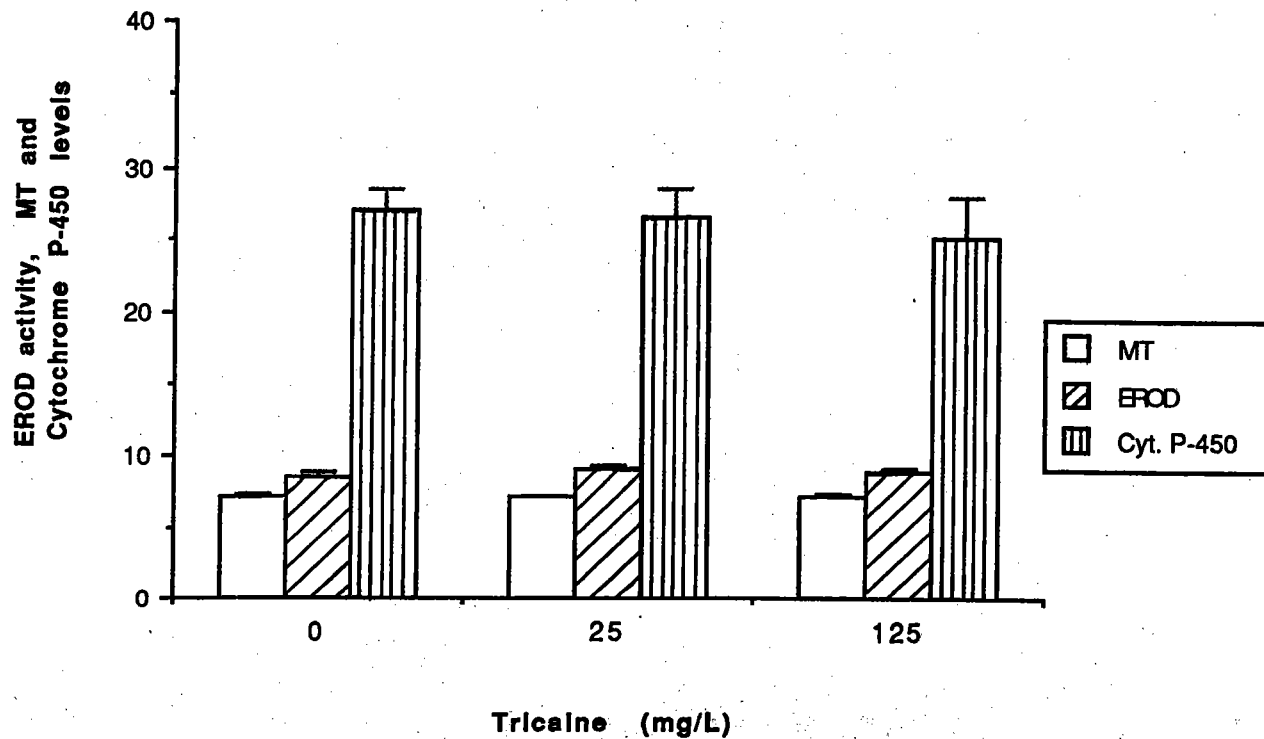


Fig. 1. EROD activity and levels of MT and cytochrome *P*-450 after a 50 ± 10 s exposure of fingerling rainbow trout to 0, 25 and 125 mg/l of tricaine methanesulfonate. Bars represent means ($n = 4$ from each of 10 pooled livers) with SE. There are no significant differences of tricaine-anesthetized fish from controls at $P < 0.05$. EROD activity is expressed as pmol of resorufin formed/min/mg protein, cytochrome *P*-450 level is expressed as pmol/mg protein and level of MT is expressed in units of mammalian equivalents.

biochemical responses would nevertheless be expected to occur at increasingly lower effluent concentrations as acute lethality intensifies (Blaise *et al.*, 1986).

Interestingly, lethal to sublethal (L/S) ratios, as explained and shown in Table 1, indicate that LOECs (lowest observable effect concentrations) corresponding to significant MT and MFO inductions were observed at effluent concentrations which were 3.8–33 and 3.3–59 times lower than the LC₅₀ values, respectively. Highest L/S ratios came from effluents 6 (L/S for MT and MFO = 25) and 8 (L/S for MT and MFO = 33 and 59, respectively). In complex effluents such as these, chemicals responsible for observed lethal effects may (or may not) be the same as those producing sublethal (i.e. MT/MFO inductions) effects. While L/S ratios are clearly an area for further study (e.g. to examine whether relationships can exist between lethality and sublethality in effluents shown to induce MTs and MFOs), short-term goals in our laboratory will focus on refining this combined (sub)lethal bioassay to obtain NOECs (no observable effect concentrations) for MT/MFO activity in pulp and paper as well as in other groups of industrial effluents. Table 1 data already indicate NOECs for certain effluents, although their determination was not sought specifically in this initial study. Evidently, there would be value in reporting precise MT/MFO NOECs for effluents, as those exhibiting low NOEC (high toxicity) values would certainly be targeted as priority wastewaters for further detailed investigations.

MT/MFO induction activity after exposure to effluents

Following a 96 h sublethal exposure, statistically significant induction ranging from 1.3 (effluents 2 and 8) to 2.5 (effluent 10) for MT and from 1.3 (effluent 2) to 9.4 (effluent 11) for MFOs (EROD), respectively, were measured over controls (Table 1). These responses may be considered marginal in comparison to those expected for fish exposed for lengthy periods to similar effluents (Lindström-Seppä and Oikari, 1989). As they are statistically significant, induction indicates the presence of bioavailable MT/MFO inducers which are rapidly absorbed either via the water column or through the ingestion of suspended particles from the effluents.

Our results for MFOs parallel those observed in other fish exposures to pulp and paper effluents. EROD activities were increased 3–5 times over controls in fourhorn sculpin (*Myoxocephalus quadricornis*) exposed to bleached pine/birch pulp effluent for 5–9 months (Andersson *et al.*, 1987). With immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed for 7 weeks to two concentrations (0.05 and 0.25 % v/v) of each of six different bleached kraft mill effluents (BKME), Lehtinen *et al.* (1990) reported up to 6-fold increases in liver EROD activity. Again, with BKME concentrations (10, 20 and 40% v/v) and times of exposure (1, 3, 7 and 14 days) more closely matching

our own, Mather-Mihaich and Di Giulio (1991) observed 3–10-fold increases in EROD activities with channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Their data more precisely reveal significant EROD inductions of 3–5 times and 3–8 times over controls after just 1 and 3 days of exposure, respectively. Finally, hepatic AHH (aryl hydrocarbon hydroxylase), another key monooxygenase expressed as a result of *P*-450 IA1 induction, revealed 10-fold and 5-fold activity increases in feral white suckers (*Catostomus commersoni*) caught immediately and 95 km downstream, respectively, from a BKME effluent relative to fish caught 10 km upstream (Hodson *et al.*, 1992).

We are not aware of MT induction having been reported for fish exposed directly to industrial effluents in laboratory studies. However, hepatic MT concentrations in wild rainbow trout and in rainbow trout held in a series of lakes contaminated by a mixture of zinc, copper and cadmium (Zn:Cu:Cd, 400:20:1) were increased to levels corresponding to maximum induction factors of close to 4, as calculated from the data reported by Roch *et al.* (1986). Maximum induction from laboratory data reported by the same authors closely matched those of the field observations, after juvenile rainbow trout had been continuously exposed to identical metal mixtures for 4 weeks. In another study, MT induction ranged from 1 to 1.6-fold, after brook trout had been exposed to waterborne cadmium (0–19.1 µg/l) for 30 days (Hamilton *et al.*, 1987). Overall, the MT induction factors (1–4) determined from these studies are not much different than those (1–2.5) we report.

In this initial study of a combined (sub)lethal bioassay where measurement of MT/MFO levels are "piggy-backed" onto a standardized acute lethality procedure, no attempt was made to run time-course experiments with the effluents to see whether more elevated induction factors could be obtained with prolonged exposures. With complex-liquid wastes, optimal time-course inductions for MT and MFOs would likely vary according to the specific chemical composition of each effluent. An extended exposure might enhance MFO levels where low concentrations of one or more inducers are present, for example, while decreasing these same levels in another effluent where prolonged exposure would degrade cytochrome *P*-450 because of the action of other toxic chemicals. Time-course MT/MFO induction is clearly an area requiring major investigation to optimize the detection of the presence/effects of xenobiotics impacting on hepatic metabolism in effluent-exposed fish.

Chemical characteristics of the pulp and paper effluents studied

Basic chemical characteristics determined for the pulp and paper effluent samples used in the (sub)lethal bioassay procedure are detailed in Table 2. Summarized here are those classes of (in)organic chemicals detected in the effluents for

Table 2. Chemical characteristics associated with the pulp and paper mill effluents studied: classes of toxic xenobiotics potentially linked to MT and MFO inductions

Effluent	Metals† (µg/l)				Total PAHs‡ (µg/l)		Dioxins (pg/l)	Furans (pg/l)	PCBs (µg/l)
	Cu¶	Cd¶	Zn¶	Hg¶	No.	Conc.			
1	40	<30	300	5	1	1.3¶ (¶Naphthalene: only species assayed)	NA§	NA	NA
2	<30	<30	350	<0.2	11	6.6¶ (¶Naphthalene, 0.70; ¶Benzo-a-pyrene, 0.13)	NA	NA	Not found (<0.1)
3	<30	<30	160	<0.2	4	2.2¶ (¶Naphthalene, 1.3)	NA	NA	Not found (<0.1)
4	<30	<30	220	<0.2	1	0.6¶ (¶Naphthalene: only species assayed)	NA	NA	Not found (<0.1)
5	<30	<30	130	<0.2	2	0.3¶ (¶Naphthalene, 0.13)	NA	NA	Not found (<0.1)
6	<30	<30	220	<0.2	2	0.6¶ (¶Naphthalene, 0.5)	NA	NA	Not found (<0.1)
7	<30	<30	<100	<0.2	2	0.3¶ (¶Naphthalene, 0.2)	760 (O ₈ CDD)	41 (2,3,7,8 TCDF)¶	<0.5 Aroclor 1254 <0.5 Aroclor 1242 <0.02 Aroclor 1260 0.2 Aroclor 1242
8	<30	<30	120	<0.2	2	0.6¶ (¶Naphthalene, 0.5)	NA	NA	
9	<30	<30	90	<0.2	2	0.4¶ (¶Naphthalene, 0.3)	NA	NA	Not found (<0.1)
10	<30	<30	200	<0.2	2	0.5¶ (¶Naphthalene, 0.4)	NA	NA	Not found (<0.1)
11	<30	<30	190	<0.2	6	12 (¶Naphthalene, 6.9)	NA	NA	<0.2 Aroclor (1242, 1248, 1254, 1260)
12	<30	<30	60	<0.2	2	0.4¶ (¶Naphthalene, 0.3)	390 (O ₈ CDD)	<10	Not found (<0.1)

†Reported concentrations refer to total metal concentrations for which cation content is unknown.

‡Number of PAH species reported refer to the number analysed in each effluent.

§NA = not assayed.

¶Indicates known inducers for MTs and MFOs found in effluents: Cu, Zn, Hg (Dunns *et al.*, 1987); Cd (Hamer, 1986); naphthalene, benzo-a-pyrene (Fingerman *et al.*, 1983); 2,3,7,8-TCDF (Smolowitz *et al.*, 1991); PCBs (Elcombe and Lech, 1987).

which MT and MFO induction has been documented. Divalent cations of metals including Cu, Cd, Zn and Hg are known to induce MTs (Roch *et al.*, 1982; Bremner and Mehra, 1983; Cherian and Nordberg, 1983; Dunns *et al.*, 1987) and some PAHs (Fingerman *et al.*, 1983), as well as some chlorinated dibenzo dioxins/furans and polychlorinated biphenyls (Hansen and Addison, 1990) can induce MFOs.

Limited chemical analysis of these effluents cannot suggest that identified metals and compounds are solely responsible for the significant MT/MFO inductions previously discussed. Clearly, such a conclusion would have to be backed by proof that measured levels of chemicals are sufficient to induce MTs and MFOs in a 96 h time-frame, or by the detection of sufficient residues in fish tissue. Such investigations would also shed light on the biological relevance of MT/MFO inductions, which remains largely an unanswered question. The chemical data are rather illustrated to demonstrate that there are indeed (classes of) compounds present in the effluents potentially capable of eliciting MT/MFO inductions. Other unidentified chemicals may have played an induction role as well, since many components have yet to be identified in pulp and paper mill processes (Andersson *et al.*, 1987; Mather-Mihaich and Di Giulio, 1991). Significant elevations of MTs and MFOs (Table 1) represent an integrated response to a number of (in)organic pollutants and constitute direct evidence that biologically-active xenobiotics did in fact enter the fish. Given the potential range of chemicals in such complex effluents, the biological response (induction) may be, in fact, more useful than chemical analysis in detecting significant "toxic" mixtures of chemicals.

Observed patterns of MT/MFO responses with the effluents studied

Hepatic MT levels in trout exposed to the pulp and paper effluents suggest that divalent cations of metals such as Cu, Cd, Zn and Hg were biologically available, since these are the species which induce MT (Hamer, 1986; Dunns *et al.*, 1987). With the 12 effluent samples investigated, induction of MTs indicated increased levels of protein, with or without an apparent linear dose-response (Table 1). However, only effluent 3 showed a significant increase in MT levels at the lowest sublethal concentration followed by depression of MT levels at the two highest concentrations of exposure (Table 1). These two types of response patterns are illustrated in Fig. 2 based on data obtained with effluents 1 and 3.

It is evident that exposing fish to effluents which are complex mixtures of (in)organic chemicals could produce interfering effects (antagonism, synergism) on the subsequent measurement of biochemical parameters. Under this assumption, it is plausible that some organic chemicals could have produced deactivating effects on MT induction as fish were exposed

to higher (and therefore more toxic) concentrations in the case of effluent 3 (Fig. 2).

Figure 3 reflects the types of response patterns observed for trout MFO levels based on induction factors reported in Table 1. Responses ranged from extremes of significant depression of MFO levels over controls (effluent 1) to no significant induction of MFO levels (effluent 10), with intermediate responses of significant induction with exposure to increasing effluent concentration (effluent 5) and significant induction at lower sublethal concentrations of exposure followed by a drop in induced levels at higher sublethal concentrations of exposure (effluent 6). These observations tend to show that the MFO response system is perhaps more sensitive to interference resulting from exposure to complex wastewaters than is the MT response system, as inhibitory effects are suggested in effluents 1, 3, 6, 7, 8, 9 and 11 (Table 1).

The activity of EROD, our measure of MFOs, reflects the amount of the *P-450IA1* isoform (also known as cytochrome *P-448* or as *LM4b* by Miranda *et al.*, 1990) of the cytochrome *P-450* family. This is the principal form induced by PAHs, PCBs, dioxins and furans (Vodicnik *et al.*, 1981; Melançon *et al.*, 1989; Hansen and Addison, 1990) and it has a high specificity for the substrate 7-ethoxyresorufin. Therefore, EROD activity displays the induction of this specific cytochrome *P-450* isoform (Buhler and Williams, 1988) and is the one apparently subjected to interferences by chemical components in some of the effluents. Similar interferences on total cytochrome *P-450* levels (i.e. significant depression with increasing effluent concentration) were also observed in our study with effluents 3, 8 and 10 (data not shown) which further suggest that chemical components of these liquid wastes might interfere with other biotransformation enzymes.

Difficulties linked to predicting the biochemical outcome of exposure of fish to complex effluents have been documented to some extent. A field study, measuring MFO and cytochrome *P-450* levels in brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*) inhabiting areas contaminated by (non)inducer organics and trace metals stemming from complex waste discharges, found depressed hepatic microsomal *P-450* concentrations and similar EROD activities when compared to those from an unpolluted site. Metals may possibly have played a role in reducing the synthesis of (or in destroying) cytochrome *P-450* while nevertheless allowing other xenobiotic inducers to stimulate EROD to some extent (Gallagher and Di Giulio, 1989). While there is a virtual absence of information dealing with metal effects on fish hepatic cytochrome *P-450*, Maines and Kappas (1976) and Eaton *et al.* (1980) have shown that several (Cd, Zn, Cu, Co, Hg) can reduce total levels of cytochrome *P-450* in rat livers. One recent study has demonstrated that plaice (*Pleuronectes platessa*) exposed simultaneously to cadmium and 3-methylcholanthrene (3-MC) decreased *P-450* and EROD activities,

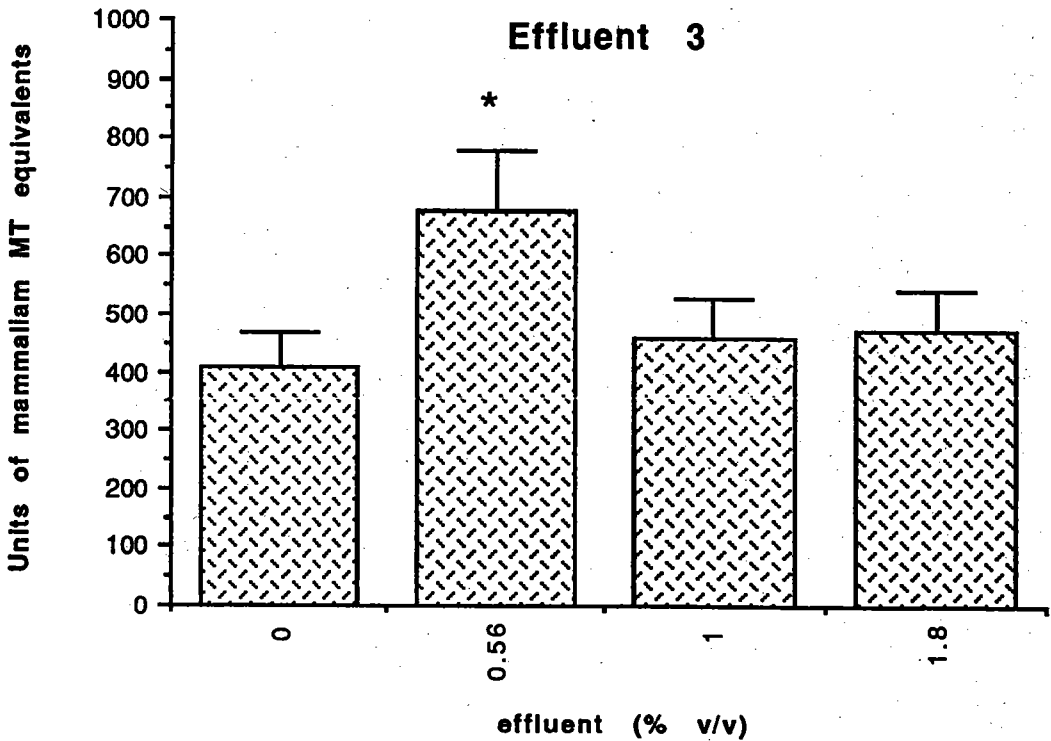
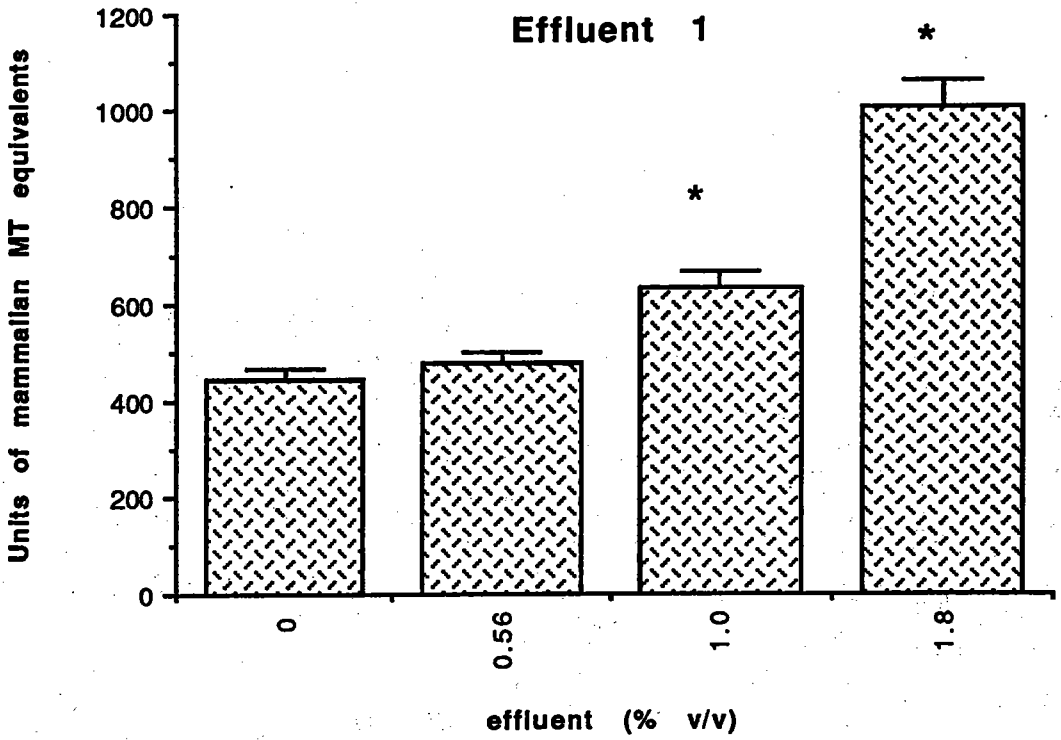


Fig. 2. Types of response patterns observed with MT after acute exposure to sublethal effluent concentrations. Bars represent means ($n = 4$ replicates from each of 10 pooled livers) with SE. *Significant from controls (0%) at $P < 0.05$.

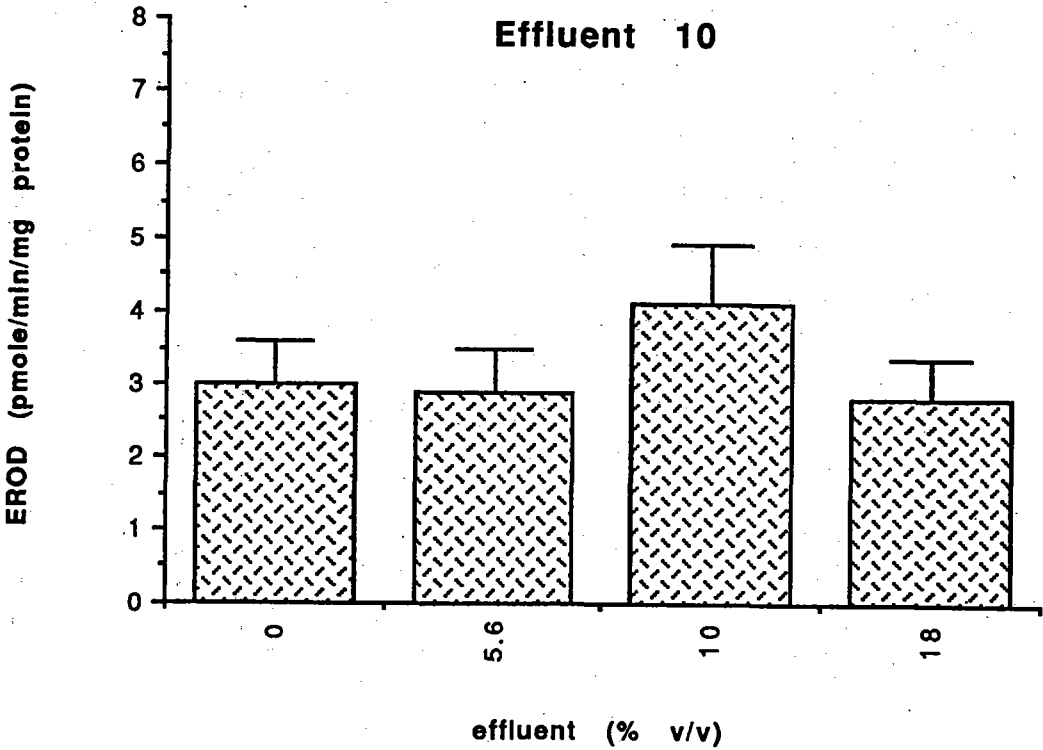
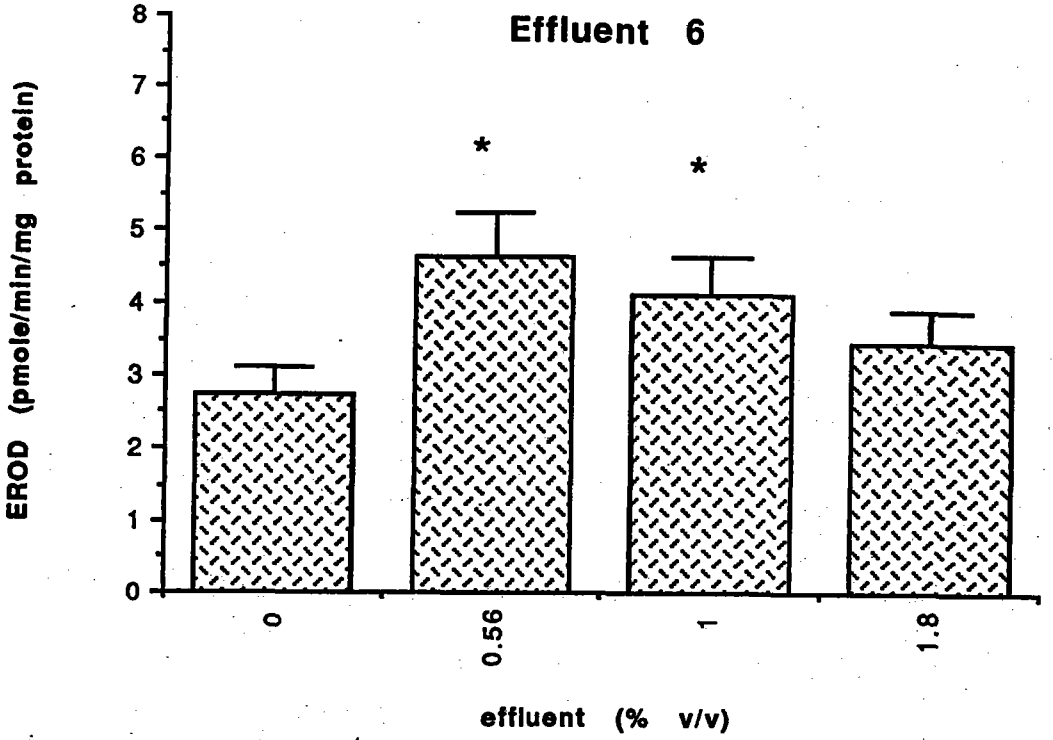


Fig. 3(a). *Caption opposite.*

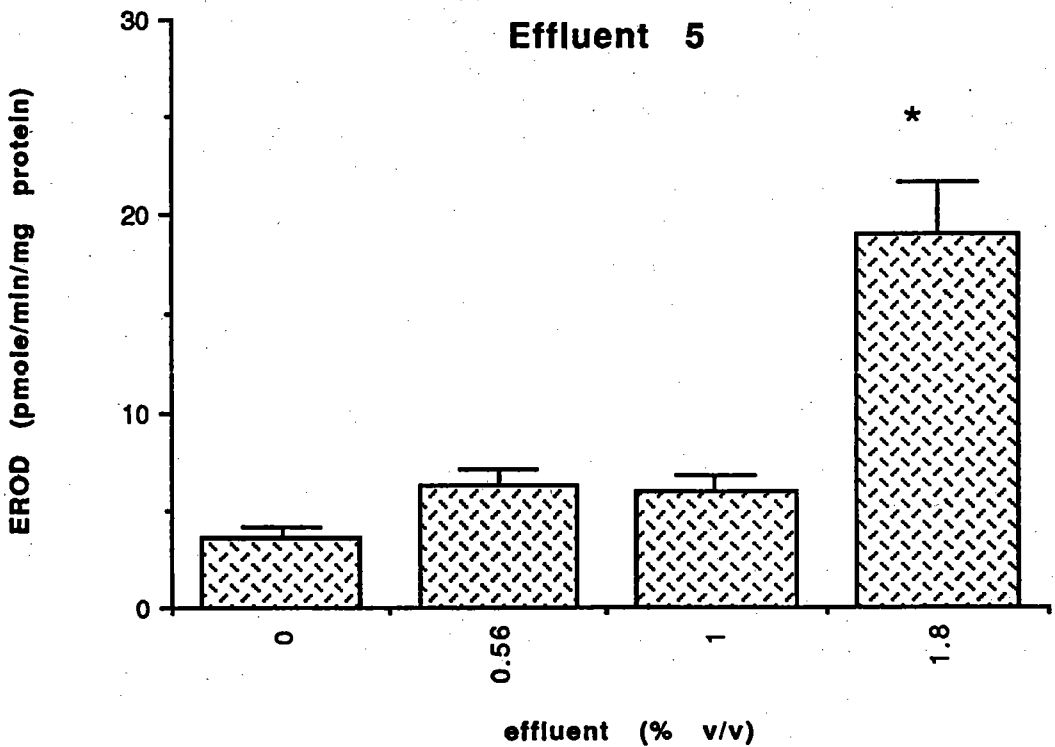
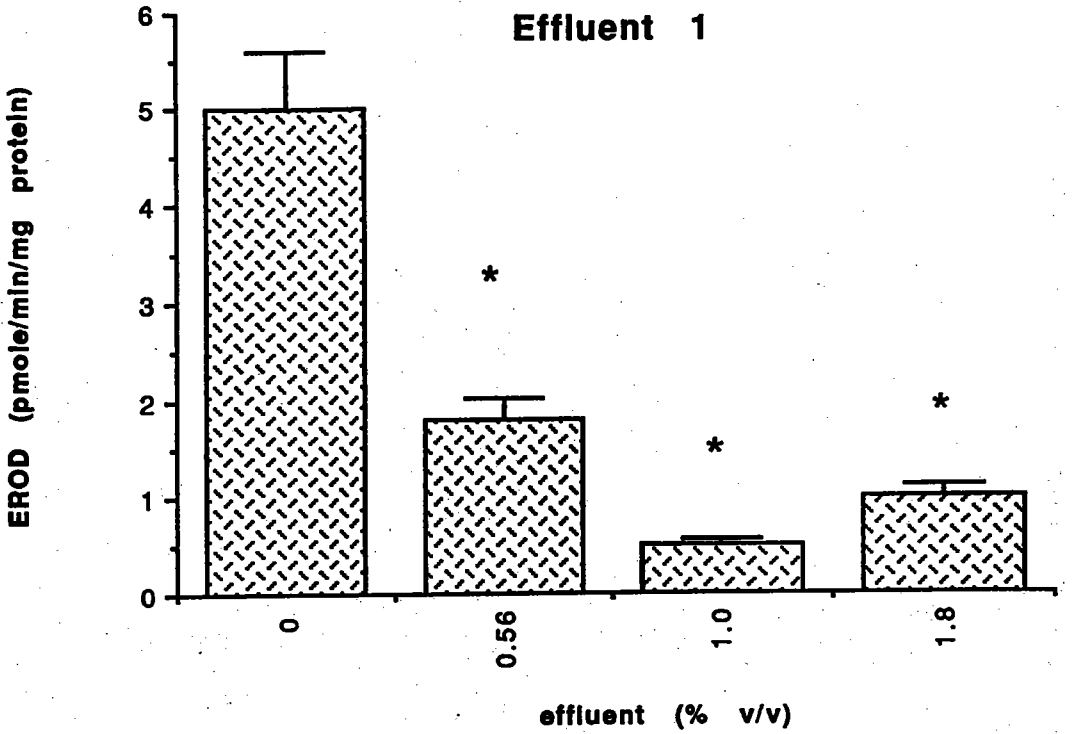


Fig. 3. Types of response patterns observed with EROD activity after acute exposure to sublethal effluent concentrations. Bars represent means ($n = 4$ replicates from each of 10 pooled livers) with SE. *Significant from controls (0%) at $P < 0.05$.

while exposure to 3-MC alone increased their activities (George and Young, 1986). Analogously, metal interferences may perhaps have contributed in depressing EROD activity, as observed with some of our effluents.

Antagonistic interference of fish detoxification systems purportedly due to industrial effluents was reported by Ahokas *et al.* (1976), where MFO activity was reduced in pike (*Esox lucius*) taken from a lake polluted by chemical and pulp and paper plants. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed for 7 weeks to BKME effluent had depressed EROD activity compared to controls (Lehtinen *et al.*, 1990); unusually high concentrations of resin acids in this effluent may have inhibited EROD in these fish. These same authors rightfully conclude that complex patterns of effects can occur when fish biotransformation enzymes are exposed to such effluents and that measured biochemical responses may well depend on the relative prevalence of MFO-stimulating and MFO-inhibiting substances at play. Results of the present study suggest that different categories of chemicals may be clashing in their combined effects on MT/MFO induction by the effluents studied and that future research efforts might consider (in)organic contaminant interactions. Clearly, our selection of only three sublethal concentrations to measure MT levels and MFO activity, based on acute lethality of the effluents, may have influenced the observed response patterns. Had MFO activity been measured at sublethal concentrations lower than those reported for effluent 1, for example, a normal dose-response pattern may have been recorded instead of significantly reduced activity (Table 1). Nevertheless, the above discussion illustrates some of the inherent difficulties linked to performing sublethal biochemical testing with complex effluents and supports the notion that future studies should attempt to report threshold effects concentrations, where the relative impact of various contaminants on MT or MFO measurements should, at least, be minimized.

CONCLUSIONS

Since MT and MFO systems are induced by specific classes of hazardous (in)organic pollutants (Varanasi *et al.*, 1981; Roch *et al.*, 1982; Neff, 1985; Hansen and Addison, 1990), whose introduction into aquatic systems is undesirable, eventual application of a sublethal bioassay measuring these two biochemical endpoints would seem to have value to screen, control and possibly even regulate the presence of particular xenobiotics in effluents. The present work has shown that fingerling rainbow trout can be employed in a cost-effective manner to monitor the presence of potentially hazardous classes of chemicals in pulp and paper effluents, by measuring hepatic MT and MFO induction levels following regulatory (96 h) acute lethality tests. Exposure to sublethal concentrations of 12 effluents, representative of varied mill

processes/treatments, elicited significant MT (all effluents) and MFO (9 effluents) induction. In this initial study, the limited use of three sublethal concentrations for biochemical measurements did not allow any conclusions to be drawn concerning mill process/treatment type and MT/MFO inductions. Future investigations capable of determining precise MT/MFO NOECs may be helpful in this regard. With such complex effluents, however, interferences owing to the simultaneous presence of inorganic and organic substances can affect the expression of specific biochemical induction responses. In this respect, further long-term research into contaminant interactions is required to unravel the significance of xenobiotic-mediated cause-effect associations that can either induce or depress specific isoforms of MTs and MFOs. In our laboratory, future work will focus on refining the combined (sub)lethal bioassay procedure described herein to measure precise MT and MFO NOECs for pulp and paper as well as for other types of industrial effluents. These additional investigations should help to determine whether this bioanalytical approach can be sufficiently validated to be useful for undertaking routine toxicological characterization of industrial effluents, the application of which could also prove beneficial for the regulatory community.

Acknowledgements—The authors thank the management of the Centre Saint-Laurent, Conservation and Protection, Environment Canada, Québec, for supporting this research. Technical support was provided by S. Thorn (fish bioassays), I. Jobin (metal analysis) and B. Beaumier (MT and MFO analyses).

REFERENCES

- Adams S. M., Shepard K. L., Greeley M. J. Jr, Jimenez B. D., Ryon M. G., Shugart L. R. and McCarthy J. F. (1989) The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Mar. envir. Res.* 28, 459-464.
- Addison R. F., Zinck M. E. and Willis D. E. (1981) Time- and dose-dependence of hepatic mixed function oxidase activity in brook trout *Salvelinus fontinalis* on polychlorinated biphenyl residues: implications for "biological effects monitoring". *Envir. Pollut. Ser. A* 25, 211-218.
- Ahokas J. T., Karki N. T., Oikari A. and Soivio A. (1976) Mixed function monooxygenase of fish as an indicator of pollution of aquatic environment by industrial effluent. *Bull. envir. Contam. Toxicol.* 16, 270-274.
- Andersson T., Bengtsson B. E., Förllin L., Hårdig J. and Larsson A. (1987) Long-term effects of bleached kraft mill effluents on carbohydrate metabolism and hepatic xenobiotic biotransformation enzymes in fish. *Ecotoxic. envir. Saf.* 13, 53-60.
- APHA, AWWA and WPCF (1989) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17th edition. American Public Health Association, Washington D.C.
- Bergman H. L., Kimerle R. A. and Maki A. W. (1986) *Environmental Hazard Assessment of Effluents*. Pergamon Press, New York.
- de Bethizy J. P. and Hayes J. R. (1989) Metabolism: a determinant of toxicity. In *Principles and Methods of Toxicology* (Edited by Hayes A. W.), 2nd edition. Raven Press, New York.
- Bitton G. and Dutka B. (1986) *Toxicity Testing Using*

- Microorganisms*, Vols I and II. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Blaise C. and Costan G. (1987) La toxicité létale aiguë des effluents industriels vis-à-vis de la truite arc-en-ciel. *Wat. Pollut. Res. J. Can.* **22**, 385-402.
- Blaise C., van Coillie R., Bermingham M. and Coulombe G. (1987) Comparaison des réponses toxiques de trois indicateurs biologiques (bactéries, algues, poissons) exposés à des effluents de fabriques de pâtes et papiers. *Rev. Int. Sci. Eau* **3**, 9-17.
- Blaise C., Trotter B., van Coillie R. and Couture P. (1986) Evaluation de la toxicité sublétales des effluents industriels vis-à-vis du poisson en mesurant l'ATP du muscle squelettique. *Wat. Pollut. Res. J. Can.* **21**, 71-90.
- Blaise C., Sergy G., Wells P., Bermingham N. and van Coillie R. (1988) Biological testing-development, application and trends in canadian environmental protection laboratories. *Toxic. Assess.* **3**, 385-406.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analyt. Biochem.* **72**, 249-251.
- Bremner I. and Mehra R. K. (1983) Metallothionein: some aspects of its structure and function with special regard to its involvement in copper and zinc metabolism. *Chem. Scr.* **21**, 117-121.
- Buhler D. R. and Williams D. E. (1988) The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. *Aquat. Toxic.* **11**, 19-28.
- Cherian M. G. and Nordberg M. (1983) Cellular adaptation in metal toxicology and metallothionein. *Toxicology* **28**, 1-5.
- Chevon M., Stegeman J. J., Plisach J. and Blumberg W. E. (1977) Electron paramagnetic resonance studies on hepatic microsomal cytochrome P-450 from a marine teleost fish. *Life Sci.* **20**, 895-900.
- Couillard D. (1980) Evaluation de la pollution et des répercussions des rejets des industries des pâtes et papiers sur la vie aquatique. *Sci. Total Environ.* **14**, 167-184.
- Dunns M. A., Blalock T. L. and Cousins R. J. (1987) Metallothionein. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **185**, 107-109.
- Eaton D. L., Stacey N. L., Wong K. L. and Klaassen C. D. (1980) Dose-response effects of various metal ions on rat liver metallothionein, glutathione, heme oxygenase, and cytochrome P-450. *Toxic. appl. Pharmacol.* **55**, 393-402.
- Elcombe C. R. and Lech J. J. (1978) Induction of monooxygenation in rainbow trout by polychlorinated biphenyls: a comparative study. *Environ. Health Perspect.* **23**, 309-314.
- Environment Canada (1987) Aquatic toxicity of pulp and paper mill effluent: a review. Conservation and Protection, Environment Canada, Ottawa. Report No. EPS 4/PF/1.
- Environment Canada (1990a) Biological test method, acute lethality test method using rainbow trout. Conservation and Protection, Environment Canada, Ottawa. Report No. EPS I/RM/9.
- Environment Canada (1990b) Biological test method, acute lethality using threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). Conservation and Protection, Environment Canada, Ottawa. Report No. EPS I/RM/10.
- Fabacher D. L. (1982) Hepatic microsomes from freshwater fish—II. Reduction of benzo(a)pyrene metabolism by the fish anesthetics quinaldine sulfate and tricaine. *Comp. Biochem. Physiol.* **73C**, 285-288.
- Fingerman S. W., Brown L. A., Lynn M. and Short C. S. (1983) Responses of channel catfish to xenobiotics: induction and partial characterization of a mixed function oxygenase. *Arch. environ. Contam. Toxicol.* **12**, 195-201.
- Förlin L., Andersson T., Bengtson B., Harding J. and Larsson A. (1985) Effects of pulp bleach plant effluents on hepatic xenobiotic biotransformation enzymes: laboratory and field studies. *Mar. environ. Res.* **17**, 109-112.
- Gagné F., Marion M. and Denizeau F. (1990) Metal homeostasis and metallothionein induction in rainbow trout hepatocytes exposed to cadmium. *Fund. appl. Toxic.* **14**, 429-437.
- Gallagher E. P. and Di Giulio R. T. (1989) Effects of complex waste mixtures on hepatic monooxygenase activities in brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*). *Environ. Pollut.* **62**, 113-128.
- George S. G. and Young P. (1986) The time course of effects of cadmium and 3-methylcholanthrene on activities of enzymes of xenobiotic metabolism and metallothionein levels in the plaice, *Pleuronectes platessa*. *Comp. Biochem. Physiol.* **83C**, 37-44.
- Hamer D. H. (1986) Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 913-951.
- Hamilton S. F. and Mehrle P. M. (1986) Metallothionein in fish: a review of its importance in assessing stress from metal contamination. *Trans. Am. Fish. Soc.* **115**, 596-609.
- Hamilton S. J., Mehrle P. M. and Jones J. R. (1987) Cadmium-saturation technique for measuring metallothionein in brook trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* **116**, 541-550.
- Hansen P. D. and Addison R. F. (1990) The use of mixed function oxidase (MFO) to support biological effects monitoring in the sea. Marine Environmental Quality Committee. Int. Council. Explor. Sea E: 33.
- Heath A. G. (1987) *Water Pollution and Fish Physiology*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Hodson P. V., McWhirter M., Ralph K., Gray B., Thivierge D., Carey J. H., Van der Kraak G., Whittle D. M. and Levesque M. C. (1992) Effects of bleached kraft mill effluent on fish in the St. Maurice River, Québec. *Environ. Toxic. Chem.* **11**, 1635-1651.
- Holmbom B. and Lehtinen K. J. (1980) Acute toxicity to fish of kraft pulp mill waste waters. *Paperi ja puu-Papper och trä* **11**, 673-684.
- Johannessen K. A. and De Pierre J. W. (1978) Measurement of cytochrome P-450 in the presence of large amounts of contaminating hemoglobin and methemoglobin. *Analyt. Biochem.* **86**, 725-732.
- Kovacs T. (1986) Effects of bleached kraft mill effluent on freshwater fish: a Canadian perspective. *Wat. Pollut. Res. J. Can.* **21**, 91-118.
- Kringstad K. and Lindström K. (1984) Spent liquors from pulp bleaching. *Environ. Sci. Technol.* **18**, 236A-248A.
- Leclerc H. and Dive D. (1982) Les tests de toxicité aiguë en milieu aquatique. *Inst. Nat. Santé Rech. Med.* **106**, 600 pp.
- Lehtinen K. J., Kierkegaard A., Jakobsson E. and Wändell A. (1990) Physiological effects in fish exposed to effluents from mills with six different bleaching processes. *Ecotoxic. environ. Saf.* **19**, 33-46.
- Lidman U., Förlin L., Molander O. and Axelson G. (1976). Induction of the drug metabolizing system in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) liver by polychlorinated biphenyls (PCBs). *Acta Pharmacol. Toxic.* **39**, 262-272.
- Lindström-Seppä P. and Oikari A. (1989) Biotransformation and other physiological responses in whitefish caged in a lake receiving pulp and paper mill effluents. *Ecotoxic. environ. Saf.* **18**, 191-203.
- Lindström-Seppä P. and Oikari A. (1990) Biotransformation activities of feral fish in waters receiving bleached pulp mill effluents. *Environ. Toxic. Chem.* **9**, 1415-1424.
- Litchfield J. T. Jr and Wilcoxon F. (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **96**, 99-103.
- Maines M. D. and Kappas A. (1976) Studies on the mechanism of induction of haem oxygenase by cobalt and metal ions. *Biochem. J.* **154**, 125-131.
- Mather-Mihaich E. and Di Giulio R. T. (1991) Oxidant, mixed function oxidase and peroxisomal responses in channel catfish exposed to a bleached kraft mill effluent. *Arch. environ. Contam. Toxicol.* **20**, 391-397.
- Melançon M. J., Turnquist K. A. and Lech J. J. (1989) Relation of hepatic microsomal monooxygenase activity

- to tissue PCB's in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) injected with [¹⁴C] PCB's. *Envir. Toxic. Chem.* **8**, 77-782.
- Miranda C. L., Wang J. L., Henderson M. C. and Buhler D. R. (1990) Immunological characterization of constitutive isozymes of cytochrome P-450 from rainbow trout. Evidence for homology with phenobarbital-induced rat P-450s. *Biochem. biophys. Acta* **1037**, 155-160.
- Munawar M., Dixon G., Mayfield C. I., Reynoldson T. and Sadar M. H. (eds) (1989) *Environmental Bioassay Techniques and Their Application*; (*Hydrobiologia* 188/189). Kluwer, The Netherlands.
- Munkittrick K. R., Portt C. B., van der Kraak G. J., Smith I. R. and Rokosh D. A. (1991) Impact of bleached kraft mill effluent on population characteristics, liver MFO activity, and serum steroid levels of a Lake Superior white sucker (*Catostomus commersoni*) population. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **48**, 1371-1380.
- Neff J. M. (1985) Use of biochemical measurements to detect pollutant-mediated damage to fish. In *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium ASTM STP 854* (Edited by Cardwell R. D., Purdy R. and Bahner R. C.), pp. 155-183. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pa.
- Nims R. W., Prough R. A. and Lubet R. A. (1984) Cytosol-mediated reduction of resorufin: a method for measuring quinone oxydoreductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **229**, 459-465.
- OECD, Organisation for Economic Cooperation and Development (1987) The use of biological tests for water pollution assessment and control. Environment Monographs No. 11.
- Oikari A., Lindström-Seppä P. and Kukkonen J. (1988) Subchronic metabolic effects and toxicity of a simulated pulp mill effluent on juvenile lake trout, *Salmo trutta m. lacustris*. *Ecotoxic. envir. Saf.* **16**, 202-218.
- Payne J. F. (1984) Mixed function oxygenases in biological monitoring programs: review of potential usage in different phyla of aquatic animals. In *State University of Ghent and Institute of Marine Scientific Research* (Edited by Persoone G., Jaspers E. and Claus C.), Vol. 1, pp. 625-655. Bredene, Belgium.
- Persoone G., Jaspers E. and Claus C. (Eds) (1984) *Ecotoxicological Testing for the Marine Environment. State University of Ghent and Institute for Marine Scientific Research*, Vols I and II. Bredene, Belgium.
- Price-Haughhey J., Bonham K. and Gedamu L. (1986) Heavy metals induced gene expression in fish and fish cell lines. *Envir. Hlth Perspect.* **65**, 141-147.
- Prough R. A., Mayer R. T. and Burke M. D. (1978) Direct fluorometric method for measuring mixed function oxidase activity. *Drug Metabol. Disp.* **5**, 1-8.
- Roch M., Noonan P. and McCarter J. A. (1986) Determination of no effect levels of heavy metals for rainbow trout using hepatic metallothionein. *Wat. Res.* **20**, 771-774.
- Roch M., McCarter J. A., Mathieson A. T., Clark M. J. R. and Olafson R. W. (1982) Hepatic metallothionein in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as an indicator of metal pollution in the Campbell river system. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **39**, 1596-1601.
- Scheuhammer A. M. and Cherian M. G. (1986) Quantitation of metallothioneins by a silver saturation assay. *Toxic. appl. Pharmacol.* **82**, 417-421.
- Sinderman C. (1988) Biological indicators and biological effects of estuarine/coastal pollution. *Wat. Resour. Bull.* **24**, 931-939.
- Smith I. R., Portt C. B. and Rokosh D. A. (1991) Hepatic mixed function oxidases induced in populations of white sucker, *Catostomus commersoni*, from areas of Lake Superior and the St. Mary's River. *J. Grt Lakes Res.* **17**, 382-393.
- Smolowitz R. M., Hahn M. E. and Stegeman J. J. (1991) Immunohistochemical localization of cytochrome P-450 IA1 induced by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in liver and extrahepatic tissues of the teleost *Stenotomus chrysops* (scup). *Drug Metabol. Disp.* **19**, 113-123.
- Södergren A. (1987) Biological effects of effluents from pulp mills: preliminary results from the Swedish environment/cellulose project. *Paperi ja Puu-Papper och trä* **5**, 422-426.
- Sprague J. B. (1990) *Aquatic Toxicology. Methods for Fish Biology* (Edited by Schreck C. B. and Moyle P. B.). American Fisheries Society, Bethesda, Md.
- US Environmental Protection Agency (1982) Methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater. National Technical Information Service, Cincinnati, Ohio, Report No. PB83-201798.
- Varanasi V., Stein J. E. and Hom T. (1981) Covalent binding of benzo[a]pyrene to DNA in fish liver. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **102**, 780-787.
- Vezeau R. (1982) Protocoles d'échantillonnage, de préservation et de préparation des échantillons pour l'analyse des polluants prioritaires. Environnement Canada, Service de la Protection de l'Environnement, Région du Québec, Montréal.
- Vindimian E. and Garric J. (1989) Freshwater fish cytochrome P-450-dependent enzymatic activities: a chemical pollution indicator. *Ecotoxic. envir. Saf.* **18**, 277-285.
- Vodičnik M. J., Elcombe C. R. and Lech J. J. (1981) The effects of various types of inducing agents on hepatic microsomal monooxygenase activity in rainbow trout. *Toxic. appl. Pharmacol.* **59**, 364-374.
- Wells P. C. and Moyle C. (1981) A selected bibliography on the biology of *Salmo gairdneri* Richardson (Rainbow, Steelhead, Kamloops trout), with particular reference to studies with aquatic toxicants. Environment Canada, Environmental Protection Service, Economic and Technical Review Report EPS-3-AR-81-1.

Article 2

FLOW CYTOMETRY MEASUREMENT OF MIXED
FUNCTION OXIDASE (MFO) ACTIVITY
AND CELL VIABILITY
IN RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)
HEPATOCYTES : METHOD DEVELOPMENT.

François Gagné and Christian Blaise*

Centre Saint-Laurent, Service de Conservation de
l'Environnement, Environnement Canada, 105 rue McGill,
Montréal, QUE. Canada, H2Y 2E7

*author to whom correspondence should be addressed.

Short title: Flow cytometry MFO/viability measurements in
trout hepatocytes.

Abstract

The development of a short term flow cytometric assay procedure measuring cellular mixed function oxidase (MFO) activity and cell viability in primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes was undertaken. Various experiments were performed to optimize the test procedure and to study factors potentially able to influence endpoint measurements. Among these, MFO activity enzyme reaction rate assays conducted with live hepatocytes (50×10^4 cells.mL⁻¹) incubated at 22°C in the presence of 5(6) methoxycarbonyl fluorescein methyl ether methyl ester (MCF) substrate enabled optimal enzyme-substrate reaction conditions to be fixed at 30 μM MCF for a 20 min period. Experiments conducted with hepatocytes subjected to cell volume changes by varying their buffer medium osmolarities showed that the intensity of flow cytometry-analyzed propidium iodide (PI) dye fluorescence, our chosen indicator of cell viability, was influenced by volume change, but that MFO-related fluorescence was unaffected. Other experiments indicated that simultaneous flow cytometric analysis of cell viability and MFO activity is possible, as long as interferences of MFO activity fluorescence emission on cell viability fluorescence emission can be resolved. Exposure of hepatocytes (48 h, 15°C) to known inducers (β-NF and BaP) of fish cytochrome P-450 detoxification systems demonstrated significant expression of MFO activity as measured with the flow cytometry procedure developed. Further validation of the endpoints measured with this procedure is in progress and involves comparisons with

similar endpoints (96 h-LC50 and EROD activity) determined with fingerling rainbow trout exposed to industrial wastewaters.

Key words: trout hepatocytes, flow cytometry, MFO activity, viability, method development.

INTRODUCTION

An issue of concern facing today's world is that dealing with the plethora of xenobiotics which enter aquatic systems, either singularly or in mixtures, via (non)point pollution sources. As major producers of mixed contaminants, industrial effluents, for example, are notoriously recognized for the (sub)lethal effects they can exert on (micro)organisms exposed in laboratory-based bioassays and on receiving water biota (Bergman et al., 1986; Blaise et al., 1988; Garric et al., 1993; OECD, 1987).

While multitrophic testing is clearly needed for proper assessment of anthropogenically-derived ecotoxic effects, fish bioassays continue to act as important environmental sentinels (Heat, 1987; Sprague, 1990). Whether for undertaking monitoring, compliance or regulation, Canada, for one, still relies heavily on trout lethality assays to appraise flagrant effluent toxicity potential (Environment Canada, 1990). The United States, as well as other countries, also carry out extensive sublethal testing with fish (Dave et al., 1987; US EPA, 1989; van de Guchte et al., 1989).

In our laboratory, we have recently developed a combined (sub)lethal bioassay procedure that allows measurement of lethality and hepatic mixed function oxidase (MFO) activity in rainbow trout acutely exposed to industrial effluents (Gagné and Blaise, 1993). Measurement of a lethal endpoint in fish certainly needs no justification, and neither does measuring a relevant sublethal end-

point involving the cytochrome P-450-dependent MFO enzymatic system. Indeed, cytochrome P-450 IA1, a specific cytochrome P-450 isozyme in fish livers, catalyzes 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) which responds specifically to planar organic compounds including polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, chlorinated dibenzo dioxins and furans (Hansen and Addison, 1990). Measuring induced hepatic cytochrome P-450 levels and EROD activity in fish can thus signal exposure to certain classes of hazardous molecules.

While this concomitant (sub)lethal bioassay procedure is undoubtedly useful to evaluate liquid wastes (Gagné and Blaise, 1993), it has not dulled our interest to search for a more practical alternative test, which could augment analytical output and yet reduce cost, time, sample volume as well as animal sacrifice. In this respect, cell systems (*in vitro* bioassays) are becoming increasingly popular for toxicity evaluations of chemicals (Babich and Borenfreund, 1987; Fentem and Balls, 1993), and appear to possess many of the desirable characteristics attributed to small-scale tests (Baksi and Frazier, 1990; Blaise, 1991). Several fish cell line models (e.g. RTG-2 gonadal fibroblast cells and RTH-149 hepatoma cells in rainbow trout; BF-2 bluefish fin cells; BB brown bullhead catfish and GFS goldfish scale cells) have already been employed for toxicological investigations of xenobiotics (Babich and Borenfreund, 1990; Saito et al., 1991). Using such cell lines is certainly cost-efficient and insures a continuous supply of testing material. Some tissue-specific characteristics, however,

can be attenuated or lost with cell cultures grown over long periods of time. This may raise questions, therefore, as to whether their responses to toxicants actually mimic those of differentiated cells found in whole organisms. In contrast, primary hepatocytes more closely match the characteristics of the *in vivo* hepatic tissue, are key players in metabolic transformation of chemicals, and are often the target of chemical insults (Baksi and Frazier, 1990). For these reasons, we have selected rainbow trout primary hepatocytes as the tissue of choice in our quest for developing a practical cell-based test capable of assessing mortality and MFO activity after exposure to chemical solutions and miscellaneous liquid matrices.

Because of the unique fluorescence and light scattering properties offered by flow cytometry to measure single cell (sub)lethal end-points (Shapiro, 1988), we have employed this instrumental technology in the work described herein. Our research objectives sought therefore to a) develop an efficient and relevant short term assay to measure viability and MFO activity in rainbow trout primary hepatocytes with the help of flow cytometry after their exposure to toxicants present in liquid samples, and b) to compare results generated with this cellular model to those obtained for similar (sub)lethal parameters with fingerling rainbow trout (Gagné and Blaise, 1993) after exposure to a representative cross-section of complex industrial effluents. In the event that the cellular model should indicate good correlation with the whole organism assay, the former could then be recommended as an

appropriate adjunct or alternative to the latter. In this paper, we report on the first objective dealing with the methodological development of the primary hepatocyte test to measure cell viability and MFO activity with flow cytometry.

Materials and Methods

Chemicals

Phosphate buffered saline (PBS), calcium chloride, β -naphthoflavone (β -NF), benzo-[a]-pyrene (BaP), bovine serum albumin (BSA), collagenase type IV, foetal bovine serum (FBS), tricaine methane sulfonate, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), gentamycin sulfate, trypan blue, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ethylene-glycol-bis-amino ethyl ether N,N'-tetra acetic acid (EGTA), minimum essential medium (MEM), dimethyl sulfoxide (DMSO), tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) and 7-ethoxy-3H-phenoxazin-3-one (resorufin) were purchased from Sigma Chemical Company. Chemicals obtained from Molecular Probes, Inc. included 7-ethoxy-3H-phenoxazin-3-one ethyl ether (7-ethoxyresorufin), 5(6)methoxycarbonylfluorescein methyl ether methyl ester (MCF) and propidium iodide (PI).

Hepatocyte preparation

Primary cultures of yearling rainbow trout (10-15 cm; 40-60 g)

were prepared according to the double perfusion method of Klauning et al. (1985) with some modifications. The portal vein was first perfused with a pH 7.5 PBS medium (without calcium and magnesium) containing 1 mM EGTA. The liver was then perfused with 25 mL of collagenase ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in PBS medium with 1 mM CaCl_2), removed from the abdominal cavity, cut into small slices and mixed in a 50 mL collagenase solution for 15 min at room temperature. Liver cells were freed from tissue with a cell dissociation sieve kit (Sigma) and washed 5 times by successive centrifugation (300 g, 2 min) and resuspension in sterile PBS containing 1 mM glucose, 0.3 mM pyruvate, $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ gentamycin, $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ amphotericin and $2 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA. Cells were counted with a hemocytometer and their viability was estimated by the trypan blue exclusion test (Klauning et al., 1985). Based on $n = 15$ trout livers, cell yield was typically $2.3 (\pm 0.5) \times 10^6$ cells $\cdot\text{g}^{-1}$ body weight with a viability of $93 \pm 2\%$. Hepatocytes were finally resuspended in 4 mL of sterile MEM containing 1% FBS, $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ gentamycin sulfate and $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ amphotericin B. For cell inoculation in toxicant exposure experiments, hepatocytes from four trout were commonly pooled.

Exposure to selected chemicals

Hepatocytes were distributed in 24-well microplates (Nalgene: cell culture treated) at a density of 1×10^6 viable cells $\cdot\text{mL}^{-1}$ of MEM as described above. They were exposed to 400, 800, 1000 and 1600 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of Cd^{2+} from $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, 0.01, 0.05, 0.1 and 0.5% butanol, 0.1, 0.4, 1 and $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ β -NF and 50, 100, 200 and $300 \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ BaP.

The latter two compounds were dissolved in DMSO whose concentration was fixed at 0.1% for both control and β -NF or BaP containing wells during exposure experiments. Exposure time was fixed at 48 h (15°C) in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Mixed function oxidase (MFO) activity experiments

Flow cytometry analysis of MFO activity (described below) was performed according to Miller (1983), with the exception that we used the methoxy analogue of the substrate (MCF) instead of the ethoxycarboxyfluorescein ethyl ether ethyl ester analogue (ECF). Apparent cellular affinity constants (K_M and V_{MAX}) were determined by incubating 50×10^4 hepatocytes with increasing amounts of MCF substrate for 30 min at 22°C. Optimal enzyme-substrate incubation time was ascertained by exposing an equal number of hepatocytes to 30 μ M of MCF for 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min at 22°C.

The intracellular distribution of hepatocyte MFO activity was also explored in PBS cell homogenate, S_{10} supernatant (10000 g, 20 min, 2°C), as well as in the cytosol (supernatant) and microsomal fraction (pellet) resulting from S_{10} supernatant centrifugation (105000 g, 90 min, 2°C). Aliquots of the S_{10} fraction (25 μ L) were kept for protein analysis using serum bovine albumin as standard (Bradford, 1976). MFO activities (expressed as fluorescence units per min per mg protein) were measured after incubating respective cell compartments (20 min, 22°C) with 30 μ M MCF in the presence of 0.5 mM NADPH with a spectrofluorometer (Hitachi model F-3010).

Excitation wavelength was 488 nm (bandpass 5 nm) and emission was measured at 520 nm (bandpass 10 nm).

Cells exposed to selected chemicals (see above) were washed once in PBS containing 1mM EDTA by centrifugation at 100 g for 2 min, resuspended in the same medium at a density of 1×10^6 cells.mL⁻¹ and kept on ice at 4°C for 15 min. A subsample (50×10^4 cells.mL⁻¹) was then incubated (20 min, 22°C) in the presence of 30 μ M of MCF substrate containing 1 mM glucose, 0.3 mM pyruvate and 1 mM EDTA. As earlier experiments had shown, this concentration of EDTA had no significant effect on MFO activity. Afterwards, the cells were analyzed by flow cytometry.

Viability measurements

Cell viability was assayed by flow cytometry using the PI exclusion test (Zucker et al., 1988). After hepatocytes had been exposed to selected chemicals, a subsample of washed cells (50×10^4) was incubated in the presence of 10 μ g.mL⁻¹ of PI in PBS for 10 min at room temperature. Flow cytometry analysis then proceeded as described below. In cases where simultaneous measurement of MFO activity and cell viability was attempted, the MCF substrate was added with the PI dye to cells in PBS containing 1 mM EDTA. Incubation time and temperature were then those prescribed for MFO activity determinations.

Osmolarity effects on MFO activity and cell viability

In order to investigate the potential effects that cell volume changes might have on MFO activity and cell viability, measurement of these two parameters was performed under different osmolarities. Trout hepatocytes were incubated with 30 μM of MCF or PI (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 20 min in PBS media having osmolarities of 100, 200, 300, 400 and 500 mOsmol. Osmolarity was adjusted with sterile 1M NaCl (pH 7.3).

Flow cytometry analyses

Hepatocyte MFO activity and viability were measured with the help of a Becton Dickinson FACScan flow cytometer. This instrument is equipped with an analytical flow cell (430 X 180 μ) and a 15 mW argon (blue) laser emitting at 488 nm. Volume flow rate was kept constant at circa 60 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ during data acquisition. For each measurement, data from 5000 gated cells were recorded, stored and eventually analyzed with Lysis II software. Fenestration (gating) with forward scatter (FSC: an indirect measure of cell volume and refractive index) and side scatter (SSC: an indirect measure of internal structure) of laser light was first employed to isolate the hepatocyte population from smaller particles. For this purpose, the FSC detector was set at -1 exponential (log scale) and the SSC detector was set at 175 V (log scale).

In preparation for MFO activity measurements, the flow cytometer fl-1 detector (fluorescein emission detection at 500-550 nm) was set at 250 V with channel number set at 1024 for maximum resolution. Following their 20 min incubation with MCF substrate,

hepatocytes were aspirated into the cytometer and counted. Cell data were then visualized in a histogram plot (cell numbers *versus* fl-1 fluorescein fluorescence emission). Control (unexposed) cells were used for gating such that any shift in cells displaying increased green fluorescence resulting from MCF demethylation owing to MFO induction could be measured.

For cell viability measurement, the fl-3 detector (DNA-PI complex fluorescence emission detection at 620 nm) was set at 250 V with channel number set at 1024 for maximum resolution. Following their 10 min incubation with PI dye, hepatocytes were aspirated into the cytometer and counted. Cell data were then visualized in a histogram plot (cell numbers *versus* fl-3 red fluorescence from PI). Control (unexposed) cells were used for gating such that any shift in cells displaying increased red fluorescence resulting from PI complexation on DNA owing to decreased viability could be measured.

When simultaneous measurement of MFO activity and cell viability was attempted, fl-1 (green fluorescence resulting from MCF demethylation) and fl-3 (red fluorescence resulting from DNA-PI complexation) detectors were set as described before. After hepatocyte aspiration and analysis, cell data were displayed in a two-dimensional (fl-1 *versus* fl-3) dot-plot (not shown in this article). Gates were then constructed to differentiate viable from dead cells, as well as to show MFO activity induction shifts in viable cell populations.

Data analysis

Hepatocytes exposed to selected chemicals were assayed with four replicates for each test concentration. Data were appraised by analysis of variance and critical differences between controls and treatments were determined by Dunnett's *t*-test ($P < 0.05$). Apparent cellular Michaelis-Menten constants (K_m and V_{max}) were derived from the linear regression model ($y = ax + b$).

Results and Discussion

MFO activity and PI viability measurements in trout hepatocytes

As an opening remark to this section, it is important to recall that the MCF substrate diffuses into cells where it is demethylated to dicarboxyfluorescein (Haugland, 1992) by dealkylation systems present in the microsomal fraction where cytochrome P-450s abound. To demonstrate that MFO activity induction had indeed occurred following exposure of hepatocytes to selected toxicants, it was essential to measure this parameter in viable cells which had not been too severely impacted. Obviously, cells agressed enough to cause general protein synthesis breakdown would not allow expression of the MFO enzymatic system. The PI exclusion test, therefore, was doubly useful in that it measured cell viability (by discriminating dead from living cells) and also enabled us to isolate (by proper gating) viable cells from which MFO activity could be measured. A first (visual) glimpse of how flow cytometry can assess cell viability and MFO activity is given in Fig. 1. Exposure of hepatocytes to Cd^{2+} causes a frequency shift in fluorescence (increase in cell mortality) in relation to unexposed cells (Fig. 1A). A similar frequency shift (increase) in fluorescence, following hepatocyte exposure to β -NF, a known inducer of cytochrome P-450 1A1, indicates greater MFO activity induction in relation to unexposed cells (Fig. 1B).

Quantitative estimations for detecting induction/repression of

hepatocyte MFO activity demanded that Michaelis-Menten enzymatic reaction rate parameters (K_m and V_{max}) be elucidated for our flow cytometry protocol. Fig. 2 shows the Michaelis-Menten (A) and Lineweaver-Burk (B) representation of MFO activity kinetics measured on non treated live hepatocytes. K_m (apparent affinity constant of the MFO enzymatic system for live cells) was determined to be $2.7 \mu\text{M}$ with a $V_{max} = 15.43$ fluorescence units.min⁻¹ (= conversion of MCF substrate per min). Since substrate concentration must be in excess for an enzymatic reaction to be optimal ("state of equilibrium"), it is known that non limiting reaction rates are insured when substrate concentration is at least five times the K_m value. We therefore chose $30 \mu\text{M}$ ($= 11.1 \times K_m$) as the optimal concentration of MCF substrate to measure MFO activity for our procedure. Our MCF substrate/hepatocyte-derived K_m value ($2.7 \mu\text{M}$) is more than one order of magnitude higher than that (144 nM) derived for EROD activity in unexposed rainbow trout (Elcombe and Lech, 1979). Several factors can explain this discrepancy. Although they share similarities, as suggested by Miller (1983), MCF and 7-ethoxyresorufin constitute different substrates. Also, the cellular environment in relation to substrate accessibility (e.g. influx-efflux equilibrium and non specific binding) is dissimilar. Rate limiting intracellular concentrations of NADPH and oxygen, as well as incubation temperature at which affinity constant was derived (22°C for hepatocytes, 30°C for trout), are other important factors. On this last point, we chose 22°C for our MFO activity protocol, since temperatures over 25°C are generally incompatible with trout hepatocyte metabolic integrity and viability (Klauning et al.,

1985). Conducting a specific study on optimal temperature in relation to MCF substrate MFO kinetics, albeit interesting, was clearly beyond the scope of our present study. With our chosen 30 μM of MCF substrate, demethylation was observed to be linear up to 25 min and tended to decelerate beyond this time (Fig. 3). Collectively, the preceding experiments therefore enabled us to fix optimal reaction conditions for measuring MFO activity in hepatocytes as follows: 50×10^4 cells. mL^{-1} , 30 μM MCF substrate, 20 min incubation period.

As part of this methodological development, we also wished to verify cytochrome P-450 specificity toward the MCF (methoxy-based) substrate for trout hepatocytes, since the ethoxy analogue of MCF had originally been used and reported by Miller (1983) to be an MFO activity inducer. An experiment was thus conducted in which various intracellular compartments were assayed for their MFO activity induction potential. Table 1 demonstrates MFO activity responses for different cell compartments in the presence of 0.5 mM NADPH. Marked activity was found in microsomes where cytochrome P-450s are principally located. These results confirm the adequacy of the methoxy-based MCF substrate to measure MFO activity in hepatocytes and further suggest that enzyme activity is concentrated in endoplasmic reticulum (or other subcellular membranes) where cytochrome P-450s abound. It is possible that MFO activity might also be present in the mitochondrial fraction, but we did not investigate this directly.

To estimate the possible effects that cell volume changes might have on MFO activity and cell viability, hepatocytes were

treated with PBS media of different osmolarities (Fig. 4). The rationale for conducting such an experiment is based on the fact that cell blebbing (i.e. appearance of foam-like blisters or protuberances on cell membranes) and cell volume fluctuations can occur during toxic aggression. The impact that cell volume changes might have on PI incorporation as a measure of cell viability can be simulated by modifying the osmolarity of cell media. Results first indicated, as expected, that cell volume, indirectly measured by forward light scatter or FSC (Zucker et al., 1988), decreased with increasing osmolarity. Second, MFO activity was not affected by hypo- or hypertonic PBS treatments during incubation with the MCF substrate. Fluorescence from PI-treated cells for viability estimation, however, was reduced with increasing osmolarity from 100 up to 400 mOsm and started to increase again at 500 mOsm. Hence, cell volume changes can have a direct effect on the PI fluorescence of hepatocytes. Result interpretation is likely that larger cells intake more PI dye allowing greater binding with double-stranded RNA or DNA to take place, which enhances their fluorescence emission. In contrast, less PI dye penetrates smaller cells resulting in lower fluorescence. Fig. 4 data therefore suggest that PI cell viability measurements should be corrected against changes in cell volume following hepatocyte toxicity testing exposures. Such a correction can be applied if changes in the forward light scattering properties of hepatocytes (FSC) occur after treatment exposure.

The possibility of measuring cell viability and MFO activity simultaneously to increase flow cytometric analytical time

efficiency was investigated (Fig. 5). Post-incubation MFO activity measurements were unaffected by the simultaneous presence of PI dye and MCF substrate in hepatocytes (condition 3 versus condition 5 in Fig. 5). Under the same conditions however, the cell viability parameter showed a slight but significant increase in fluorescence, indicating a spillover of green (fl-1) MCF-related fluorescence into the red (fl-3) PI-related fluorescence. This interference of fl-1 fluorescence on fl-3 fluorescence did not appear time-related (condition 2 versus condition 3), since PI-related fl-3 fluorescence is similar at $t = 0$ min and $t = 20$ min. Additional evidence of MCF-related fluorescence interference on PI-related fluorescence can be observed by comparing condition 1 with conditions 2 and 3, respectively. We found that this slight fl-1 fluorescence overlap into fl-3 fluorescence can be eliminated by circuitry compensation adjustments made to the fl-3 detector. Hence, with fine-tuning of the flow cytometer, simultaneous analysis of cell viability and MFO parameters can certainly be envisaged in eventual routine applications of this methodology to optimize sample throughput.

Effects of selected chemicals

on MFO activity

In preliminary trials which served to establish the use of rainbow trout primary hepatocytes in our laboratories, we had established that cell culture could be maintained for up to 70 h at 15°C without significant loss of viability (results not shown).

These same trials demonstrated that decrease in hepatocyte MFO activity was less pronounced during the first 48 h of incubation. These findings are in agreement with those of Lorenzen and Okey (1990) who reported that hepatocytes retain their capacity to induce cytochrome P-450IA1 for several days by maintaining the Ah ("Aromatic hydrocarbon") receptor, which is central in the mechanism of induction of the P-450IA1 isoform in trout and other cell systems. A test exposure period of 48 h was thus retained as one which would ensure excellent cell viability as well as adequate MFO activity.

β -NF and BaP, two well-known polycyclic aromatic hydrocarbon inducers of the MFO system in trout liver and hepatocytes (Buhler and Williams, 1988; Elcombe and Lech, 1979; Pesonen et al., 1992), were used to test the ability of our flow cytometric methodology to display MFO activity induction. Significant induction, reflected by more cells with higher fluorescence, was indeed measured as a result of hepatocyte exposure to both compounds (Table 2). While MFO activity induction measurement is evident, the specificity of the MCF substrate toward the P-450IA1 or P450IA2 isoform remains to be established. The ethoxy analogue of MCF initially used by Miller (1983) is believed to show specificity for aromatic hydrocarbons in general, corresponding to P-450IA1 induction, but it is not known if the methoxy analogue of MCF we employed behaves similarly. At this time, our results suggest a definite specificity toward β -NF/BaP-like molecules, but more fine-tuned experiments with reconstituted P-450 systems or cytochrome P-450 isoform-specific antibodies would be required to unambiguously confirm the

specificity of the MCF substrate toward P-450IA1. In contrast, butanol (as well as ethanol: results not shown) did not elicit induction of MFO activity (Table 2). As expected, exposure of hepatocytes to cadmium inhibited or decreased their MFO activity (Table 2). For example, metals such as cadmium have been reported to reduce total levels of cytochrome P-450 in rat livers (Eaton et al., 1980). A more recent study has also shown that plaice (*Pleuronectes platessa*) exposed simultaneously to cadmium and 3-methylcholanthrene (3-MC) showed decreased P-450 and EROD activities (George and Young, 1986), indicating, in this case, the antagonistic effects of this metal on a marine fish cytochrome P-450 detoxification system.

On-going work with complex industrial effluent samples is exploring comparisons of fingerling rainbow trout 96 h-LC50 and hepatic EROD measurement endpoints with the primary hepatocyte 48 h cell viability and MFO endpoints reported in the present article. Thus far, effluents displaying measurable endpoint responses to trout are also eliciting measurable responses with our hepatocyte procedure. A future article will therefore focus on the comparative results generated with this cellular model and those obtained for similar (sub)lethal parameters with fingerling rainbow trout after exposure to a representative cross-section of complex industrial effluents.

Conclusions

As stated earlier, the main objective of the work presented herein concerned the methodological development of a rainbow trout primary hepatocyte test to measure cell viability and MFO activity with flow cytometry. Enzyme kinetic experiments conducted with 5(6) methoxycarbonyl fluorescein methyl ether methyl ester (MCF) substrate first enabled us to optimize reaction conditions for measuring MFO activity in trout primary hepatocytes. These called for the exposure of 50×10^4 cells.mL⁻¹ to 30 μ M of MCF substrate during a 20 min incubation period at 22°C. Afterwards, hepatocyte cytochrome P-450 specificity toward the MCF substrate was confirmed by demonstrating marked MFO activity increases when the microsomal fraction was incubated in the presence of MCF. Effects of cell volume changes on MFO activity and cell viability were also investigated by treating hepatocytes with PBS media of varying osmolarities. PI dye fluorescence, our chosen indicator of cell viability, was shown to vary according to cell volume changes. PI cell viability measurements can be corrected for such changes, however, by examining the forward light scattering properties of hepatocytes (Forward light scatter or "FSC" is an indirect measure of cellular volume appraised by flow cytometry) following their exposure to treatment samples. Further experiments revealed that simultaneous flow cytometric analysis of cell viability and MFO activity is conceivable, so long as instrumental circuitry can be fine-tuned to minimize the interference of fl-1 fluorescence

emission (indicative of MFO activity) on fl-3 fluorescence emission (indicative of cell viability). Finally, exposure of hepatocytes to β -NF and BaP, two notorious inducers of fish cytochrome P-450 detoxification systems, resulted in significant expression of MFO activity as measured by flow cytometric analysis. Work is presently underway to compare the hepatocyte endpoints (cell viability and MFO activity) of this study with similar endpoints (96 h-LC50 and EROD activity) determined with fingerling rainbow trout following exposure trials undertaken with various types of industrial wastewaters.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to the management of the Centre Saint-Laurent, Conservation Service, Environment Canada, Québec Region, for supporting this research initiative.

REFERENCES

- Babich H. and Borenfreund E. 1987. Cultured fish cells for the ecotoxicity testing of aquatic pollutants. *Toxic. Assess.*, 2: 119-133.
- Babich H. and Borenfreund E. 1991. Cytotoxicity/genotoxicity assays with cultured fish cells: a review. *Toxic. in vitro* 5: 91-100.
- Baksi S. M. and Frazier J. M. 1990. Isolated fish hepatocytes - model systems for toxicology research. *Aquat. Toxic.*, 16: 229-259.
- Bergman H.L., Kimerle R.A. and Maki A.W. 1986. Environmental hazard assessment of effluents. Pergamon Press, New York, USA.
- Blaise C., Sergy G., Wells P., Bermingham N. and van Coillie, R. 1988. Biological testing-development, application and trends in canadian environmental protection laboratories. *Toxic. Assess.*, 3: 385-406.
- Blaise C. 1991. Microbiotests in aquatic ecotoxicology: characteristics, utility and prospects. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 6: 145-155.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the

quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-251.

Buhler D. R. and Williams D. E. 1988. The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. *Aquat. Toxic.* 11: 19-28.

Dave G., Damgaard B., Grande M., Martilin J.E., Rosander B. and Viktor T. 1987. Ring test of embryo larval toxicity test with zebrafish *Brachydanio rerio* using chromium and zinc as toxicants. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1: 61-71.

Eaton D. L., Stacey N. L., Wong K. L. and Klaassen C. D. 1980. Dose-response effects of various metal ions on rat liver metallothionein, glutathione, heme oxygenase, and cytochrome P-450. *Toxic. appl. Pharmac.* 55: 393-402.

Elcombe C. R. and Lech J. J. 1979. Induction and characterization of hemoproteins P-450 and monooxygenation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxic. appl. Pharmac.* 49: 437-450.

Environment Canada 1990. Biological test method, acute lethality test method using rainbow trout. Conservation and Protection, Environment Canada, Ottawa. Report No. EPS I/RM/9.

Fentem J. and Balls M. 1993. Replacement of fish in ecotoxicology testing: Use of bacteria, other lower organisms and fish cells

in vitro. In: Ecotoxicology Monitoring, Richardson M. (ed), VCH, Weinheim, Germany, pages 71-81.

Gagné F. and Blaise C. 1993. Hepatic metallothionein and mixed function oxidase activity in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after acute exposure to pulp and paper mill effluents. *Water Res.*, 27: 1669-1682.

Garric, J., Vindimian, E. and Férard, J.F. 1993. Ecotoxicology and wastewater: some practical applications. *Sci. Total Environ.*, Supplement 1993: 1085-1103.

George S.G. and Young P. 1986. The time course of effects of cadmium and 3-methylcholanthrene on activities of enzymes of xenobiotic metabolism and metallothionein in plaice, *Pleuronectes platessa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 83C: 37-44.

Hansen P. D. and Addison R. F. 1990. The use of mixed function oxidase (MFO) to support biological effects monitoring in the sea. *Int. Counc. Explor. Sea, Monograph E:33*, 9 pages.

Haugland R.P. 1992. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. In: *Molecular Probes*, Larison K.D. (ed.), Molecular Probes, Inc., Oregon, USA: 81-89.

Heath A.G. (ed.) 1987. Water pollution and fish physiology. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

- Klauning J. E., Ruch R. J. and Goldblatt P. J. 1985. Trout hepatocyte culture: isolation and primary culture. *In vitro Cell. Dev.* 21: 221-228.
- Lorenzen A. and Okey A. B. 1990. Detection and characterization of [³H]2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin binding to Ah receptor in a rainbow trout hepatoma cell line. *Toxic. appl. Pharmac.* 106: 53-62.
- Miller A. G. 1983. Ethylated fluoresceins: assay of cytochrome P-450 activity and application to measurements in single cells by flow cytometry. *Analyt. Biochem.* 133: 46-57.
- OECD 1987. Organization for economic cooperation and development, The use of biological tests for water pollution assessment and control. Environmental Monograph No. 11.
- Pesonen M., Goksoyr A. and Anderson T. 1992. Expression of P450IA1 in a primary culture of rainbow trout hepatocytes exposed to β -naphthoflavone and tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Arch. Biochem. Biophys.* 292: 228-233.
- Saito H., Iwami S. and Shigeoka T. 1991. *In vitro* cytotoxicity of 45 pesticides to goldfish GF-Scale (GFS) cells. *Chemosphere* 23: 525-537.
- Shapiro, H.M. 1988. Practical flow cytometry, second edition, Alan

R. Liss, Inc., New York, USA.

Sprague, J.B. 1990. Methods for fish biology. In: Aquatic Toxicology, Schreck C.B. and Moyle P.B. (eds.), American Fisheries Society, Bethesda, Md, USA.

US Environmental Protection Agency 1989. Short term test methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, EPA/600/4-89/001, 2nd edition, Environmental monitoring systems laboratory, Cincinnati, OH, USA.

van de Guchte C, de Kock W.C., de Kruijf H.A.M. 1989. Biomonitoring of receiving water bodies. In: Manual on Aquatic Ecotoxicology, de Kruijf H.A.M. et al. (eds.), Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, Chapter 33.

Zucker R. M., Elstein K. H., Easterling R. E. and Massaro E. J. 1988. Flow cytometric analysis of the cellular toxicity of tributyltin. Toxic. Lett. 43: 201-208.

Table 1. Intracellular distribution of MFO activity in trout hepatocytes incubated with 30 μ M of MCF substrate for 20 min at 22°C.

Compartment	Activity ^a	Enrichment factor ^b
Homogenate	5.2	1.0
S ₁₀ supernatant	7.2	1.4
Cytosol	0.0	0.0
Microsomes	15	2.9

a) Enzyme activity is expressed as fluorescence units.(min x mg protein)⁻¹.

b) Enrichment factor is defined as the ratio of enzyme activity in a particular compartment to that in the homogenate.

Table 2. Exposure of rainbow trout hepatocytes (2×10^6 cells per well for 48 h) to cadmium (Cd^{2+}), butanol, β -naphthoflavone (β -NF) and benzo-a-pyrene (BaP). Activity is expressed as the mean fluorescence intensity ($\text{FU} \pm$ standard deviation) after a 20 min incubation period with the MCF substrate ($= \text{FU} \cdot 20 \text{ min}^{-1}$).

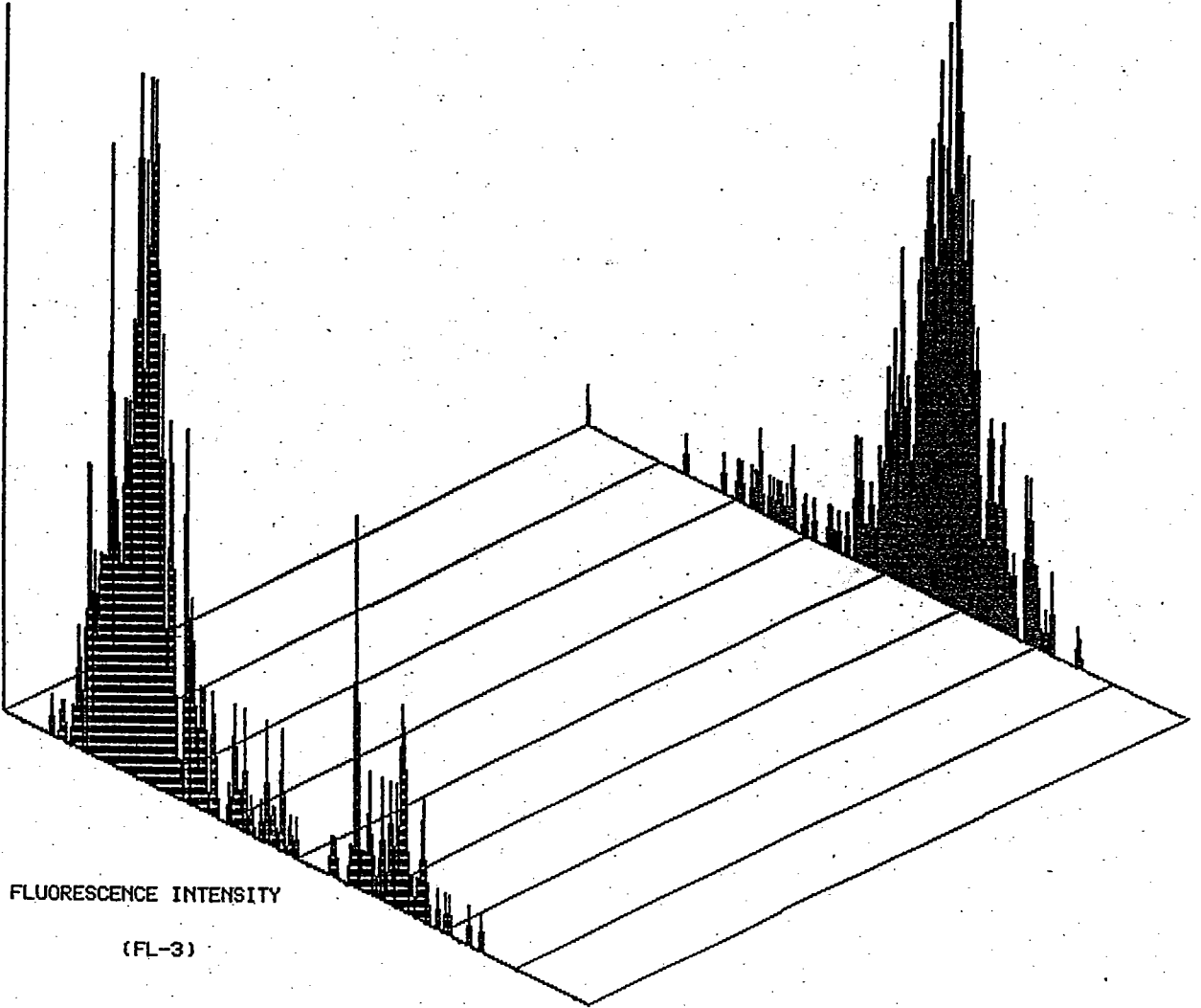
Cd^{2+}		Butanol		β -NF		BaP	
($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Activity	(% v/v)	Activity	($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Activity	($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Activity
0	300 ± 10	0	295 ± 5	0	297 ± 10	0	290 ± 10
400	289 ± 11	0.01	300 ± 8	0.1	314 ± 10 *	50	305 ± 9 *
800	283 ± 9 *	0.05	292 ± 9	0.4	327 ± 14 *	100	315 ± 11 *
1000	273 ± 8 *	0.1	300 ± 8	1	320 ± 12 *	200	320 ± 10
1600	260 ± 10 *	0.5	304 ± 10	10	295 ± 10	300	310 ± 8

(*) Significant from control (unexposed hepatocytes) at $p < 0.05$.

Fig. 1. Flow cytometric analysis (histogram) of trout hepatocytes as a function of cell viability (A) and MFO activity (B). Hepatocytes were exposed (48 h, 15°C) to 5 mg.L⁻¹ of Cd²⁺ (A) and to 0.1 mg.L⁻¹ of β-NF (B).

A

NUMBER OF CELLS

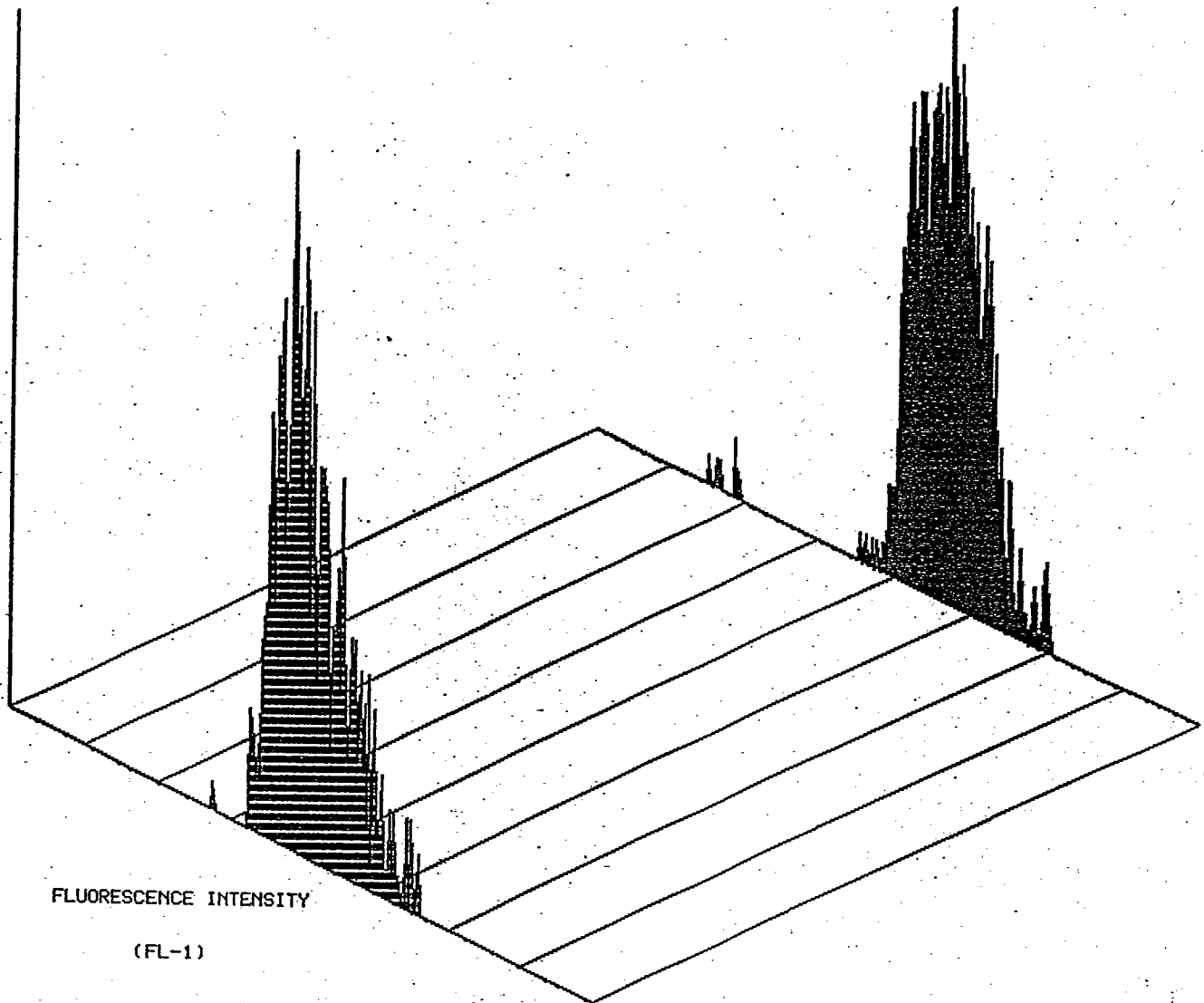


Cd^{2+}

Control

B

NUMBER OF CELLS



B-N

FLUORESCENCE INTENSITY

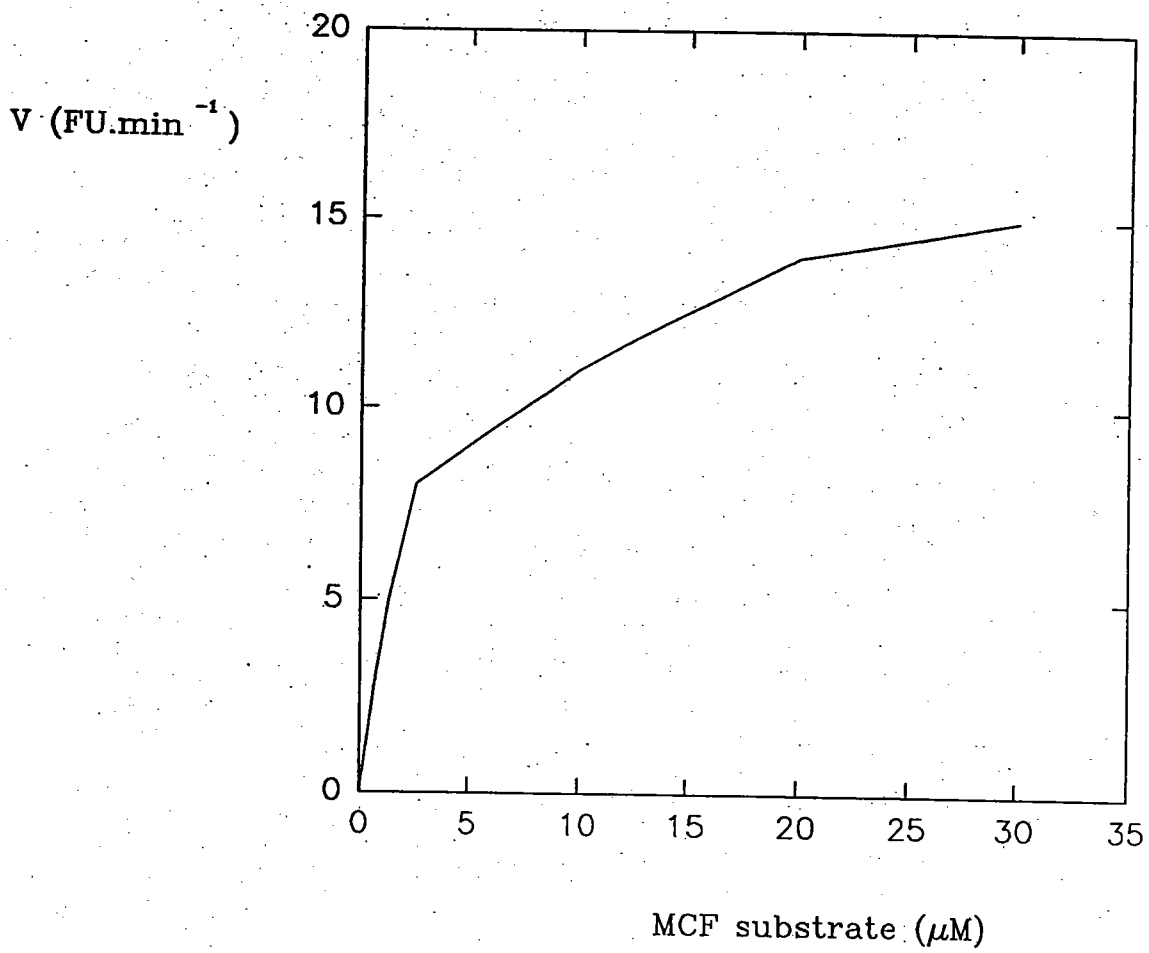
(FL-1)

Control

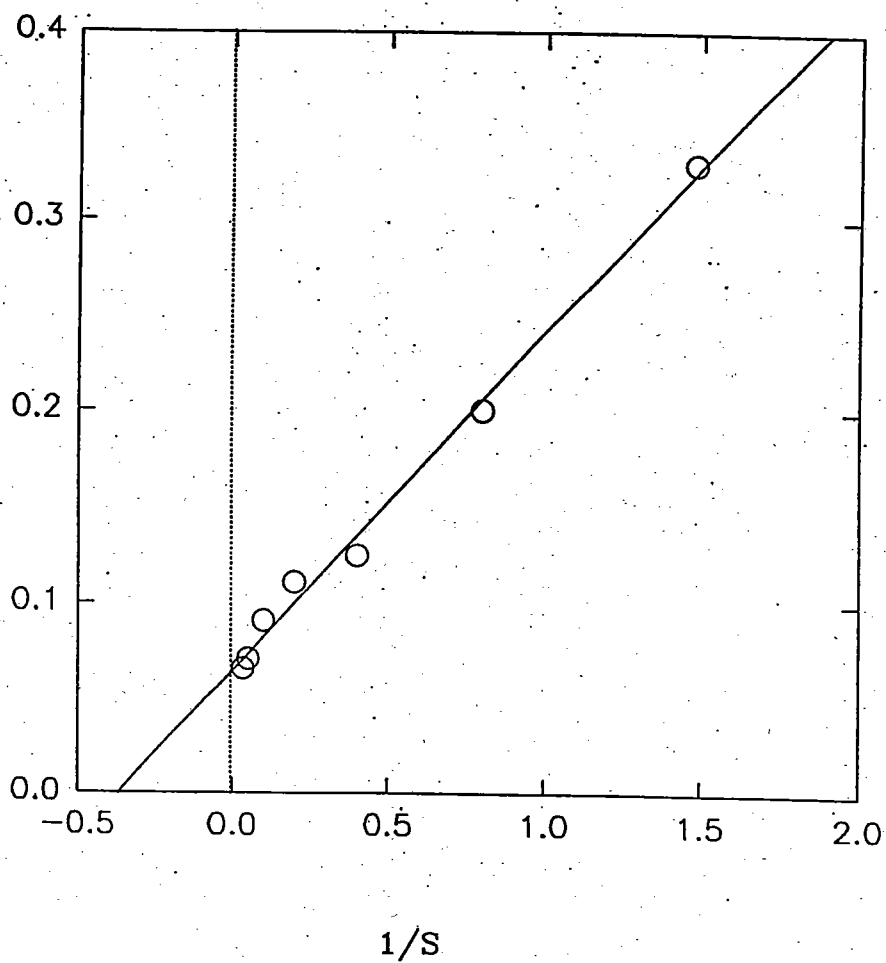
Fig. 2. Michaelis-Menten kinetics parameters of cellular MCF demethylation activity.

Rainbow trout hepatocytes were incubated for 20 min with different concentrations of the MCF substrate. A: velocity of demethylation with increasing amount of MCF. B: Lineweaver-Burk plot transformation of A, where the slope corresponds to K_m/V_{max} , the x axis intercept is $-1/K_m = -0.368 \mu\text{M}^{-1}$ and the y axis intercept is $1/V_{max} = 0.0648$ (fluorescence units per min)⁻¹.

A



B



$$[1/V] = 0.0648 + 0.176 [1/S]$$
$$R = 0.996$$

Fig. 3. Linearity of MFC demethylation activity with time. Rainbow trout hepatocytes (50×10^4 cells) were incubated with $30 \mu\text{M}$ of MFC substrate for 0, 5, 10, 15, 20 and 30 min at 22°C . Relative fluorescence units correspond to the amount of MFC substrate converted into dicarboxyfluorescein.

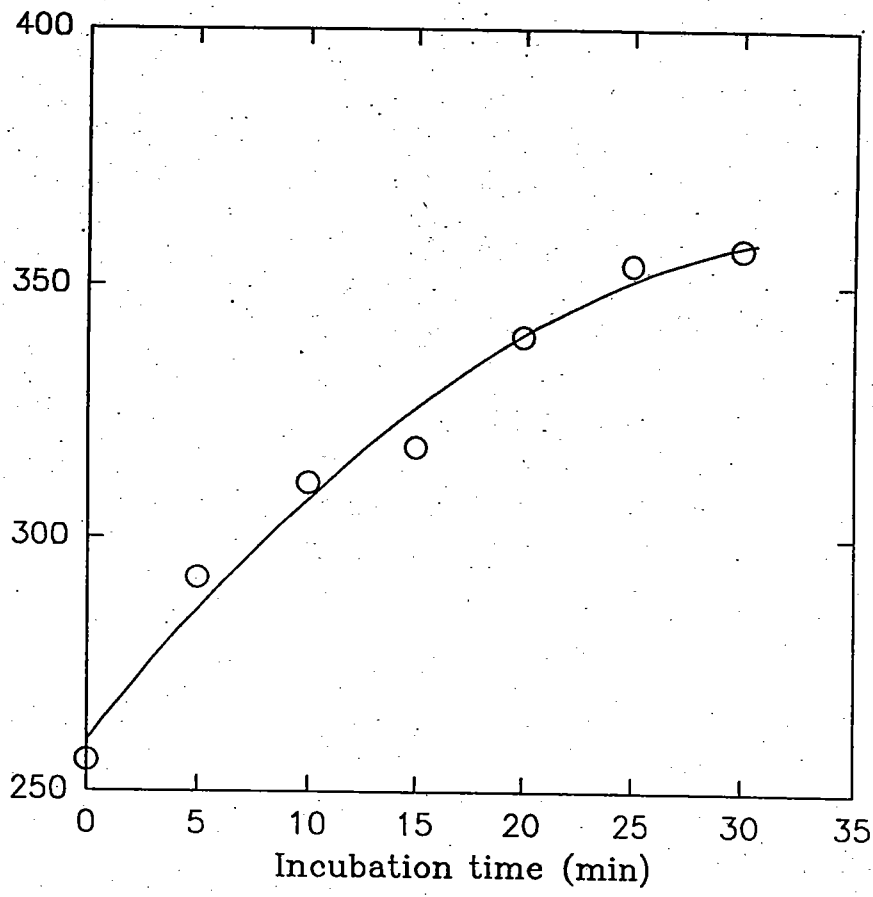
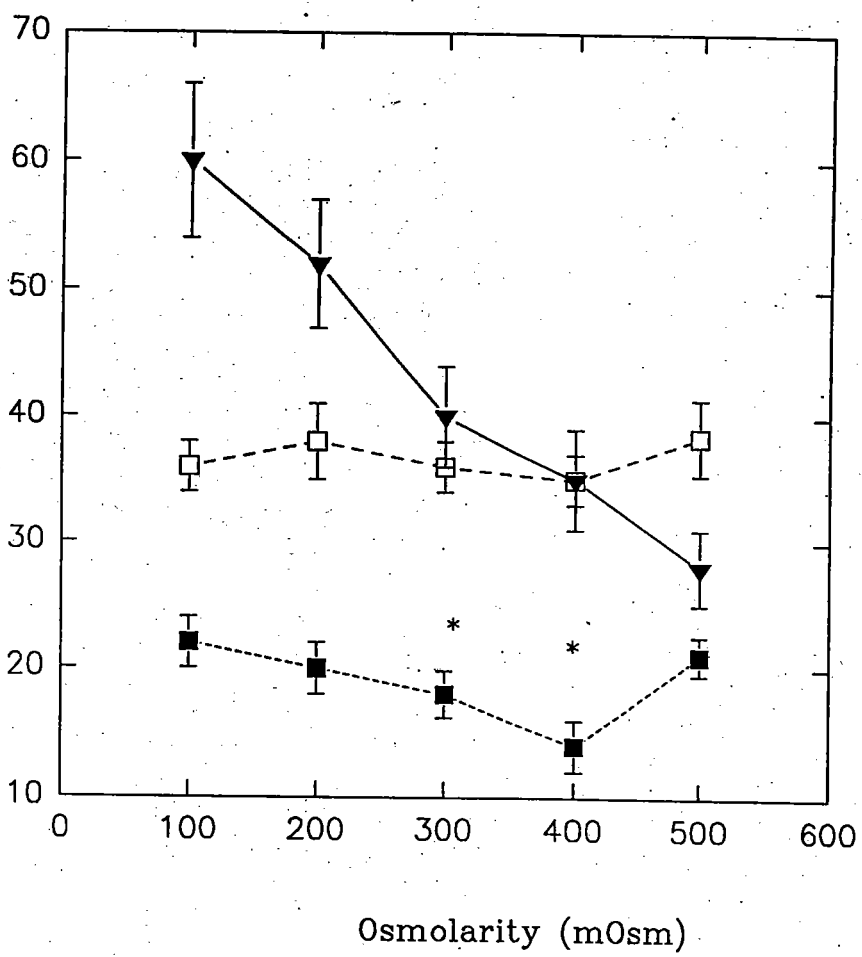


Fig. 4. Osmolarity effects on MFO activity and cell viability measurements. Trout hepatocytes were incubated with 30 μM of MCF or 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of PI for 20 min in media differing in osmolarity. Data are means of $n = 3$ replicates (\pm the standard deviation). The ordinate scale represents either changes in cell viability (PI-related fluorescence), or changes in cell volume (relative light scatter units reported by the FSC detector), or changes in MFO activity (mean fluorescence units per min). * Significant differences are in relation to 100 mOsmol of PBS at $P < 0.05$. Standard PBS medium has a calculated osmolarity of 308 mOsmol.

Relative
fluorescence
units
or
Relative light
scatter units



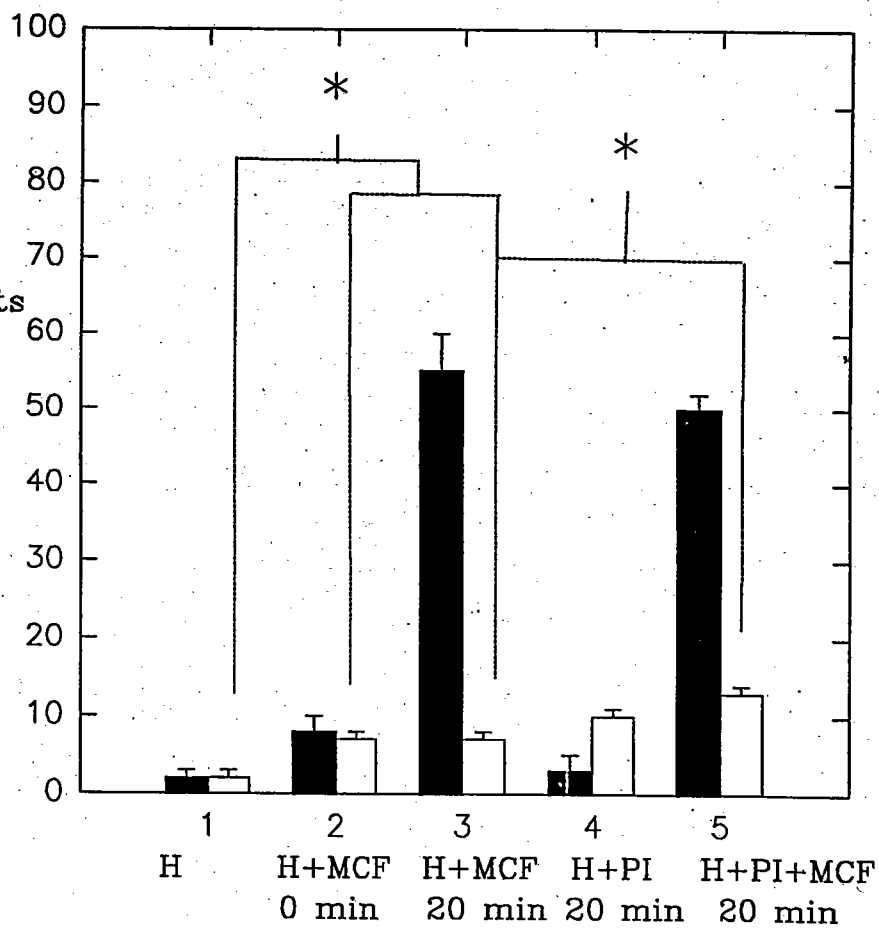
(▼)
volume (FSC)

(□)
MFO activity

(■)
viability
(PI-related
fluorescence)

Fig. 5. Simultaneous flow cytometry evaluation of hepatocyte viability and MFO activity. Trout hepatocytes (H) were exposed alone and to MCF and/or PI (condition 1-5; see discussion in text) for 20 min at 22°C. Flow cytometric readings were taken at $t = 0$ min and at $t = 20$ min. Bar graphs are means (\pm standard deviation) of $n = 3$ replicates. * Significant at $P < 0.05$.

Relative
fluorescence units



Experimental conditions

Article 3

4 Fluorescence *in situ* Hybridization *en Suspension* (FISHES) Using Biotin-labeled DNA Probes for Measuring Genetic Expression of Metallothionein and Cytochrome P-450 1A1 (CYP1A1) in Rainbow Trout Hepatocytes Exposed to Wastewaters

François Gagné and Christian Blaise

4.1 INTRODUCTION

Fish comprise a key level in the aquatic biota and hence play a major role in industrial and municipal environmental toxicological assessments as test organisms. In Canada, the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 96 h acute lethality bioassay is employed to evaluate the potential hazards of chemicals, in addition to the regulation of industrial effluents by means of a standardized procedure.¹ Alternative methods, such as fish cell cultures, are also gaining increasing recognition for toxicological assessments. Fish cell systems, in contrast to whole fish testing, can reduce substantially the number of fish required, improve cost efficiency and augment toxicological knowledge of complex mixtures. Several fish cell systems are now recognized that present promise for toxicological investigations.^{2,3} Among these are the rainbow trout gonad (RTG-2) and hepatoma (RTH-149) cell lines, primary cultures of rainbow trout hepatocytes or gill epithelial cells,⁴ the bluefish fin (BF-2), brown bullhead catfish (BB) and goldfish scale (GFS) cell lines.^{5,6} These cell lines have been proposed as suitable candidates for *in vitro* bioassays. The use of primary cultures, such as rainbow trout hepatocytes, offers additional advantages; as that they are often a cellular target during toxic insult and are also responsible for xenobiotic biotransformation of chemicals.⁶ Moreover, primary cultures of hepatocytes match more closely *in vivo* tissue characteristics. Finally, cell-based assays are sometimes predictive of similar toxic effects towards whole organisms,⁷ thereby displaying relevance as alternative testing systems.

Evaluating sublethal effects in addition to flagrant cell toxicity effects can indicate a more comprehensive profile of toxic aggression. Metallothionein (MT) and cytochrome P-450 1A1 (CYP1A1) induction are well-known cellular defense mechanisms resulting from cell exposure to specific xenobiotics. MT levels can be induced by exposure to divalent heavy metals⁸ and possibly to compounds causing oxidative stress.⁹ In the same manner, induction of CYP1A1 following exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), dioxins and furans¹⁰ represents a cellular defense mechanism. Therefore, appraisal of MT and CYP1A1 levels together with cell toxicity is an important adjunct for toxicological investigations of complex mixtures. Such inductions can be followed

at the transcriptional level (mRNA for MT and CYP1A1) or at the translational level (ie. protein and enzyme expression). In the former case, measurement of specific mRNAs may have the advantage of eliminating potential interferences linked to enzyme activity measurement for CYP1A1^{11,12} and offer a highly specific measurement of MT and CYP1A1 levels. Quantization of mRNA in single cells is rendered possible by fluorescence *in situ* hybridization using DNA probe hybridization and flow cytometry methodologies. In this work, DNA probes were cloned from reverse-transcribed total trout RNA and amplified using asymmetric polymerase chain reaction (aPCR) methodology.

Therefore, the aim of the present study was to exploit the rainbow trout hepatocyte primary culture model to assess toxicity after cell exposure to environmental samples. MT and CYP1A1 inductions were measured in exposed cells at the transcriptional level using a rapid and simple FISHES methodology and detection was achieved using flow cytometry technology.

4.2 MATERIALS AND METHODS

4.2.1 Chemicals

Phosphate buffered saline (Dulbecco's PBS), calcium chloride, β -naphthoflavone (β -NF), cadmium chloride (Cd), benzo[a]pyrene (BaP), collagenase type IV, foetal bovine serum (FBS), gentamycin sulfate, trypan blue, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Liebovitz medium (L-15), sodium citrate, tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris), Tween-20, diethylpyrocarbonate (DEPC), digitonin, salmon sperm DNA, sodium dodecylsulfate (SDS), bovine serum albumin (BSA), polyvinylpyrrolidone (PVP), Ficoll and propidium iodide (PI) were purchased from Sigma Chemical Co. Biotin-16-dUTP, streptavidin-fluorescein, dCTP, dATP, dGTP and dTTP were purchased from Boehringer Mannheim. Generation of DNA probes was achieved by asymmetric polymerase chain reaction (PCR) using the GeneAMP RNA/PCR kit supplied by Applied Biosystems Division of Perkin-Elmer Cetus Corporation. Total RNA from rainbow trout hepatocytes was extracted according to the guanidine thiocyanate method supplied in a kit (Promega, USA).

4.2.2 Production of MT and CYP1A1 DNA probes

DNA probes for MT and CYP1A1 mRNA were prepared by reverse transcription of total cell RNA that was exposed to either 100 ng ml⁻¹ Cd (MT) or 100 ng ml⁻¹ β -NF (CYP1A1 mRNA) for 48 h at 15 °C, followed by amplification with the polymerase chain reaction. Total cell RNA was extracted by the guanidine thiocyanate method using Promega's protocol. The PCR was asymmetric¹³ in that unequal amount of primers were used during amplification. This resulted in an excess of the complementary strand of the MT or CYP1A1 mRNA. The primers used for reverse transcription and PCR for producing a DNA probe specific to MT

mRNA were: sense 5'-ATG-GAT-CCT-TGT-GAA-TGC-3' (0.5 μM) and antisense 5'-TCA-CTG-ACA-ACA-GCT-GGT-3' (10 μM). The primers used for reverse transcription and PCR for producing a DNA probe for CYP1A1 mRNA were: sense 5'-TCC-ATT-CCC-ATC-CTT-GGT-3' (0.5 μM) and antisense 5'-TCT-AGT-TTC-CTG-TCC-TCA-3' (10 μM). For reverse transcription of total RNA (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) into DNA, only the antisense primers were used. A DNA probe was also produced for evaluating non-specific absorption of DNA within hepatocytes. This probe consisted mainly of the interleukin 1 α (IL-1 α) mRNA derived from PAW109 plasmid which is supplied with the GeneAmp reverse transcriptase PCR kit. Amplification was performed in the presence of 10 μM of biotin-16-dUTP with 200 μM of nucleotides except that dTTP was at 100 μM . The amount of Taq DNA polymerase was at 5 units ml^{-1} and Mg^{2+} concentration was at 1.5 mM. After mixing and overlaying with 50 μl of mineral oil, the mixture was incubated at 95 °C for 4 min and 40 cycles of the following steps were performed: 94 °C for 50 sec, 58 °C for 50 sec and 72 °C for 25 sec. Afterwards, the mixture was incubated for 5 min at 72 °C and placed in ice. The DNA was extracted with phenol-chloroform-isoamyl alcohol and precipitated with 1 volume of isopropanol at -85 °C for 5 min. The pellet was washed with isopropanol, precipitated as above and resuspended in sterile solution of saline citrate (SSC) IX (150 mM NaCl and 15 mM citrate, pH 7.2). The purity was assayed (ratio of absorbances at 260 nm and 280 nm) and the concentration calculated at 260 nm with standard solutions of salmon sperm DNA. The specificity of the PCR reaction was verified by electrophoresis on 2% agarose gel containing 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of ethidium bromide. The electrode and running buffer was 40 mM Tris-acetate, pH 8.0, containing 2 mM EDTA and 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of ethidium bromide. The gels were scanned at 300 nm for densitometric analysis.

4.2.3 Effluent and surface water sample preparation

Industrial effluents were investigated in this study for cell viability effects, in addition to MT and CYP1A1 mRNA induction capabilities. Effluents were representative of several key industrial sectors: pulp and paper (PP), petrochemical (PC), surface treatment (ST) and inorganic chemical production (IC). Each was a 24 h composite sample conforming to Environment Canada's sampling procedure.¹⁴ The composite sample was returned to the laboratory in several Rubbermaid 60 l containers lined with polyethylene bags and stored in the dark at 4 °C. Each effluent sample was recomposed before the bioassays to ensure homogeneity and divided to comply with biological and chemical volumetric requirements. A volume of 20 ml sufficed for bioassays using our cell system.

Surface water samples collected upstream and downstream from a major urban effluent discharge, as well as the discharge itself, were also investigated in this study. The samples (20 ml) were drawn from 5 l containers and stored at 4 °C in the dark. On arrival in the laboratory, they were filter-sterilized (0.1 μm) and stored at 4 °C in the dark prior to the undertaking of bioassays.

4.2.4 Preparation of rainbow trout hepatocytes

Primary cultures of rainbow trout hepatocytes were prepared according to the double perfusion methodology of Kläuning¹⁵ with some modifications. After a portal vein perfusion with sterile PBS (without calcium), pH 7.5, containing 1 mM glucose, 0.3 mM pyruvate, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ gentamycin, 2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ amphotericin B, 2 mg ml^{-1} BSA, 5 mM EDTA and 25 mM Tris-HCl, the livers were perfused with 10 ml of collagenase (100 units in PBS with 1 mM CaCl_2 and no EDTA) and were removed from the abdominal cavity. The livers were cut into small slices and mixed in 50 ml collagenase solution for 20 min at room temperature. Afterwards the cells were liberated from the tissue with a cell dissociation sieve kit (Sigma Chemical Co.). The cells were then washed 4 times by centrifuging at 200 x g for 2 min and resuspending in sterile PBS without calcium and EDTA. The cells were counted and cell viability was estimated by the trypan blue exclusion test.¹⁵ Typical cell yields were $\sim 2.3 (\pm 0.5) \times 10^6$ cells g^{-1} b.w. with a viability of $95 \pm 2\%$ (derived from n = 50 isolations). The cells were resuspended in 4 ml of sterile L-15 containing 1% FBS, 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ gentamycin sulfate and 2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ amphotericin B. For each effluent or surface water sample toxicity evaluation, the cells from five yearling trout were pooled prior to exposure.

4.2.5 Exposure of cells to chemicals, effluents and surface waters

Hepatocytes were distributed in 24-well microplates (cell culture treated) at a density of 1×10^6 viable cells ml^{-1} of L-15 medium as described above. The cells were exposed to several dilutions of effluent (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 and 50% v/v) or surface water samples (0.1, 1, 10, 25 and 50% v/v). The exposure period was 48 h at 15 °C in a humidified atmosphere. Rainbow trout hepatocytes were also exposed to Cd (0, 25, 50, 75, 100 and 200 ng ml^{-1}), BaP (0, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 ng ml^{-1}) and β -NF (0, 25, 50, 75, 100 and 200 ng ml^{-1}) under identical conditions.

4.2.6 Cell viability evaluation

Cell viability was assayed by flow cytometry using the PI exclusion test.¹⁶ An aliquot of cells (50×10^4 cells) was centrifuged and, after discarding the supernatant, was incubated with 200 μl of PI (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) in PBS for 10 min at room temperature. The cells were then analyzed by flow cytometry as described below. The proportion of viable cells (exposed *versus* unexposed) was determined with digitonin, a positive (biocidal) control which permeabilizes cells. The same number of cells was treated with one volume of 0.02% digitonin in PBS for 5 min, incubated with PI for 10 min and analyzed with flow cytometry. The percentage of live cells was calculated as follows:

$$\text{Proportion of live cells (\%)} = [1-(X-A)/(B-A)] \times 100$$

where: X is the proportion of stained cells in the exposed group;
 A is the proportion of stained cells in the unexposed group; and
 B is the proportion of stained cells in the digitonin-treated group.

4.2.7 Cell suspension *in situ* hybridization

After the exposure period, the medium was removed and washed in ice-cold SSC 1 X and centrifuged at $200 \times g$ for 2 min at 4°C . The supernatant was removed and a selected number of cells (200,000) were fixed in 150 μl of PBS containing 4% formaldehyde and 5 mM MgCl_2 for 10 min at 22°C . The cell suspension was transferred to a 96-well polycarbonate microplate. The cells were then centrifuged and, after discarding the supernatant, fixed in 150 μl of 70% ethanol containing 0.05% DEPC for 45 min at 4°C . The cells were again centrifuged, the supernatant removed and rehydrated/permeabilized with 100 μl of PBS containing 0.1% Tween-20 for 15 min at 22°C . Afterwards, the cells were centrifuged and, after supernatant removal, were incubated with 500 ng of the DNA probe in 100 μl of SSC 4X containing 0.1% SDS, 0.1% Ficoll, 0.1% PVP and 0.1% BSA. This mixture was overlaid with 50 μl of mineral oil and incubated at 85°C for 2 min, after which hybridization was allowed to proceed at 58°C for 1 h. The cells were then washed by centrifugation and resuspended with 150 μl of PBS containing 0.1% BSA and Tween-20 for 5 min. The cells were washed once more by centrifugation and resuspended in PBS containing $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ streptavidin-fluorescein, 0.1% BSA and Tween-20 for 30 min at 37°C . The cells were washed for one last time in PBS for 10 min, centrifuged and resuspended in PBS containing $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ of PI. The cells were then ready for flow cytometry analysis.

The extent of hybridization of DNA probes to MT and MFO mRNAs in Cd or β -NF treated cells was compared with that of MT protein levels assayed by the silver saturation assay.¹⁷ CYP1A1 induction measurement was also compared with methoxycarbonylfluorescein O-demethylase (MCFOD) activity assayed in live hepatocytes using flow cytometry.¹⁸

4.2.8 Flow cytometric analysis

Flow cytometric measurements were achieved with a FASCan flow cytometer (Becton-Dickinson) equipped with an analytical flow cell, argon (blue) laser emitting at 488 nm at 15 mW. The flow rate was maintained at about $13 \mu\text{l min}^{-1}$ during acquisition of data. For each measurement, data from 5000 gated cells were recorded, analyzed and stored with the Lysis II software. The cells were first gated according to forward (fsc detector) and orthogonal light scatter (ssc detector) characteristics to isolate them from smaller particles. The fsc detector was set at -1 exponential in log scale and the ssc detector was set at 175 V equally in log scale.

For FISHES measurements, the detector for fluorescein emission (500–550 nm, fl-1 detector) was set at 400 V and the channel number was set at 1024 for maximum resolution. The detector for DNA analysis and cell viability determinations (600–650 nm, fl-3 detector) was set at 275 V and the channel number was set at 256. The cells were aspirated into the flow cytometer and 5,000 cells were collected. A second gating was constructed such that DNA-containing cells could be analyzed for fluorescein emission. The data were reported in a 2-dimensional graph (dot plot) with cell volume (forward light scatter) on the y axis and fluorescence emission on the x axis. For data analysis, the mean fluorescence of the cell population was measured.

For cell viability measurements (fluorescence analysis of the DNA-PI complex at 620 nm with the fl-3 detector), unexposed cells were aspirated, analyzed and reported in a 2-dimensional plot with forward light scatter on the y axis and red fluorescence on the x axis. Gating was constructed in order to circumscribe the proportion of cells that became more fluorescent (ie. cells that did not exclude PI dye).

4.2.9 Statistical analysis

Cells were exposed to effluent, surface waters and test compounds in quadruplicate. Flow cytometric data (% of events or mean population fluorescence) were subjected to a Bartlett's homogeneity of variance test and a normality test. When variances were homogenous, data underwent an analysis of variance and critical differences between unexposed and exposed cells were determined with Dunnett's t test. In some cases, variances were not homogenous and data were not normally distributed. In such cases, data were analyzed by non-parametric Kruskal-Wallis analysis of variance and critical differences between control and treatment were appraised by a distribution-free multiple comparison test (Dunn's test). Significance was invariably set at $p < 0.05$. For environmental samples, the lowest observable effect concentration (LOEC) and the no observable effect concentration (NOEC), expressed in % v/v, were determined. A toxicity threshold (TT) was then calculated from the following equation:

$TT = (NOEC \times LOEC)^{1/2}$. Environmental sample data were further transformed into toxicity units (TU) with the help of the following equation:

$$TU = 100\% \text{ v/v} \div TT.$$

This transformation renders data directly proportional to toxic strength.

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

4.3.1 Hybridization of DNA probes in hepatocytes

The DNA probes were produced by asymmetric PCR from reverse transcription of total RNA in cells exposed to either β -NF or Cd^{2+} . These cells had increased levels

of MT and MCFOD at the protein or enzyme levels, respectively (see Figures 4.1 and 4.2). MCFOD activity (Figure 4.2) reflected the induction of CYP1A1 and also of its transcriptional mRNA (Figure 4.2A). Similarly, MT protein units reflected the transcription of MT mRNA (Figure 4.1). Reverse transcription of total cell RNA followed by PCR amplification generally yielded 20 to 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of total DNA. Gel electrophoresis of the DNA samples after ribonuclease A digestion showed bands principally of 200 and 1500 nucleotides for MT and CYP1A1 DNA probes, respectively. However, some faint bands were also observed in these gels. These appeared to be smaller fragments of DNA probes as other nonspecific DNA fragments may be present. Generated probes were tested for their capacity to detect induction of mRNA using known inducers as discussed below. Furthermore, an interleukin-1 α (IL-1 α) DNA probe (308 nucleotides) was also produced (supplied with the GeneAmp RT-PCR kit) which served as a probe for estimating non-specific absorption. This probe did not show any specific binding when compared to cells treated only with streptavidin-fluorescein and PI (Table 4.1).

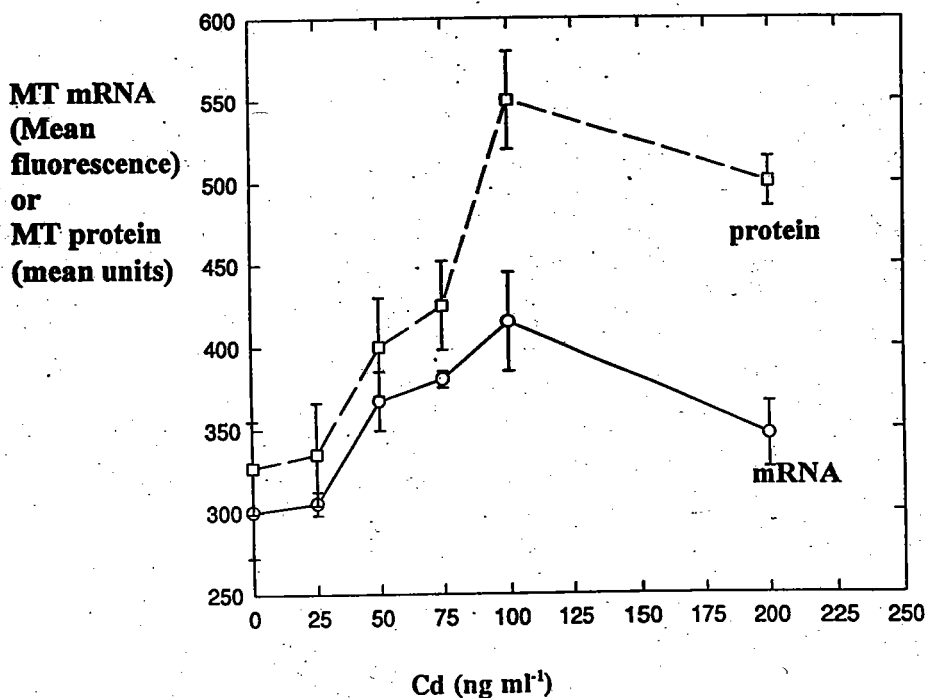
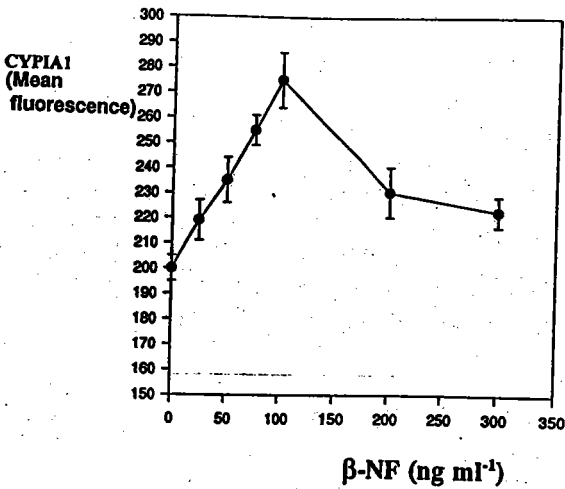


Figure 4.1 MT induction due to cadmium exposure in rainbow trout hepatocytes. Rainbow trout hepatocytes were exposed to several concentrations of Cd for 48 h at 15 °C. MT levels were determined at the protein (----) and mRNA levels (—) of expression. Data represent the mean with the standard deviation from $n = 4$ replicates.

A



B

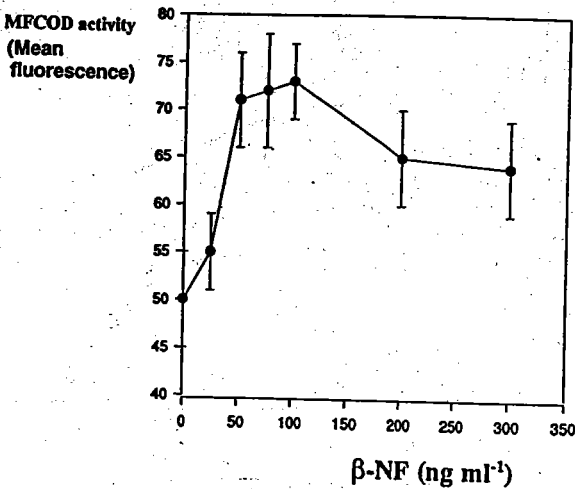


Figure 4.2 Induction of CYPIA1 due to β -NF exposure in rainbow trout hepatocytes. Rainbow trout hepatocytes were exposed to β -NF for 48 h at 15 °C. CYPIA1 levels were assayed at transcriptional (A) and enzyme activity (B) levels of expression. Data represent the mean with the standard deviation from $n = 4$ replicates.

Table 4.1 Flow cytometric analysis of cellular MT and CYP1A1 mRNA

Cell treatment	CYP1A1 (RFU)	MT (RFU)
Cells	25±5 ^b	30±4
Cells and PI	28±7	32±3
Cells, streptavidin-FITC and PI	39±5	38±4
Cells, DNA probe (IL-1 α) ^c streptavidin-FITC and PI	42±4	43±6
Control cells, DNA probe (MT or CYP1A1), streptavidin-FITC and PI	225±20	300±31
Treated cells (Cd or β -NF), DNA probe (MT or CYP1A1), streptavidin-FITC and PI	293±30	400±28

RFU: relative fluorescence units.

^bData are expressed as the mean RFU of the population with the standard deviation

^cThis probe was used to detect non-specific binding to cellular sites. The IL- α cDNA probe was made in the presence of 10 μ M of biotin-16-dUTP during PCR amplification and hybridized to fixed hepatocytes as described in section 4.2

However, when cells were hybridized with DNA probe for MT or CYP1A1, significant signals were measured in unexposed cells. Significantly higher fluorescence values were again observed in Cd²⁺ or β -NF treated cells (Table 4.1). These results indicate that the hybridization cocktail is adequate for reducing non-specific absorption of DNA molecules while favoring DNA probe hybridization to mRNA. The addition of dextran sulfate or formamide in the hybridization cocktail gave poor cell recovery, partly because the density of the cocktail was higher, thereby possibly restricting cell sedimentation during centrifugation and did not decrease the background signals. Inclusion in the hybridization cocktail of transfer RNA from *Escherichia coli* and salmon sperm DNA at 1 μ g ml⁻¹ and 25 μ g ml⁻¹, respectively, also did not diminish background signals and even lowered the signals with the MT and CYP1A1 DNA probes. Formaldehyde fixation followed by ethanol/DEPC fixation was essential for trapping mRNAs within cells, by inhibiting ribonucleases (DEPC) and preserving cell morphology.

Also, DNA probes can potentially hybridize with genomic DNA which also contains these sequences. Because the time allowed for hybridization is not long, this interference can be considered low. In addition, DNA of non-dividing hepatocytes are being considered.¹⁵ Its quantity is constant as suggested by its flow cytometric measurement using propidium iodide in fixed hepatocytes. Therefore, gene expression for MT and CYP1A1 is measurable because of the constancy of total genomic DNA and translation into mRNA is inducible in this cell system.^{10,17}

4.3.2 Induction of cellular MT and CYP1A1 mRNA

Rainbow trout hepatocytes were exposed to either Cd or β -NF which are well known inducers for MT⁶ and CYP1A1¹⁰ both *in vivo* and *in vitro* with fish and mammals. After a 48 h exposure, hepatocytes were collected and analyzed for MT and CYP1A1 at the protein (or enzyme) and mRNA levels. In this study, CYP1A1 (at the enzyme level) is expressed as the enzyme activity of MCFOD. When cells were exposed to Cd²⁺, significant hybridization signal and MT levels were measured (Figure 4.1). Moreover, MT mRNA levels paralleled those of MT protein and a significant and positive correlation was obtained ($R = 0.830$; $p = 0.04$). These results suggest that, in Cd-exposed cells, the DNA probe generated by PCR methodology is of adequate specificity and that post transcriptional regulation of MT mRNA appears not to occur significantly in exposed cells. Therefore, it is deduced that the measurement of MT at the transcriptional instead of at the protein levels could be used as an early warning event for heavy metal exposure using PCR-generated probes. Similarly, cells exposed to β -NF had higher hybridization signals than untreated cells (Figure 4.2A) and these levels also varied with MCFOD activity (Figure 4.2B), as indicated by a significant and positive correlation ($R = 0.906$; $p = 0.0129$). Here again, as with MT DNA probe, PCR-generated DNA probes appear adequately specific and no significant post-transcriptional activity seems to occur in hepatocytes exposed to β -NF in the conditions described. These results suggest that CYP1A1 mRNA or MCFOD activity measurements could serve as an early warning system to detect exposure to inducing chemicals such as PAHs, PCBs, dioxins and furans. Hybridization of mRNA with PCR-generated DNA probes in hepatocytes followed by fluorescence detection using flow cytometry is feasible using the experimental conditions described in this chapter. This method demonstrates the means of producing a rapid quantitative measurement of mRNA in single cells. Asymmetric PCR methodology has the advantage of generating a DNA probe of any desired length to improve its specificity without excluding it from the intracellular environment. This study has shown that probe lengths of 200–1500 nucleotides can be used for *in situ* hybridization in rainbow trout hepatocytes.

4.3.3 Cytotoxic effects of a major urban discharge

Water samples were taken above, at and below a major urban wastewater outfall to assess cytotoxicity indicated by cell viability, MT mRNA and CYP1A1 mRNA levels (Figure 4.3). Levels of MT mRNA were induced clearly at the urban effluent outfall and then decreased with distance downstream in the river. This suggests that bioavailable heavy metals are present in the urban effluent and have induced MT in hepatocytes. MT can be induced principally by heavy metals⁸ and have also been shown to be induced by compounds responsible for oxidative stress in rat liver.⁹ Induction of MT in trout hepatocytes exposed to oxidative stress, however, has yet to be confirmed.

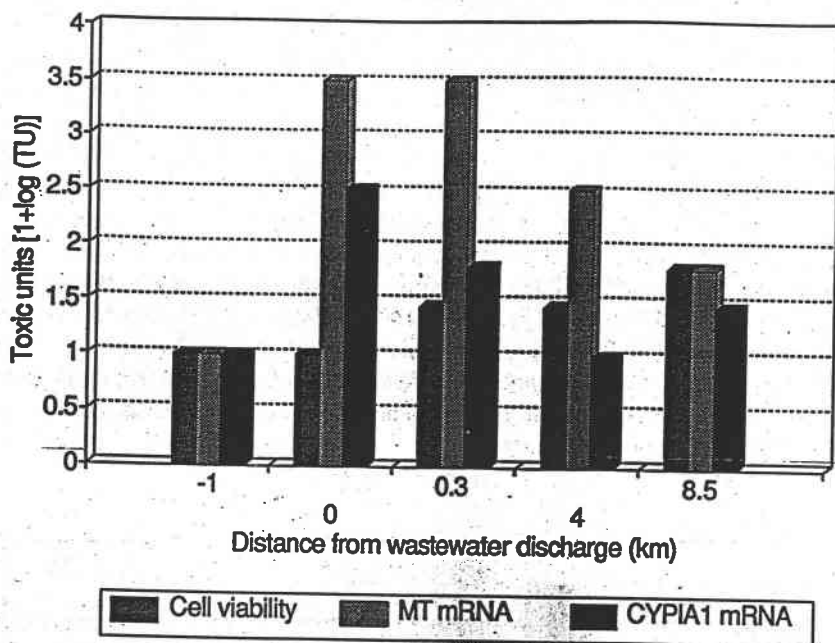


Figure 4.3: Cytotoxicity of a major urban discharge. Rainbow trout hepatocytes were exposed to several dilutions of a major urban discharge and of its associated upstream/downstream stations for 48 h at 15 °C. Cell viability, MT mRNA and CYP1A1 mRNA were assayed. Data are reported in \log_{10} toxicity units.

CYP1A1 mRNA induction was also detected in the effluent and decreased with distance downstream in the river. Hence, these water samples may contain planar organic compounds such as PAHs or PCBs (or other unknown inducing compounds) that are bioavailable to liver cells. Toxic effects on cell viability were increased somewhat at distances located 0.3, 4 and 8.5 km downstream. These responses appear unrelated to the urban discharge and perhaps suggest that additional sources of toxicants are influential downstream. Levels of PAHs and polychlorinated biphenyls (PCBs) were measured in the urban effluent. Levels of PAHs, obtained from 21 distinct PAHs at the time of sampling, totalled $4 \pm 0.3 \mu\text{g l}^{-1}$ and that of PCBs, obtained from 13 congeners at the time of sampling, totalled $0.6 \pm 0.015 \mu\text{g l}^{-1}$ (results not shown). However, it remains to be seen whether these levels alone are sufficient to induce CYP1A1 mRNA in trout hepatocytes.

Water samples obtained upstream and 8.5 km downstream in the vicinity of the urban effluent plume (not shown) did not produce any significantly detectable effects on cell viability, MT and CYP1A1 mRNA levels. This urban effluent study highlights the sensitivity of the rainbow trout hepatocyte bioassay and its usefulness as a simple screening tool to detect toxic effects along a chemical pollution gradient.

4.3.4 Cytotoxic effects of industrial effluents

Rainbow trout hepatocytes were also exposed to industrial effluents in order to explore effects on cell viability, MT and CYP1A1 mRNA levels (Figure 4.4). All effluents elicited significant responses in one or more of the three toxicity endpoints measured. Reduction in cell viability was highest in effluent IC1, manifest in effluents ST and PC, but less pronounced in the other effluents. Effluents IC1 and PC, in particular, proved to be the strongest inducers of MT mRNA, thereby suggesting that they contained bioavailable heavy metal(s). For industrial wastewaters, hepatic MT induction has already been reported for trout exposed to pulp and paper effluents.¹¹ CYP1A1 mRNA induction, suggestive of the presence of certain classes of high risk organic chemicals, was observed in three of the six effluents tested (ie, PC, PP2 and ST). While MFO activity induction responses have been documented for PP and PC effluents,^{11,19} such information for ST-type effluents is not available currently.

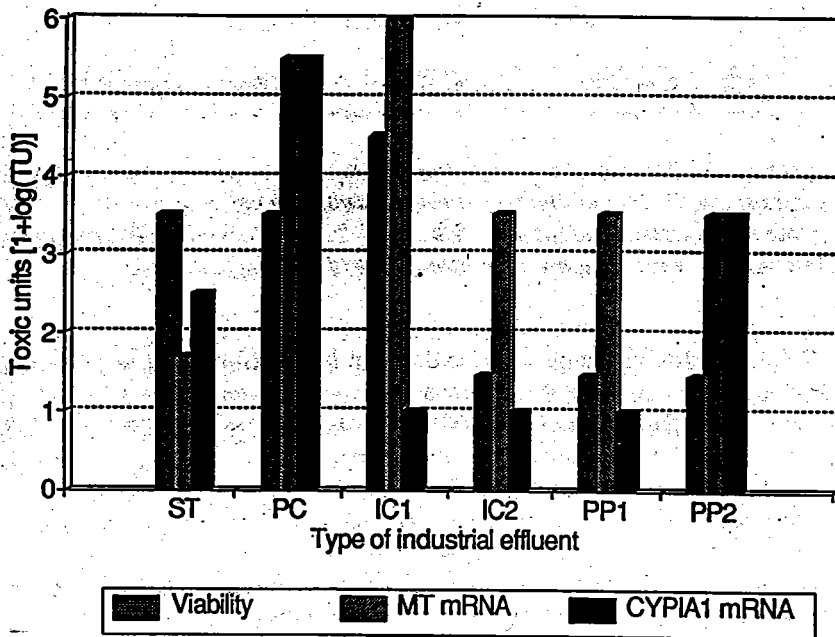


Figure 4.4 Cytotoxicity of industrial effluents. Rainbow trout hepatocytes were exposed to several dilutions of industrial effluents for 48 h at 15 °C. The industrial effluents were from the following sectors: surface treatment (ST), petrochemical (PC), inorganic chemical production (IC) and pulp and paper (PP). Cell viability, MT mRNA and CYP1A1 mRNA were assayed. Data are reported in \log_{10} toxicity units.

4.4 CONCLUSIONS

A simple and rapid cell suspension *in situ* hybridization methodology using rainbow trout hepatocytes has been developed, whereby hybridized DNA probes within cells can detect transcriptional expression of MT and CYP1A1 mRNA by coupling streptavidin-fluorescein binding to biotin and flow cytometry measurement techniques. In this study, biotin-16-dUTP was used as the nucleotide analogue of thymidine, but other analogues can be used. For example, digoxigenin-12-dUTP¹³ and fluorescein-11-dUTP are also suitable analogues of thymidine. The DNA probes used in this study were cloned and amplified from total RNA of hepatocytes exposed either to Cd and B-NF. This yielded DNA strands which were consistent in size to MT and CYP1A1 mRNAs. Other secondary strands were also generated suggesting that amplification was not entirely specific to the desired mRNAs. However, the presence of these other DNA strands did not markedly hinder measuring mRNAs in cells exposed to known inducers. Significant hybridization signals, confirmed by parallel increases in levels of translation products (MT protein or MCFOD activity), were measured in treated cells as compared with unexposed cells, indicating adequate specificity of the DNA probes generated by asymmetric PCR. The preliminary tests with selected effluents and surface water samples suggest that this methodological approach may eventually prove useful to screen for the presence of relevant (sub)lethal effects triggered by chemical pollutants in various environmental matrices. This will prove to be a highly advantageous tool in environmental toxicological assessment.

4.5 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the management of the Centre Saint-Laurent, Environment Canada, Québec Region, for supporting this research.

4.6 REFERENCES

1. *Conservation and Protection*, Environment Canada, Ottawa, 1990, Report No. EPS I/RM/9.
2. Babich, H. and Borenfreund, E., *Toxicology in vitro* 1991, 5, 91-100.
3. Nicholson, R. L. *Advances in Cell Cultures* 1989, 7, 1-18.
4. Pärt, P., Norrgren, L., Bergstrom, E. and Sjoberg, P. *Journal of Experimental Biology* 1993, 175, 219-232.
5. Saito, H., Iwami, S. and Shigeoka, T. *Chemosphere* 1991, 23, 525-537.
6. Baksi, S. M. and Frazier, J. M. *Aquatic Toxicology* 1990, 16, 229-259.
7. Brandao, J. C., Bohets, H. H. L., Van De Vyver, I.E. and Dierickx, P.J. *Chemosphere* 1992, 25, 553-562.
8. Hamer, D. H. *Annual Reviews of Biochemistry* 1986, 55, 913-951.

9. Sato, M. and Bremner, I. 1993. *Free Radical Biology and Medicine* 1993, 14, 325-337.
10. Pesonen, M., Goksøyr, A. and Anderson, T. *Archives of Biochemical Biophysics* 1992, 292, 228-233.
11. Gagné, F. and Blaise, C. *Water Research* 1993, 27, 1669-1682.
12. Boon, J. P., Everaarts, J. M., Hillebrand, M. T. J., Eggens, M. L., Pijnenburg, J. and Goksøyr, A. *The Science of the Total Environment* 1992, 114, 113-133.
13. Timm, E. A., Jr. and Stewart, C. C. *Biotechniques* 1992, 12, 362-367.
14. Vezeau, R. *Protocoles d'échantillonnage, de préservation et de préparation d'échantillons pour l'analyse des polluants prioritaires*. SPE, Région du Québec, Environment Canada, Montréal, 1982, 34 pp.
15. Klauning, J. E., Ruch, R. J. and Goldblatt, P. J. *In vitro Cellular Development in Biology* 1985, 21, 221-228.
16. Zucker, R. M., Elstein, K. H., Easterling, R. E. and Massaro, E. J. *Toxicology Letters* 1988, 43, 201-208.
17. Gagné, F., Marion, M. and Denizeau, F. *Fundamental and Applied Toxicology* 1990, 14, 429-437.
18. Gagné, F. *Evaluation de la génotoxicité et de l'expression génétique du CYP1A1 et de la métallothionéine avec un modèle cellulaire*. Centre Saint-Laurent, Environment Canada, Montréal, 1992, 27 pp.
19. Steadman, B. L., Farag, A. M. and Bergman, H. L. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1991, 10, 365-374.

Article 4

Evaluation of the Genotoxicity of Environmental Contaminants in Sediments to Rainbow Trout Hepatocytes

F. Gagné* and C. Blaise

Environment Canada, St. Lawrence Centre, 105 McGill, Montréal
Québec, Canada, H2Y 2E7

Rainbow trout hepatocytes were used as an *in vitro* bioassay to assess the genotoxic potential of single chemicals and marine sediment extracts. Freshly prepared trout hepatocytes were exposed to either benzo[a]pyrene, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, β -naphthoflavone, or organic extracts of marine sediments for 24 h at 15°C. Genotoxicity was assayed using the nick translation assay, which makes use of a nonradioactive nucleotide (biotin-dUTP), and the DNA alkaline precipitation assay followed by fluorometric detection of DNA strands. Exposure to benzo[a]pyrene or methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, known indirect- and direct-acting genotoxins respectively, produced genotoxicity to rainbow trout hepatocytes with both assays. β -Naphthoflavone displayed genotoxic activity in trout hepatocytes. Sediment extracts and reference sediment extracts displayed high toxicity and genotoxicity to trout hepatocytes. Chemical analyses showed that these sediments contained significant amounts of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, and polycyclic aromatic hydrocarbons. Cell toxicity was correlated with total levels of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls but not total levels of polycyclic aromatic hydrocarbons. No positive correlation was found with the nick translation assay between total levels of chemicals and genotoxicity in marine sediments. Genotoxicity obtained with the alkaline precipitation assay was correlated with levels of the organochlorine pesticide DDT. However, more tests would be required to further substantiate possible links with other specific chemicals. © 1995 by John Wiley & Sons, Inc.

INTRODUCTION

Chemical contaminants enter fresh and salt waters from municipal, agricultural, and industrial origins. Thousands of chemicals can be present in the aquatic biota, water column, and sediments (Babich and Borenfreund, 1991; Malins et al., 1984). Some of these chemicals are very stable, or persistent, while others are more susceptible to chemical or physical transfor-

mation. These chemicals along with their biodegradation products can accumulate in the environment, and potentially threaten the integrity of the ecosystem, as well as human health.

Fish are widely used as test organisms to assess the potential danger of wastewaters that ultimately reach the aquatic ecosystem. Standard protocols exist for evaluating the acute toxicity (LC₅₀ 96 h) of industrial wastewaters (e.g., Environment Canada, 1990a). While using fish as test organisms in toxicity evaluations of complex mixtures is warranted, this approach is time-consuming and costly, and requires live organ-

* To whom correspondence should be addressed.

isms for toxicity testing. Furthermore, there is increasing pressure from the ethical point of view to limit the use of animals in toxicological evaluations. Hence, alternative methods are required that exploit the use of *in vitro* cell systems. For example, rainbow trout gonad fibroblasts, primary cultures of trout hepatocytes, goldfish-scale cells, and bluegill sunfish fibroblasts are useful for toxicity evaluation of chemicals (Baksi and Frazier, 1990; Babich and Borenfreund, 1991; Saito et al., 1991). Primary cultures of rainbow trout hepatocytes are especially useful because they abound in metabolizing enzymes, particularly the cytochrome P-450 multienzymatic system (Pesonen et al., 1992). Several polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), like benzo[a]pyrene (BaP), and dioxins and furans require oxidative metabolism by the cytochrome P4501A1 system to become genotoxic. In some cases, this metabolism bioactivates these compounds into electrophiles that can bind with macromolecules like proteins, RNA and especially DNA.

Evaluation of genotoxic potential using fish cell systems is therefore relevant for screening the potential danger of complex mixtures. Genotoxic activity may be assayed at the molecular level using the DNA adducts assay (Masfaraud et al., 1992), unscheduled DNA synthesis (Weisburger and Williams, 1991), and the alkaline DNA unwinding assay (Olive et al., 1988); and at a higher level of organization, the micronucleus, chromosome aberration, and sister chromatid exchange assays (Al-Sabti and Hardig, 1990; Means et al., 1988; Lobillo et al., 1991).

Single-stranded breaks can be examined using the principle of nick translation of DNA (Snyder and Matheson, 1985) with DNA polymerase I (Pol I). This assay is thought to be highly sensitive because of the displacement of the breaks by the action of Pol I, resulting in higher amounts of nucleotide incorporation in the DNA relative to the initial size of single-stranded breaks. This assay originally used radioactive thymidine for detection of DNA damage. Similarly, double- and single-stranded breaks can be examined using the alkaline precipitation assay, a simplified version of the alkaline DNA unwinding assay (Olive, 1988). This assay also makes use of radionucleotides for detection of DNA damage but is rapid and cost efficient and can be easily adapted to different tissue types. The use of nonradioactive nucleotides for detection of DNA strands will greatly improve the flexibility of these tests in aquatic environmental toxicology studies.

The purpose of this study therefore was to use a rainbow trout hepatocyte model to investigate the cytotoxic and genotoxic potential of complex mixtures like organic extracts of marine sediments. Cytotoxicity was investigated using the propidium iodide exclu-

sion test with flow cytometry. Genotoxic activity was assayed using a modified nick translation assay with a nonradioactive nucleotide (biotin-dUTP) and flow cytometry technology, and an alkaline DNA precipitation assay with detection of DNA strands by fluorescence. An attempt was made to find possible correlations between chemical data and genotoxicity or cell toxicity using these assays applied to organic extracts of marine sediment.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Phosphate buffered saline (Dulbecco's PBS), calcium chloride, β -naphthoflavone (β -NF), BaP, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), collagenase type IV, fetal bovine serum (FBS), gentamycin sulfate, trypan blue, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Liebovitz medium (L-15), sodium citrate, tris-(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), Tween-20, digitonin, dimethylsulfoxide (DMSO), dithiothreitol (DTT), bovine serum albumin (BSA), sodium dodecylsulphate (SDS), hoescht 33258, deoxyribonuclease 1 (DNase), ribonuclease A, Pol I, and propidium iodide (PI) were purchased from Sigma Chemical Co. Biotin-16-dUTP, streptavidin-fluorescein, dCTP, dATP, dGTP, and dTTP were obtained from Boehringer Mannheim.

Preparation of Marine Sediment Extracts

Organic phase extracts of marine sediment were studied for their (cyto)genotoxic potential. Thirty grams of sediment were extracted in dichloromethane ($V = 15$ mL); the liquid organic phase was decanted, dried under a nitrogen stream, and resuspended in 1 mL of DMSO (100% v/v). Chemical analyses were performed for organochlorine pesticides (OCs), polychlorinated biphenyl congeners (PCBs), chlorobenzenes (CB), and PAHs. For a complete description of chemicals analyzed, refer to the caption in Table III. These chemicals were quantified using established methods (Oliver and Niimi, 1988; Oliver and Nicol, 1982; Environmental Protection Agency, 1986) under a quality control and assurance program (Fouquet, 1994, report in preparation) in order to ensure the validity and pertinence of the data.

Preparation and Exposure of Rainbow Trout Hepatocytes

Primary cultures of rainbow trout hepatocytes were prepared according to the double perfusion methodology of Klauning et al. (1985), with some modifications.

After a portal vein perfusion with sterile PBS (without calcium), pH 7.5, containing 1 mM glucose, 0.3 mM pyruvate, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amphotericin B, 2 mg/mL BSA, and 5 mM EDTA, the liver was perfused with 10 mL of collagenase (100 units in PBS with 1 mM CaCl_2 and no EDTA) and removed from the abdominal cavity. The liver was cut into small slices and mixed continually in 50 mL collagenase solution (100 units/mL) for 20 min at room temperature. Afterwards the cells were liberated from the tissue with a cell dissociation sieve kit (Sigma Chemical Co.). The cells were then washed 4 times by centrifuging at $200\times g$ for 2 min and resuspended in sterile PBS without calcium and EDTA. The cells were counted and cell viability was estimated by the trypan blue exclusion test (Klauning et al., 1985). Typical cell yields were around $(2.3 \pm 0.5) \times 10^6$ cells/g body weight with a viability of $95 \pm 2\%$ (derived from $n = 50$ isolations). The cells were resuspended in 4 mL of sterile L-15 containing 1% FBS, 25 $\mu\text{l}/\text{mL}$ gentamycin sulfate, and 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amphotericin B (referred to as complete medium). For each evaluation of chemicals and organic sediment extracts, cells obtained from 5 yearling individuals were pooled before exposure.

The hepatocytes were distributed in 24-well microplates (cell culture treated, obtained from Corning) at a density of 1×10^6 viable cells/mL of complete medium. These were exposed to several dilutions of organic sediment extracts (0, 0.001, 0.01, 0.1, and 1% v/v). Control cells (i.e., unexposed cells) for sediment extract samples received the appropriate amount of DMSO (1% v/v). Hepatocytes were exposed for 24 h at 15°C to the sediment extracts and single chemicals: Cd (0, 25, 50, 75, 100, and 200 ng/mL), BaP (0, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 ng/mL), MNNG (0, 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and β -NF (0, 25, 50, 75, 100, and 200 ng/mL).

Cell Viability Evaluation

Cell viability was assayed by flow cytometry using the PI exclusion test (Zucker et al., 1988). In order to favor single-cell hepatocyte suspension for flow cytometry analysis, cells were treated with a calcium chelator, sodium citrate, during the washing step. After the exposure period, cells were centrifuged at $200\times g$ for 5 min, the cell media removed, and the cells were resuspended in 200 μL solution saline citrate (SSC: 150 mM NaCl and 15 mM sodium citrate, pH 7.2). An aliquot of washed cells (50×10^4 cells) was incubated in the presence of PI (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in PBS for 10 min at room temperature. The cells were analyzed by flow cytometry as described below. The proportion of viable cells relative to exposure treatments was calculated using digitonin-permeabilized cells as a positive

control. The same amount of cells were treated with one volume of 0.02% digitonin in PBS for 5 min, incubated with PI for 10 min, and analyzed by flow cytometry. The percentage of live cells was calculated as follows:

$$\begin{aligned} \text{Proportion of live cells (\%)} \\ = [1 - (X - A)/B - A] \times 100 \end{aligned}$$

where X is the proportion of stained cells in the exposed group, A is the proportion of stained cells in the unexposed group, and B is the proportion of stained cells in the digitonin-treated group.

In situ Nick Translation Assay

Intracellular repair of single-stranded nicks on genomic DNA was achieved using a modification of the method of Snyder and Matheson (1985). Our approach makes use of nonradioactive nucleotide, cell fixation, and flow cytometry technology. After the exposure period, the cells were washed in SSC as described above for 5 min. The cells were centrifuged ($200\times g$ for 4 min), the supernatant removed, and the cells fixed in 200 μL of 70% ethanol for 45 min at 4°C . The cells were then centrifuged as above and permeabilized with 0.1% Tween-20 in PBS for 15 min at room temperature. The cells were centrifuged and resuspended in 20 units of Pol I in a 50 mM Tris HCl buffer, pH 7.4, containing 10 mM DTT, 1 mM MgCl_2 , 0.1% BSA, and 50 μM of each of the nucleotides (dCTP, dTTP, dATP, dGTP). The reaction mixture also contained 10 μM of biotin-16-dUTP as the nucleotide analogue of dTTP and incubation was allowed to progress for 1 h at 37°C . After the incubation period, the cells were centrifuged and resuspended in 200 μL of PBS containing 0.1% Tween-20 and BSA for 5 min. The cells were centrifuged as described above and exposed to 1 μg of streptavidin-fluorescein in PBS containing 0.1% Tween-20 and BSA for 30 min at 37°C . The cells were then centrifuged and washed in PBS for 10 min and centrifuged again. The cells were finally resuspended in PBS containing 50 units/mL ribonuclease A and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI. The cells were incubated at room temperature for 30 min before flow cytometric analysis to allow degradation of cellular RNA. In some cases, 5 units of DNase along with Pol I were added to the reaction mixture to see whether any increased incorporation of biotin-16-dUTP into DNA was obtained.

Alkaline Precipitation Assay

Genotoxic damage to DNA was also assayed using the alkaline precipitation assay (Olive, 1988), with slight modifications. Detection of DNA breaks was made possible using the hoescht dye (West et al., 1985) in-

stead of tritium-labeled DNA with ^3H -thymidine. After exposure, the cells were washed in SSC (200 μL) for 5 min as described above. A subsample (150,000 cells) was taken for cell density evaluation (absorbance at 600 nm) and for the alkaline precipitation assay. The blanks and standards contained the equivalent volume of SSC without hepatocytes. Cells were treated in a microcentrifuge tube with 250 μL of 2% SDS in 10 mM Tris and EDTA, pH 12.3, for 1 min. A solution of 250 μL of 0.12 M KCl was then added to the mixture, which was allowed to incubate at 60°C for 10 min. At the end of the incubation period, the mixture was placed in ice for 20 min and centrifuged at 8000 $\times g$ for 5 min. A 450 μL sample volume of the supernatant was carefully removed and mixed with 2550 μL of 75 mM KH_2PO_4 buffer, pH 7.0, containing 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of hoescht. Fluorescence analysis consisted in reading emission intensity at 460 nm while exciting at 350 nm with bandpasses of 10 nm. Quantitation was done using known amounts of salmon sperm DNA in the same mixture without addition of cells.

Flow Cytometric Analysis

Flow cytometric measurements were performed with a FASCan flow cytometer (Becton-Dickinson) equipped with an analytical flow cell, argon (blue) laser emitting at 488 nm at 15 mW. The data from 5000 gated cells were recorded, analyzed, and stored with the Lysis II software program. The cells were gated according to the forward (fsc) and orthogonal light scatter (ssc detector) characteristics to isolate the population from smaller particles. The fsc detector was set at -1 exponential in log scale and the ssc detector was set at 200 volts (V).

The detector for fluorescein emission (500–550 nm, fl-1 detector) was set at 400 V and the channel number, at 1024 for maximum resolution. The cells were aspirated into the flow cytometer and 5000 cells were collected. A second gate was constructed so that DNA-containing cells were analyzed for fluorescein emission. The data were reported in a two-dimensional plot: cell volume (forward light scatter) on the y axis and fluorescence emission on the x axis. For analysis, the fluorescence cell distribution was gated in unexposed cells in order to measure a shift in cells having higher fluorescence.

For cell viability measurement, the detector pertaining to DNA-propidium iodide complex fluorescence (620 nm, fl-3 detector) was set at 275 V and the channel number, at 256. Unexposed cells were aspirated, analyzed, and reported in a two-dimensional plot: forward light scatter on the y axis and red fluorescence on the x axis. A second gate was constructed in

order to analyze the number of cells that became more fluorescent (i.e., cells that did not exclude PI dye).

Statistical Analysis

The cells were exposed to pure compounds (BaP, MNNG, and β -NF) and marine sediment organic extracts in quadruplicate. The flow cytometric data (mean fluorescence of 5000 cells population) were subjected to a Barlett's homogeneity of variance test and a normality test. When variances were homogeneous, the data were subjected to an analysis of variance, and critical differences between unexposed and exposed cells were determined using the Dunnett's t test. In some cases, the variances were not homogeneous and the data were not normal so that nonparametric Kruskal-Wallis analysis of variance was performed and critical difference between control and treatment was appraised by a distribution-free multiple comparison test (Dunn's test). Significance was set at $p \leq 0.05$ in both cases. The lowest observable effect concentration in % v/v (LOEC) and the no observable effect concentration in % v/v (NOEC) were therefore determined. A toxicity threshold (TT) was calculated as $\text{TT} = (\text{NOEC} \times \text{LOEC})^{1/2}$. Finally, concentration data were expressed in toxicity units (TU) derived from the following equation: $\text{TU} = 100/\text{TT}$. This transformation establishes direct proportionality between the concentration data (TU) and toxicity intensity. Correlations between total levels of chemicals and cytotoxic effects were computed using the Pearson product-moment correlation coefficient. Significance of the correlation coefficient was set at $p < 0.05$ and marginal significance, at $0.1 < p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Nick Translation of Intracellular DNA

An intracellular DNA repair methodology following the principle of nick translation is described. Pol I will fill in the nicks produced by DNA-damaging agents by adding nucleotides (5' to 3'-DNA dependent polymerase activity) and translating them along the DNA molecule (5' to 3'-exonuclease activity). Therefore Pol I will incorporate considerably more nucleotides, particularly biotin-16-dUTP, than the number of thymidine nucleotides in the initial nicks provided that no significant steric hindrance limits its accessibility. Fixation of cells with ethanol followed by a permeabilization step is required to preserve cell morphology and to facilitate diffusion of Pol I into the nuclear compartment. Fixation with 4% formaldehyde (in PBS) is not recommended because of limited diffusion of Pol I in

cells. Formaldehyde forms cross-links within the molecular sites in cells and restricts diffusion of Pol I to the nuclear compartment. Indeed, it has been found that formaldehyde fixation requires a 12 h enzyme incubation with Pol I (Gold et al., 1993), while ethanol fixation followed by a rehydration/permeabilization step requires only 0.5–2 h of incubation time, as demonstrated in this study. When hepatocytes were incubated with Pol I with biotin-16-dUTP or fluorescein-12-dUTP for 1 h at 37°C, significant incorporation was obtained relative to cells without addition of Pol I (Table I). Moreover, the addition of DNase to the reaction mixture along with Pol I significantly increased the incorporation of nucleotides into cells as shown by the high relative fluorescence value (Table I). DNase was added sometimes with Pol I to double-stranded DNA to produce nicks and permit Pol I to incorporate nucleotides and translate the nick. The nick translation assay can detect single-stranded breaks or nicks in the DNA molecule (Snyder and Matheson, 1985), which are considered early damaging effects (Fenech, 1993). Because Pol I requires a complementary strand for nucleotide incorporation (or nick repair) and translation of the nick, this assay is not capable of detecting damage such as double-stranded nicks and single-stranded conformations in DNA. The inclusion of a second test, the alkaline precipitation assay, which can detect double-stranded strand breaks and possibly single-stranded conformations because of their potential fragility, can prove useful in some situations. In some cases, with highly toxic compounds, significantly less biotin-16-dUTP can be incorporated in cells relative to unexposed ones and at the same time can show some effect with the alkaline precipitation assay. These results suggest that the type of damage may be double-

stranded breaks, single-stranded conformation regions, or a DNA adduct uncleavable by Pol I exonuclease activity. This phenomenon was observed when significant cell viability reduction was obtained. Therefore, lower fluorescence values relative to control cells can be also indicative of genotoxicity. Formation of single-stranded nicks can also occur during apoptotic cell death (Gold et al., 1993). The two assays described in this paper can also detect this phenomenon. Apoptosis, although producing DNA damage, is not chemically induced genetic damage, but some chemicals can induce apoptosis in cells, hence DNA damage. Apoptotic cells have degraded DNA, and lower DNA levels (PI staining of cells) can be indicative of this phenomenon. Evaluation of DNA content in hepatocytes is therefore necessary to take into account this type of DNA damage.

Exposure of Trout Hepatocytes to Single Compounds

Exposure of cells to BaP, a well-known genotoxic/carcinogenic xenobiotic, elicited a genotoxic response with the nick translation assay (LOEC = 100 ng/mL) and the DNA alkaline precipitation assay (LOEC = 100 ng/mL), as shown in Fig. 1A and B. BaP must be converted into the diol metabolite to exercise its genotoxic effects. Similarly, cells exposed to MNNG, a direct-acting genotoxic compound, shows genotoxicity with both assays: LOEC = 50 µg/mL for the nick translation assay and LOEC = 100 µg/mL for the DNA alkaline precipitation assay (Fig. 2A and B). BaP is about 1000 times more potent in eliciting DNA damage to hepatocytes than is MNNG.

Exposure of cells to β-NF for 48 h was shown to be genotoxic with both assays (Fig. 3A and B). A LOEC value of 100 ng/mL was obtained in each case. The aromatic hydrocarbon β-NF is a specific and potent inducer of the cytochrome P4501A1 responsible for biotransformation of xenobiotics (Pesonen et al., 1992). However, the mutagenic potential of β-NF was not clearly established in earlier work (McKillop and Case, 1991). According to our results, β-NF is genotoxic to trout hepatocytes exposed in vitro. Cd was also genotoxic to trout hepatocytes with the two assays, with a TT = 122 ng/mL after a 48 h exposure time (results not shown).

Toxicity Evaluation of Marine Sediment Organic Extracts

The genotoxic potential of organic extracts of marine sediments taken from an Atlantic harbor site was also evaluated in this study (Table II). The results of chemi-

TABLE I. In situ nick translation of DNA

Conditions	Relative Fluorescence (f11/f13)
Cells and PI	10 ± 5
Cells, streptavidin-fluorescein, and PI	95 ± 7
Cells, streptavidin-fluorescein, biotin-dUTP, and PI	95 ± 8
Cells, ^a streptavidin-fluorescein, biotin-dUTP, Pol I, and PI	225 ± 12
Cells, ^a streptavidin-fluorescein, biotin-dUTP, Pol I + DNase, ^b and PI	418 ± 30

^a Cells treated with 200 ng/mL BaP for 48 h at 15°C.

^b DNase: Deoxyribonuclease I.

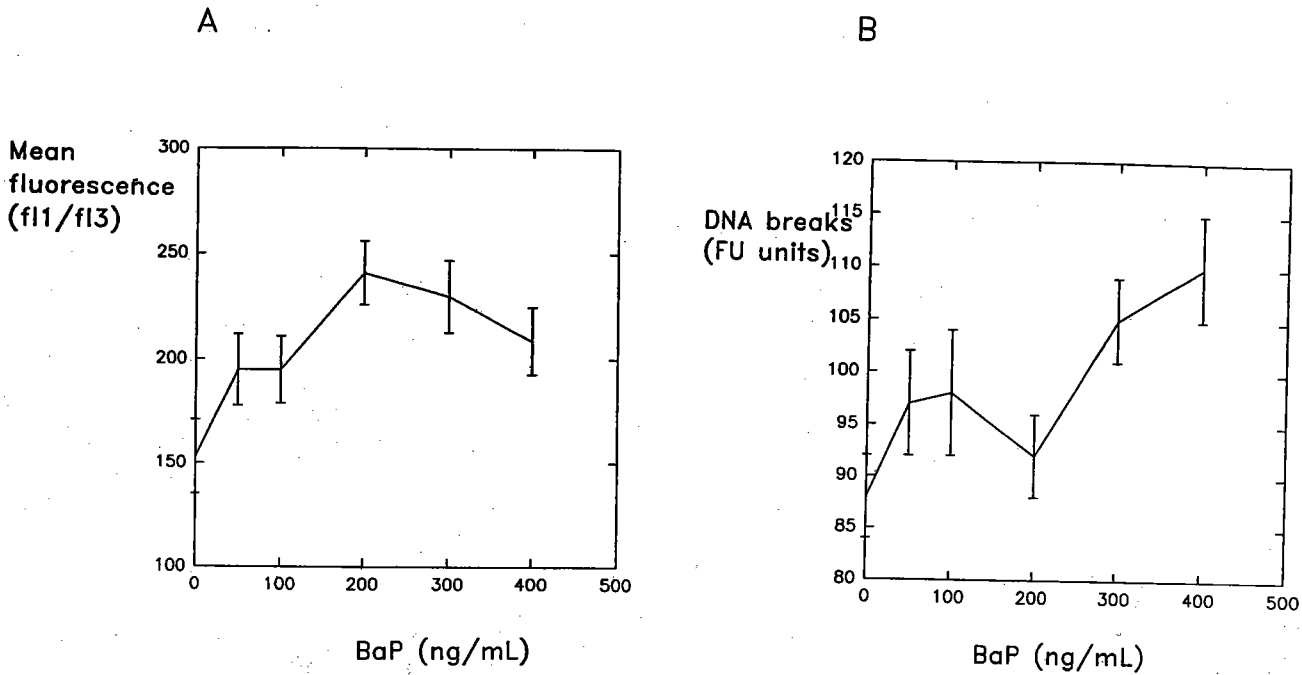


Fig. 1. Genotoxic potential of BaP evaluated with the nick translation and DNA alkaline precipitation assays. Rainbow trout hepatocytes were exposed to BaP for 24 h at 15°C and DNA damage was assayed with the nick translation (A) and the DNA alkaline precipitation (B) assays. Data points represent the mean with the standard error from 4 replicates.

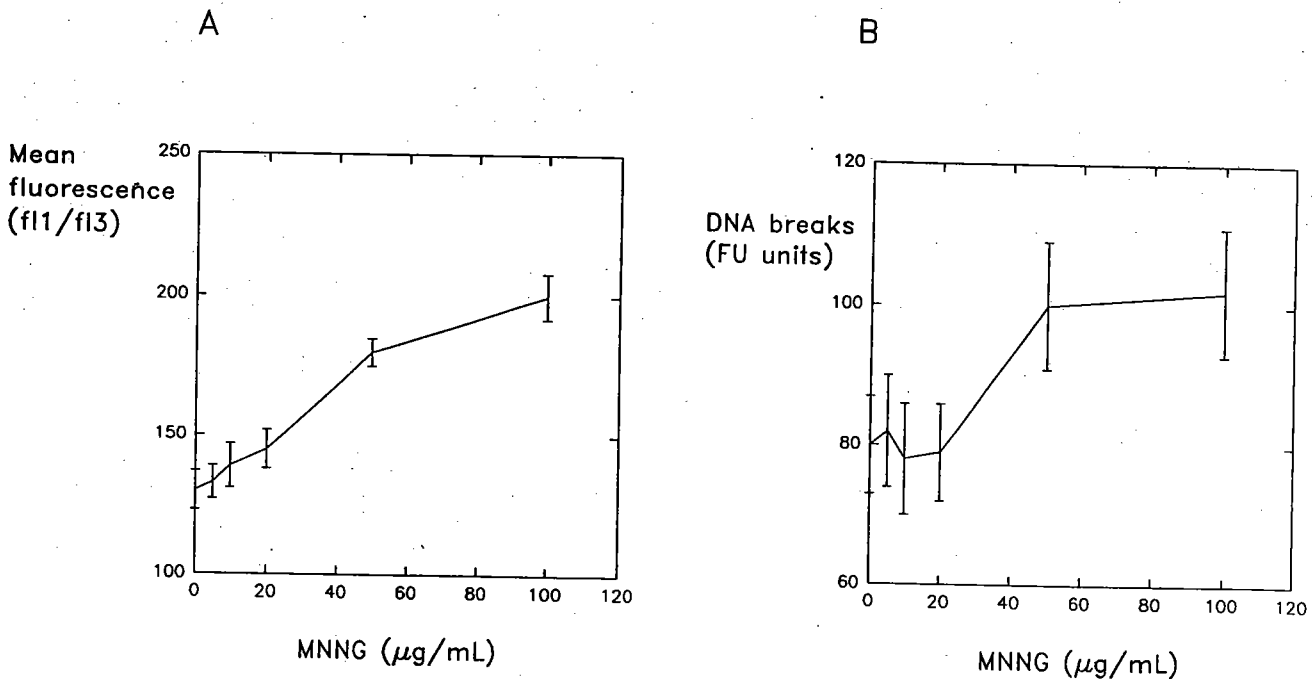


Fig. 2. Genotoxic potential of MNNG evaluated with the nick translation and DNA alkaline precipitation assays. Rainbow trout hepatocytes were exposed to MNNG for 24h at 15°C and DNA damage was assayed with the nick translation (A) and the DNA alkaline precipitation (B) assays. Data points represent the mean with the standard error from 4 replicates.

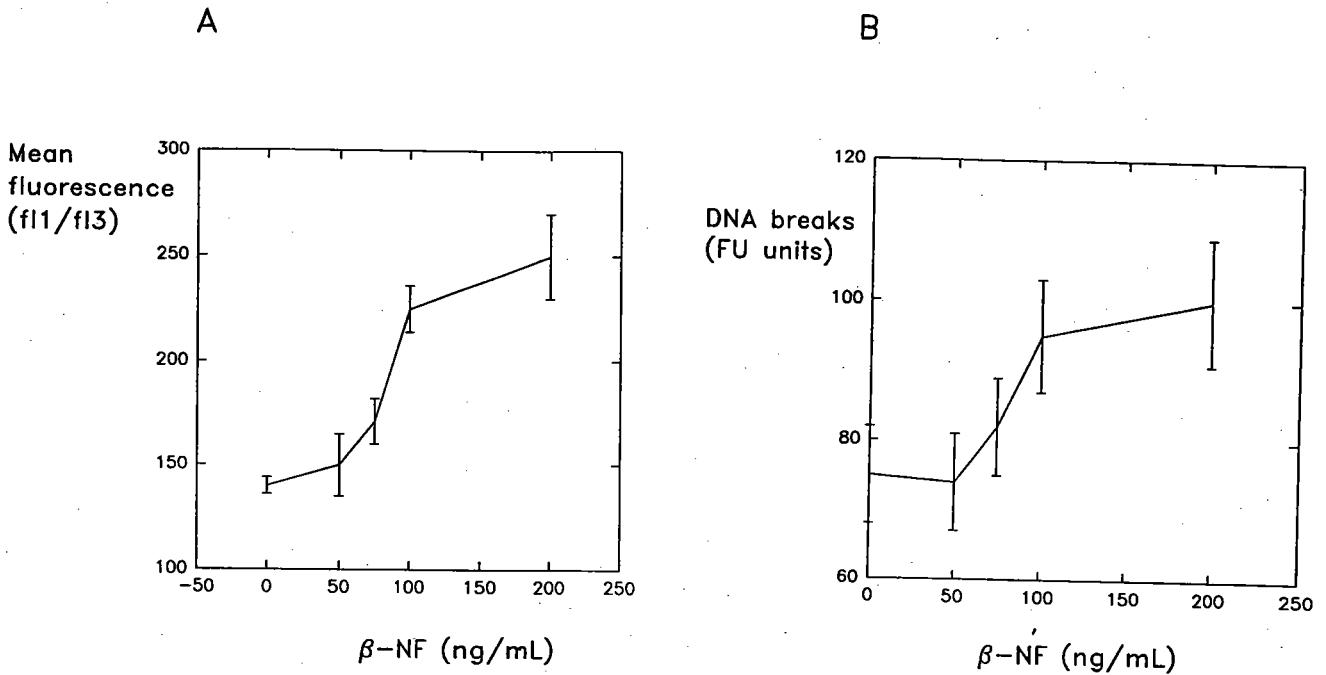


Fig. 3. Genotoxic potential of β -NF evaluated with the nick translation and DNA alkaline precipitation assays. Rainbow trout hepatocytes were exposed to β -NF for 24 h at 15°C and DNA damage was assayed with the nick translation (A) and the DNA alkaline precipitation (B) assays. Data points represent the mean with the standard error from 4 replicates.

cal analyses performed on these extracts are shown in Table III. Samples 1–8 represent randomly collected sediment from the harbor site and Samples 9–12 repre-

TABLE II. Toxicological characteristics of marine sediment organic extracts

Sediment Extract No.	Viability TU	Nick Translation TU	Alkaline Precipitation TU
1	320	nd ^a	nd
2	32,000	32,000	32,000
3	320	nd	320
4	3200	32,000	3200
5	320	32,000	32,000
5	320	nd	32,000
7	3200	nd	nd
8	320	320	nd
9	3200	nd	nd
10	320	3200	nd
11	32,000	3200	nd
12	320	3200	3200
13	320	nd	nd
14	nd	nd	nd

^a No effect was measured hence not determined (nd).

sent reference sediment extracts with known amounts of organochlorine pesticides (OCs), polychlorinated biphenyl congeners (PCBs), and PAHs. Sample 13 was clean sand extracted with dichloromethane. Sample 14 was dichloromethane only (i.e., without sediment) followed by an exchange in DMSO as described in Materials and Methods. Almost all extracts (93%) were toxic to cells except for the blank Sample 14. Samples 2 and 11 displayed the highest cytotoxicity with a TT of 32,000 TU, while Samples 4, 7, and 9 showed moderate toxicity with a TT of 3200 TU. The remaining extracts (Samples 1, 3, 5, 6, 8, 10, 12, and 13) displayed toxicity with a TT of 320 TU. Genotoxic activity was observed in 7 out of the 14 samples (50%) with the nick translation assay and 6 extracts out of 14 samples (42%) with the DNA alkaline precipitation assay. Nine of the 14 samples tested (64%) displayed a genotoxicity response with one or both the genotoxic end points used. Other studies have also shown that organic phase extracts from freshwater sediments proved to be mutagenic with the Ames test and contained detectable amounts of OCs, PAHs, and PCBs (Metcalf et al., 1990; Maccubin and Ersing, 1991; Langevin et al., 1992).

Correlation tests were done to identify possible trends or links between the total levels of chemicals and toxicity (Table IV). Considering Samples 1–8 from

TABLE III. Chemical characteristics of marine sediment extracts

Sample	PCB ^a (ng/g)	PAH ^b (μg/g)	OC ^c (μg/g)
1	Congener 101 0.23	Phenanthrene 0.04	DDE 0.13
	118 0.16	Fluoranthrene 0.06	T: 0.13
	153 0.21	Pyrene 0.05	
	105 0.03	T: 0.15	
	138 0.36		
	183 0.12		
	180 0.37		
	170 0.07		
	194 0.12		
	T ^d : 14.07		
	Aroclor 1242 5.4		
Aroclor 1260 7			
2	Congener 101 0.11	nd ^e	DDE 0.12
	118 0.2		T: 0.12
	153 0.11		
	105 0.02		
	138 0.16		
	180 0.04		
	170 0.09		
	T: 0.73		
	Aroclor 1242 2.7		
	Aroclor 1260 1.7		
3	Congener 101 1.2	Naphtalene 0.06	DDE 0.07
	118 1	2-methylnaphtalene 0.04	DDT(o,p') 0.54
	153 1.3	Acenaphtalene 0.06	T: 0.61
	105 0.12	Fluorene 0.08	
	138 1.7	Phenanthrene 0.25	
	183 0.27	Anthracene 0.13	
	128 0.1	Fluoranthrene 0.72	
	180 1.3	Pyrene 0.56	
	170 0.16	Benz(a)anthracene 0.09	
	194 0.24	Chrysene 0.1	
	T: 7.39	Benzo(b)fluoranthrene 0.08	
	Aroclor 1242 36	Benzo(k)fluoranthrene 0.09	
	Aroclor 1254 27	Benz(a)pyrene 0.12	
	Aroclor 1260 13	T: 2.38	
	4	Congener 101 1.1	Naphtalene 0.04
118 0.55		Phenanthrene 0.1	DDD(o,p') 0.26
153 0.99		Anthracene 0.04	DDD(p,p') 0.57
105 0.1		Fluoranthrene 0.17	T: 1.22
138 1.2		Pyrene 0.14	
183 0.15		Chrysene 0.04	
128 0.07		T: 0.53	
180 0.45			
170 0.12			
194 0.09			
T: 4.61			
Aroclor 1242 18			
Aroclor 1254 9.3			
Aroclor 1260 5.6			

TABLE III. (Continued)

Sample	PCB ^a (ng/g)	PAH ^b (μg/g)	OC ^c (μg/g)	
5	Congener 101 0.62	Naphtalene 0.04	DDE 0.39	
	118 0.33	Phenanthrene 0.1	DDD(o,p') 0.26	
	153 0.52	Anthracene 0.04	DDD(p,p') 0.57	
	105 0.12	Fluoranthrene 0.17	T: 1.22	
	138 0.92	Pyrene 0.14		
	183 0.1	Chrysene 0.04		
	128 0.07	T: 0.5		
	180 0.35			
	170 0.08			
	194 0.11			
	T: 3.22			
	Aroclor 1242 18			
	Aroclor 1254 9.3			
Aroclor 1260 5.6				
6	Congener 101 0.19	Naphtalene 0.04	DDE 8.3	
	118 0.33	2-methylnaphtalene 0.17	DDD(o,p') 1	
	153 0.14	Phenanthrene 0.11	DDT(o,p') 9.2	
	105 0.04	Anthracene 0.04	DDD(p,p') 19	
	138 0.27	Fluoranthrene 0.12	DDT(p,p') 12	
	180 0.08	Pyrene 0.10	T: 49.5	
	170 0.06	Benzo(k)fluoranthrene 0.04		
	T: 1.11	Benz(a)pyrene 0.05		
	Aroclor 1242 4.1	T: 0.67		
	Aroclor 1254 1.3			
	Aroclor 1260 1.9			
	7	Congener 101 0.66	Phenanthrene 0.11	DDE 0.6
		118.059	Anthracene 0.05	DDD(o,p') 0.6
153 0.39		Fluoranthrene 0.53	DDD(p,p') 1.9	
105 0.15		Pyrene 0.45	T: 3.1	
138 0.64		Benz(a)anthracene 0.13		
183 0.08		Chrysene 0.12		
128 0.03		Benzo(b)fluoranthrene 0.14		
180 0.27		Benzo(k)fluoranthrene 0.12		
170 0.04		Benz(a)pyrene 0.13		
194 0.09		T: 1.78		
T: 2.94				
Aroclor 1242 22				
Aroclor 1260 8.1				
8	Congener 101 0.38	Naphtalene 0.07	DDE 0.49	
	118 0.77	2-methylnaphtalene 0.04	DDD(o,p') 0.2	
	153 0.43	Acenaphtalene 0.06	DDD(p,p') 0.34	
	105 0.16	Fluorene 0.08	T: 1.03	
	138 0.88	Phenanthrene 0.65		
	183 0.08	Anthracene 0.2		
	128 0.07	Fluoranthrene 0.74		
	180 0.28	Pyrene 0.73		
	170 0.07	Benz(a)anthracene 0.2		

TABLE III. (Continued)

Sample	PCB ^a (ng/g)	PAH ^b (μg/g)	OC ^c (μg/g)
	194 0.05	Chrysene 0.24	
	T: 3.17	Benzo(b)fluoranthrene 0.11	
	Aroclor 1242 5.3	Benzo(k)fluoranthrene 0.34	
	Aroclor 1254 3.7	Benz(a)pyrene 0.3	
	Aroclor 1260 4.2	Indenolpyrene 0.14	
		Benzo(ghi)perylene 0.15	
		T: 4.05	
9	Congener 101 1.1	Naphtalene 3.6	DDE 6.1
	118 1	2-methylnaphtalene 1.2	DDD(p,p') 13
	153.17	1-methylnaphtalene 1	T: 18.1
	105 0.27	Acenaphtalene 1.9	
	138 1.9	Fluorene 4.9	
	183 0.12	Phenanthrene 51	
	128 0.2	Anthracene 5	
	180 1.2	Fluoranthrene 32	
	170 0.56	Pyrene 21	
	194 0.4	Benz(a)anthracene 5.8	
	T: 8.45	Chrysene 7.6	
	Aroclor 1254 20	Benzo(b+k)fluoranthrene 7.3	
	Aroclor 1260 12	Benz(a)pyrene 2.9	
		Indenolpyrene 1.7	
		Benzo(ghi)perylene 1.5	
		T: 150.1	
10	Congener 101 3.8	Naphtalene 0.05	DDE 1.5
	118 3.5	Acenaphtalene 0.04	DDD(p,p') 10
	153 4.9	Fluorene 0.06	T: 11.5
	105 1.8	Phenanthrene 0.85	
	138 7.8	Anthracene 0.06	
	183 0.78	Fluoranthrene 1.5	
	128.76	Pyrene 1.1	
	180 4.2	Benz(a)anthracene 0.38	
	170 1.7	Chrysene 0.66	
	194 0.58	Benzo(b+k)fluoranthrene 0.97	
	T: 29.82	Benz(a)pyrene 0.24	
	Aroclor 1242 18	Indenolpyrene 0.23	
	Aroclor 1254 92	Benzo(ghi)perylene 0.24	
	Aroclor 1260 41	T: 6.38	
11	Congener 101 15	Naphtalene 0.1	DDE 38
	118 5	2-methylnaphtalene 0.1	DDD(o,p') 72
	153 15	Acenaphtalene 0.05	DDD(p,p') 160
	105 7.9	Fluorene 0.15	T: 270
	138 37	Phenanthrene 2.7	
	183 5	Anthracene 0.24	
	128 4.7	Fluoranthrene 3.8	
	180 36	Pyrene 3	
	170 12	Benz(a)anthracene 1.1	
	194 4.9	Chrysene 1.6	

TABLE III. (Continued)

Sample	PCB ^a (ng/g)	PAH ^b (μg/g)	OC ^c (μg/g)
	T: 142.5 Aroclor 1254 216 Aroclor 1260 232	Benzo(b+k)fluoranthrene 2.3 Benz(a)pyrene 0.98 Indenolpyrene 0.53 Benzo(ghi)perylene 0.56 Dibenz(ah) Anthracene 0.23	
12	Congener 101 1 118 1.2 153.2 105 0.39 138 3.2 183 0.47 128 0.57 180 1.9 170 0.82 194 0.27 T: 11.82 Aroclor 1254 28 Aroclor 1260 20	Naphtalene 0.04 2-methylnaphtalene 0.04 Phenanthrene 0.32 Anthracene 0.04 Fluoranthrene 0.53 Pyrene 0.44 Benz(a)anthracene 0.22 Chrysene 0.29 Benzo(b+k)fluoranthrene 0.59 Benz(a)pyrene 0.36 Indenolpyrene 0.2 Benzo(ghi)perylene 0.2 Dibenz(ah)Anthracene 0.09 T: 3.36	DDE 21 DDD(p,p') 6.2 T: 27.2
13	nd	nd	nd
14	nd	nd	nd

^a PCB congeners assayed were 101, 77, 118, 153, 105, 138, 126, 183, 128, 180, 169, 170, 194, Aroclor 1016, 1242, 1248, 1254, 1260 and the following chlorobenzenes: o,m,p-dichlorobenzene, 1,3,5-trichlorobenzene, 1,2,4-trichlorobenzene, 1,2,3-trichlorobenzene, 1,2,4,5-tetrachlorobenzene, 1,2,3,5-tetrachlorobenzene, 1,2,3,4-tetrachlorobenzene, pentachlorobenzene and hexachlorobenzene.

^b PAHs assayed were naphtalene, 2-methylnaphtalene, 1-methylnaphtalene, acenaphtalene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthrene, pyrene, benz(a)anthracene, chrysene, benzo(b and k)fluoranthrene, benzo(a)pyrene, indenol(1,2,3-cd)pyrene, dibenzo(ah)anthracene, benzo(ghi)perylene, 1,2,3,4-tetrahydronaphtalene, and 2-chloronaphtalene.

^c Organochlorine pesticides assayed were heptachlor, aldrin, p,p'-DDE, Mirex, α-BHC, β-BHC, lindane, trans and cis chlordane, o,p'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DDD, p,p'-DDT, methoxychlor, a-endosulfan, dieldrin, endrin, oxychlordane, octochlorostyrene, photomirex.

^d total levels (T:).

^e nd: not detected.

the harbor site, significant correlation was obtained between cell viability effects and total OCs, (o,p),p'-DDE, p,p'-DDD, total PCBs, some PCB congeners, and Aroclor 1254 and 1260 levels. Genotoxicity assayed with the alkaline precipitation assay was correlated only with o,p'-DDT and p,p'-DDT levels. Interestingly, no correlation was found between genotoxicity evaluated with the nick translation assay and any compounds. These results suggest that compounds causing nicks may actually differ from those causing breaks. Other different chemicals or associations of chemicals may exercise their effects on cell viability and genotoxicity even though some OCs, PCBs, and PAHs are known to be genotoxic and carcinogenic (Sharma and Gautam, 1991; Walton et al., 1988; Houk and DeMarini, 1987). The verification of

the effects of individual chemicals within a complex mixture is clearly not an easy task.

Although the sample size of the reference sediment extracts was small (6), some positive correlations were obtained. OC levels were correlated with total PCB levels ($R = 0.957$; $p < 0.003$) and with cell toxicity ($R = 0.998$; $p < 0.001$). Moreover, total levels of PCBs were correlated with cell toxicity ($R = 0.942$; $p = 0.005$). More data from reference sediments would be necessary to further confirm a link between pesticide levels and genotoxicity. No correlations were observed between chemical concentration and the genotoxicity response. PAH levels seem not to vary with OC levels, total PCB levels, cell toxicity, nick translation, or DNA alkaline precipitation.

Since the chemical data for total PCBs, PAHs, and

TABLE IV. Correlations^a between chemical and toxicological data

Viability	APA ^b	NTA ^c
Total OCp (R = 0.522)	o,p'-DDT (R = 0.529)	NC ^d
Total PCB (R = 0.593)	p,p'-DDT (R = 0.529)	
PCB Congener 101 (R = 0.617)		
Congener 118 (R = 0.460) ^e		
Congener 153 (R = 0.593)		
Congener 105 (R = 0.635)		
Congener 138 (R = 0.631)		
Congener 183 (R = 0.636)		
Congener 128 (R = 0.637)		
Congener 180 (R = 0.656)		
Congener 194 (R = 0.646)		
p,p'-DDE (R = 0.628)		
o,p'-DDE (R = 0.673)		
p,p'-DDD (R = 0.650)		
Aroclor 1254 (R = 0.569)		
Aroclor 1260 (R = 0.638)		

^a Pearson product-moment correlation. Correlation is considered significant when R is positive with $p < 0.05$ or marginally significant at $0.1 < p < 0.05$.

^b APA: alkaline precipitation assay.

^c NTA: nick translation assay.

^d NC: no correlation was obtained.

^e Marginally significant.

OCs do not correlate with genotoxic activity in marine sediment extracts, we can propose the hypothesis that the genotoxic response is more specific.

Conclusion

A rainbow trout hepatocyte genotoxicity assay for the evaluation of environmental samples is described. This assay seems to be very sensitive for detection of genotoxicity in marine sediment organic extracts. This

study confirmed positive and significant trends between total levels of DDT and genotoxicity obtained with the alkaline precipitation assay. Trends between OCs and PCBs and cell toxicity were also observed. Further studies will be required to substantiate genotoxic potency in relation to total OCs, PCBs, and PAHs in reference sediment extracts.

The authors are grateful to Sylvain Trottier for performing the assays on marine sediment organic extracts. The helpful comments of Joan Dyer for the preparation of the manuscript are acknowledged. The support of the management of the St. Lawrence Centre, Conservation and Protection, Environment Canada, Quebec, is recognized.

REFERENCES

- Al-Sabti, K., and J. Hardig. 1990. Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects from industrial waste products in the Baltic Sea, Sweden. *Comp. Biochem. Physiol.* **97C**:179-182.
- Babich, H., and E. Borenfreund. 1991. Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: a review. *Toxicol. in Vitro* **5**:91-100.
- Baksi, S. M., and J. M. Frazier. 1990. Isolated hepatocytes—model systems for toxicology research. *Aquat. Toxicol.* **16**:229-259.
- Environment Canada. 1990. Biological Test Method, Acute Lethality Test Method Using Rainbow Trout. Conservation and Protection, Environment Canada, Ottawa, Report No. EPS I/RM/9.
- Environmental Protection Agency. 1986. Test Methods for Evaluating Solid Waste. Volume 1B: Laboratory Manual Physical/Chemical Methods, method 3540, 7 p.
- Fenech, M. 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.* **285**:35-44.
- Fouquet, A. 1994. Directives d'assurance et contrôle de la qualité pour l'analyse de substances organiques dans différents milieux. Methodological report. St. Lawrence Centre, Environment Canada, Quebec Region, 80 p.
- Gold, R., M. Schmied, G. Rothe, H. Zischler, H. Breitschopf, H. Wekerle, and H. Lassmann. 1993. Detection of DNA fragmentation in apoptosis: Application of In situ nick translation to cell culture systems and tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* **41**:1023-1030.
- Houk, V. S., and D. M. DeMarini. 1987. Induction of pro-phage lambda by chlorinated pesticides. *Mutat. Res.* **182**:193-201.
- Klauning, J. E., R. J. Ruch, and P. J. Goldblatt. 1985. Trout hepatocyte culture: Isolation and primary culture. *In Vitro Cell. Devel. Biol.* **21**:221-228.
- Langevin, R., J. B. Rasmussen, H. Sloterdick, and C. Blaise. 1992. Genotoxicity in water and sediment extract

- from the St. Lawrence river system, using the SOS Chromotest. *Water Res.* **26**:419-429.
- Lobillo, J., J. V. Delgado, and A. Rodero. 1991. Sister chromatid exchange test detection of toxin-induced damage in cultured fish. *Gen. Sel. Evol.* **23**:160S-162S.
- Maccubin, A. E., and N. Ersing. 1991. Mutagenic potential of sediments from the Grand Calumet river. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **47**:308-315.
- Malins, D. C., B. B. McCain, D. W. Brown, S. L. Chan, M. S. Meyers, J. T. Landhal, P. G. Prohaska, A. J. Freidman, L. D. Rhodes, D. G. Burrows, W. D. Gronlund, and H. O. Hodkins. 1984. Chemical pollutants in sediments and diseases of bottom-dwelling fish in Puget Sound, Washington. *Environ. Sci. Techn.* **18**:705-713.
- Masfaraud, J.-F., A. Pfohl-Leszkowic, C. Malaveille, G. Keith, and G. Monod. 1992. 7-Ethylresorufin O-deethylase activity and level of DNA adducts in trout treated with benzo[a]pyrene. *Marine Environ. Res.* **34**:352-354.
- McKillop, D., and D. E. Case. 1991. Commentary—Mutagenicity, carcinogenicity and toxicity of β -naphthoflavone, a potent inducer of P448. *Biochem. Pharmacol.* **41**:1-7.
- Means, J. C., C. B. Daniels, S. M. Baksi, J. J. Stegeman, and M. N. Moore. 1988. Development of in vivo genotoxicity tests in estuarine fish and their application to aquatic toxicology. *Marine Environ. Res.* **24**:327-331.
- Metcalfe, C. D., G. C. Balch, V. W. Cairns, J. D. Fitzsimons, and B. P. Dunn. 1990. Carcinogenic and genotoxic activity of extracts from contaminated sediments in western Lake Ontario. *Sci. Total Environ.* **94**:125-141.
- Olive, P. L. 1988. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ. Mol. Mutagen.* **11**:487-495.
- Olive, P. L., A. P. S. Chan, and S. S. Cu. 1988. Comparison between the DNA precipitation and alkaline unwinding assays for detecting strand breaks and cross-links. *Cancer Res.* **48**:6444-6449.
- Oliver, B. G., and K. D. Nicol. 1982. Gas chromatographic determination of chlorobenzenes and other chlorinated hydrocarbons in environmental samples using fused silica capillary columns. *Chromatographia* **16**:336-340.
- Oliver, B. G., and A. J. Niimi. 1988. Trophodynamic analysis of polychlorinated biphenyl congeners and other chlorinated hydrocarbons in the Lake Ontario ecosystem. *Environ. Sci. Technol.* **22**:388-397.
- Pesonen, M., A. Goksoyr, and T. Andersson. 1992. Expression of P450IA1 in a primary culture of rainbow trout hepatocytes exposed to β -naphthoflavone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Arch. Biochem. Biophys.* **292**:228-233.
- Sharma, A. K., and D. C. Gautam. 1991. Chromosomal aberrations induced by phosphamidon and endosulfan in the bone marrow cells of mice in vivo. *Cytologia* **56**:73-78.
- Saito, H. S., S. Iwami, and T. Shogoka. 1991. In vitro cytotoxicity of 45 pesticides to goldfish GF-scale (GFS) cells. *Chemosphere* **23**:525-537.
- Snyder, R. D., and D. W. Matheson. 1985. Nick translation—A new assay for monitoring DNA damage and repair in cultured human fibroblasts. *Environ. Mutagen.* **7**:267-279.
- Walton, D. G., D. G. Acton, and H. F. Stich. 1988. Chromosome aberrations in cultured central mudminnow heart cells and Chinese hamster ovary cells exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and sediment extracts. *Comp. Biochem. Physiol.* **89C**:395-402.
- Weisburger, J. H., and G. M. Williams. 1991. Critical effective methods to detect genotoxic carcinogens and neoplasm-promoting agents. *Environ. Health Perspect.* **90**:121-126.
- West, D. C., A. Sattar, and S. Kumar. 1985. A simplified in situ solubilization procedure for the determination of DNA and cell number in tissue cultured mammalian cells. *Analyt. Biochem.* **147**:289-295.
- Zucker, R. M., K. H. Elstein, R. E. Easterling, and E. J. Massaro. 1988. Flow cytometric analysis of the toxicity of tributyltin. *Toxicol. Lett.* **43**:201-208.

Article 5

Genotoxicity of sediment extracts obtained in the vicinity of a creosote-treated wharf to rainbow trout hepatocytes

François Gagné^{*a}, Sylvain Trottier^a, Christian Blaise^a, Jim Sproull^b, Bill Ernst^c

^a*St. Lawrence Centre, Environment Canada, 105 McGill, Montreal, Quebec, Canada, H2Y 2E7*

^b*Toxic Substances Division, Environmental Protection Laboratory, 5320-122 Street, Edmonton, Alberta, Canada, T6H 3S5*

^c*Toxic Chemicals and Waste Management, Environmental Protection, Atlantic Region, 45 Alderney, Dartmouth, Nova Scotia, Canada, B2Y 2N6*

Received 5 October 1994; revision received 15 December 1994; accepted 15 December 1994

Abstract

Genotoxicity and cytotoxicity were evaluated in rainbow trout hepatocytes exposed to sediment extracts obtained in the vicinity of a creosote-treated wharf. Sediment cores were collected at the intertidal and subtidal sections of the wharf at distances of 1, 5, 40 and 50 m. Moreover, subsamples were also taken at different depths of the cores ranging from 2 to 10 cm below the sediment/water interface. Sediment samples were air-dried and extracted in dichloromethane followed with an exchange into dimethylsulfoxide (DMSO). Rainbow trout hepatocytes were exposed for 24 h at 15°C to several concentrations of the sediment extract. Afterwards, the cells were collected, and cell viability was assayed along with genotoxicity using the nick translation and the alkaline precipitation assays. Results showed that the wharf contained high concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), displayed genotoxicity and cytotoxicity to hepatocytes. In addition, PAHs, cytotoxicity and sometimes genotoxicity were detected in all sediment samples and tended to decrease with distance. Chemical contamination and (geno)toxic effects were greater in sediment extracts from the intertidal section than from the subtidal section. However, no evident change in chemical or toxicological characteristics was noted between samples obtained at different depths. Spearman rank-correlation analysis revealed some trends between levels of some PAHs and (geno)toxicity in hepatocytes exposed to sediment extracts.

Keywords: Sediment toxicity; In situ nick translation assay; Alkaline precipitation assay; Flow cytometry; Propidium iodide

1. Introduction

Wharves built of wood are often treated with a creosote mixture for preservation. Indeed, creosote compounds readily adsorb to wooden

surfaces, thereby increasing their surface hydrophobicity. In addition, biological degradation by mildew and bacteria are also slowed down with this treatment.

However, creosote mixtures contain large amounts of chemicals potentially dangerous to aquatic biota [1]. Creosote is rich in polycyclic

* Corresponding author.

aromatic hydrocarbons (PAHs), which can be carcinogenic to animals, including fish [1–3]. This raises the question of the potential hazard posed by creosote contamination of sediments near a creosote-treated wharf. This contamination can be assessed by a fish bioassay or an alternative bioassay — primary culture of rainbow trout hepatocytes. The latter has distinct advantages over the fish bioassay for evaluating the cellular effects of chemicals [4]. These cells abound in cytochrome P4501A1 activity [5], which is responsible for benzo[*a*]pyrene (B[a]P), a carcinogenic PAH, metabolizing into a genotoxic/carcinogenic metabolite [6]. Chemical and toxicological evaluations of sediment extracts obtained near a creosote-treated wharf should be complementary indicators of creosote contamination of such sediments.

The purpose of this study was therefore to evaluate the (geno)toxic potential of sediments near a creosote-treated wharf using the rainbow trout hepatocyte model and to compare these results with chemical analysis for PAHs in the same sediments.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Phosphate-buffered saline (PBS), tricaine methanesulfonate, collagenase type IV, Liebovitz medium (L-15), foetal bovine serum (FBS), sodium citrate, sodium dodecylsulphate (SDS), potassium chloride, B[a]P, spectrophotometric-grade dimethylsulfoxide (DMSO), salmon sperm DNA, bisBenzimide (Hoechst No. 33342), Tween-20, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), tris-(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), bovine serum albumin (BSA), digitonin, *E. coli* DNA polymerase I (PolI), ribonuclease A (RNase) and propidium iodide (PI) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Biotin-16-deoxyuridine triphosphate (biotin-dUTP), streptavidin-fluorescein, deoxyadenosine triphosphate (dATP), deoxycytosine triphosphate (dCTP), deoxyguanosine triphosphate (dGTP) and deoxythymidine triphosphate (dTTP) were purchased from Boehringer Mannheim.

2.2. Sediment sampling and extract preparation

The wharf was treated with creosote before installation in the water in July 1993. Sediment samples were collected, in March 1994, at the intertidal and subtidal sections of the wharf structure at distances of 1, 5, 40 and 50 m. Subsamples were also taken at different depths ranging from 2 to 10 cm. The sediment was extracted and the extracts analyzed for PAHs according to established methodology [7]. Each sediment sample was air-dried at room temperature and precisely 10 g were Soxhlet extracted for 8 h with dichloromethane. The raw extract was dried in the presence of sodium sulfate, exchanged into cyclohexane, passed through silica gel and concentrated to exactly 10 ml. This extract served to evaluate PAH levels using gas chromatography/mass spectrometry. Then, 1 ml of the extract was dried under a nitrogen stream and resuspended in 100 μ l DMSO for (geno)toxicity evaluation. A piece of the wharf structure was also extracted using the same procedure.

2.3. Preparation and exposure of rainbow trout hepatocytes

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), 10–25 cm long, were obtained from a commercial fish hatchery and were fed trout chow. Hepatocytes were collected according to the double perfusion method [8] with some modifications. Briefly, each trout (20–30 cm) was anesthetized with tricaine methanesulfonate (50 mg/l; 50 s) and the liver was perfused with PBS containing 5 mM EDTA until disappearance of blood. The liver was cut into small slices, mixed for 20 min in PBS containing 100 units/ml collagenase and 1 mM CaCl₂, passed through a cell dissociation sieve (Sigma Chemical Co.), and washed 4 times in PBS. The cells were counted and viability was assayed by the trypan blue exclusion test. Cells were dispensed into a 96-well microplate at a density of 1.25×10^6 /ml in sterile L-15 medium supplemented with 1% FBS, 100 units penicillin, 100 mg/l streptomycin and 1 mg/l amphotericin B. The cells were exposed to 0.001, 0.01, 0.1 and 1% v/v of the extract and to 50, 100, 200, 300 and 400 ng/ml B[a]P. Control cells received the appropriate amount of DMSO. The

microplate was incubated for 24 h at 15°C in a humidified incubator. The livers from 5 individuals were pooled for each experiment.

2.4. Cell viability evaluation

Cell viability was determined with the PI exclusion test as described by Zucker et al. [9]. After the exposure period, cells were collected by centrifugation, the supernatant discarded, and resuspended in saline solution citrate (SSC: 150 mM NaCl, 15 mM citrate, pH 7.2). A sample of 30×10^3 cells was taken and centrifuged 4 min at $100 \times g$ (as with all the following centrifugations). Afterwards the supernatant was removed and cells were incubated with 175 μ l of PI (10 μ g/ml in PBS) for 15 min at room temperature. Cell viability reduction relative to exposure treatment was obtained by the use of digitonin-permeabilized cells. About 50×10^3 cells were mixed with 1 volume of 0.02% digitonin in PBS for 5 min, and the appropriate amount of PBS containing PI was added. Analysis was performed with flow cytometry on unexposed, exposed and digitonin-permeabilized cells as described below. The percentage of live cells was calculated with the following formula: percentage of live cells =

$$\left(1 - \left[\frac{(X - A)}{(B - A)}\right]\right) \times 100$$

where X represents the proportion of stained cells with PI in the exposed group, A is the proportion of stained cells in the unexposed group (control), and B is the proportion of stained cells in the digitonin-treated group (positive control).

2.5. In situ nick translation assay

Genotoxicity was assayed using the nick translation assay (NTA) [10] with modifications. This modified method makes use of a non-radioactive nucleotide (biotin-dUTP) and detection is achieved with flow cytometry [11]. After the exposure period, 50×10^3 cells were collected, washed in SSC, and fixed with ice-cold 70% ethanol. After a fixation period of 45 min at 4°C, cells were centrifuged and rehydrated/permeabilized in PBS containing 0.1% Tween-20 for 15 min at room temperature. Cells were resuspended in reaction

mixture (100 μ l/well) containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM dithiothreitol, 5 mM MgCl₂, 40 μ g/ml BSA, 50 μ M each of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP. PolI (100 units/ml) and biotin-dUTP (10 μ M) were also added to the reaction medium. The reaction was allowed to proceed for 2 h at 37°C. After the reaction period, the cells were centrifuged and resuspended in PBS containing 0.1% Tween-20 and BSA for 10 min at room temperature. Cells were then centrifuged and treated with streptavidin-fluorescein in PBS containing 0.1% Tween-20 and BSA for 30 min at 37°C. Finally, the cells were washed twice (centrifugation-resuspension) in PBS for 10 min and resuspended in PBS containing PI (10 μ g/ml) and RNase (50 units/ml). Cells were analysed with the help of flow cytometry. Results were expressed as a ratio of fluorescence from increased incorporation of biotin-dUTP (streptavidin-fluorescein) to the amount of DNA (PI fluorescence) in cells.

2.6. Alkaline precipitation assay

Genotoxicity was also assayed using the alkaline precipitation assay (APA) [12] with modifications in that detection of DNA strands was achieved by fluorometry as described elsewhere [11]. The same amount of cells (1×10^5) was transferred to a microcentrifuge tube, to which 500 μ l of 2% SDS, 10 mM EDTA and 10 mM Tris (pH 12.4) was added, and allowed to stand at room temperature for 1 min. Then 500 μ l of a 0.12 M KCl solution was added, and the tubes were placed in a water bath at 60°C for 10 min, cooled on ice for 15 min and centrifuged for 5 min at $8000 \times g$. The supernatant (750 μ l) was carefully removed to a tube previously filled with 750 μ l of a 50 mM KH₂PO₄ buffer, pH 7.0. DNA strands were detected by fluorometry using Hoescht 33342 dye [13]. To each tube, 1.5 ml Hoescht solution (1 μ g/ml in phosphate buffer) was added, and fluorescence measured at 460 nm while exciting at 350 nm (Hitachi, F-3010 model). DNA levels were quantified with a standard solution of salmon sperm DNA in the same mixture but without addition of hepatocytes. The levels of DNA strands were normalized with cell number or total levels of cell DNA.

2.7. Flow cytometric analysis

Flow cytometric measurements were made with a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson) equipped with an argon (blue) laser emitting at 488 nm. Data from 5000 cells were collected at a flow rate of 60 $\mu\text{l}/\text{min}$, stored and analysed subsequently with the Lysis II software package. Prior to data acquisition, the front scatter detector (FSD) and the side scatter detector (SSD) were set at -1 exponent and 220 volts, respectively. Cells were electronically isolated (gated) from smaller debris according to FSC and SSC characteristics.

For cell viability measurement, fluorescence emission associated with DNA-PI complex was detected with the FI-3 detector. Voltage was set at 280 with a channel number of 256. Unexposed and exposed cells were aspirated and incorporation of PI was viewed as a 2-dimensional dot plot with FSC (an indirect measure of cell volume) on the y-axis and fluorescence (FI-3) on the x-axis. A gate was placed in order to detect the proportion (%) of PI-stained (dead) cells from the unstained (live) cells.

Incorporation of streptavidin-fluorescein in cells resulting from biotinylated DNA was measured by the detector for fluorescein emission (set at 400 volts and 1024 channels) and the amount of DNA by the detector for PI-stained DNA (set at 280 volts and 256 channels). A gate was constructed so that the mean fluorescence value for fluorescein or PI-DNA complex emission was calculated. The amount of fluorescence from fluorescein was normalized with the relative amount of DNA (i.e. mean fluorescence of PI-DNA).

2.8. Statistical analysis

Cells obtained from the same preparation were exposed to sediment samples in 4 replicates ($n = 4$). The NTA, APA and cell viability data were subjected to an ANOVA, and critical differences between unexposed and exposed cells were determined with Dunnett's *t*-test. The lowest observable effect concentration in % v/v (LOEC) and the no observable effect concentration in % v/v (NOEC) were then determined. A toxicity threshold (TT) was calculated following the relation: $TT = (\text{NOEC} \times \text{LOEC})^{1/2}$ [14]. Data were

expressed in toxicity units (TU) defined by the following equation: $TU = 100/TT$. Spearman rank-correlation analysis was done to underline possible links between PAH levels and (geno)toxic responses in exposed hepatocytes. Significance was set at $P < 0.05$ in all cases.

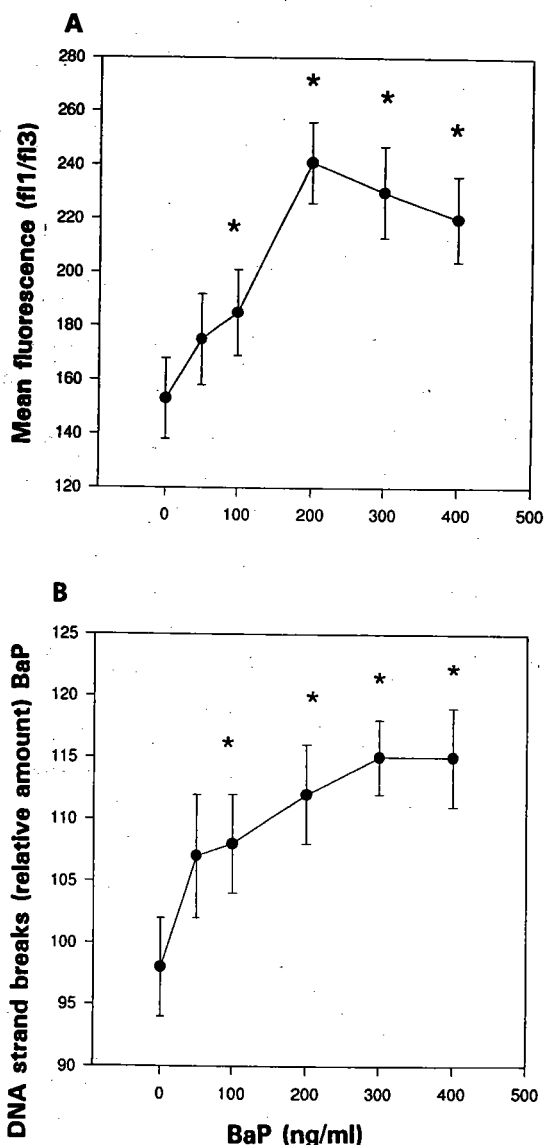


Fig. 1. Genotoxicity of B[a]P evaluated with the NTA and the APA. Rainbow trout hepatocytes were exposed to B[a]P for 24 h at 15°C and DNA damage was assayed with the NTA (A) and the DNA APA (B). Data points represent the mean with S.E. from 4 replicates. *Significant from the control at $P < 0.05$.

tribution of PAHs in the sediment compartment. The number of PAHs detected in the samples varied from 6 to 16 while the samples closest to the wharf (i.e. 1 and 5 m) contained at least 9 PAHs at the intertidal section. It seems that some PAHs are lost during diffusion in the sediment compartment either via the water column or by heterogeneous distribution in the sediment.

3.3. Toxicological characteristics of sediment extracts

Sediment extracts were tested for (geno)toxicity towards rainbow trout hepatocytes. As with the

Table 2
Toxicological characteristics of marine sediment extracts

Distance (m)	Depth (cm)	Viability (log[TU]) ^a	NTA (log[TU])	APA (log[TU])
1 Intertidal	0-2	4.553	2.553	<2 ^b
1	3-5	4.502	3.502	<2
1	0-2	2.676	3.676	<2
1	2-4.5	2.498	2.498	2.498
5	0-2.5	3.503	3.503	2.503
5	2.5-4.5	4.505	3.505	3.505
40	0-2	2.501	2.501	3.501
40	5.5-7.5	2.505	<2	3.505
50	0-2	2.505	2.505	<2
50	4-6	2.505	<2	2.505
1 Subtidal	0-2	3.501	<2	2.505
1	7.5-10	3.505	<2	2.505
5	0-2	3.498	3.498	<2
5	7-9	3.500	<2	<2
5	0-2	2.503	<2	2.503
5	8-10	2.505	<2	na ^c
40	0-2	3.505	<2	<2
40	8-10	2.505	<2	<2
50	0-2	3.505	<2	<2
50	8-10	2.480	<2	<2
Wharf material	—	4.107	4.107	<2
'Clean' sediment ^d	—	2.505	<2	<2

^aData are expressed in TU as defined in Materials and methods.

^b< 2 means that no effect was detected at 1% v/v. Some effects can possibly be measured at higher concentrations but were not actually tested.

^cna, not analysed.

^dClean sediment is sand which is thought not contaminated.

PAH concentrations, (geno)toxicity was higher in samples from the intertidal section than from the subtidal section. Samples nearest to the wharf (1 and 5 m) displayed more (geno)toxicity than those farthest (40 and 50 m) from the wharf. The intertidal samples were all cytotoxic while 80 and 60% were genotoxic according to the NTA and APA, respectively. The subtidal samples were all cytotoxic while 10 and 30% were genotoxic with the NTA and the APA, respectively. Interestingly, the wharf extract was highly genotoxic with the NTA only. The wharf material induced cytochrome P450-mediated activity in exposed cells (log[TT] = 8.2) as evaluated by the methoxycarbonyl-fluorescein demethylase assay [15], confirming bioavailability of P4501A1-inducing PAHs, in part at least, in the samples. Creosote-contaminated sediments were shown elsewhere to induce cytochrome P4501A1 in juvenile fish exposed for 43 days in the field [16]. The fact that genotoxic activity was detected with the APA in sediment extracts while none was detected in the wharf sample suggests that genotoxicity can be produced by different mechanisms, possibly through interaction of the PAHs (exogenous chemicals) with constituents in the sediments (endogenous chemicals). Discrimination between (endo)exogenous chemical contamination is not easily separated at the toxicological level. Almost all of the PAHs measured are recognized as carcinogens except for naphthalene (a), acenaphthylene (b), acenaphthene (c) and benzo[*g,h,i*]perylene (d) [2]. Acute toxicity within 8 days to fish has been reported with PAH-contaminated sediments [17], and carcinogenic effects have also been reported in exposed fish from contaminated sediment [3]. Moreover, creosote has also been shown to be mutagenic with the Salmonella/microsome assay [18]. This alternative bioassay can detect the presence of persistent genotoxic compounds in sediment extracts and the present study demonstrates its usefulness as a screening tool. Evaluation of the possible ecological threat of this genotoxic activity will nevertheless require a study at the individual and population levels to confirm whether these genotoxic compounds pose a hazard to the sediment ecosystem.

3. Results and discussion

3.1. Genotoxicity of B[a]P

Exposure of cells or organisms to xenobiotics can lead to the production of small single-stranded nicks or gaps in DNA. These gaps can eventually lead to errors during repair and be deleterious or initiate carcinogenic transformation of the cell. The NTA can detect these early damages, i.e. small single-stranded nicks [10]. The Poll enzyme system requires a template DNA for repair and nick

translation, therefore this assay would not be adequate to detect double-stranded damage or single-stranded conformation. The APA assay detects rather long single- and double-stranded nicks within the DNA macromolecule along with double-stranded cross-links [12] and thus it can be used in association with the NTA. A 24-h exposure of B[a]P was genotoxic to trout hepatocytes (Fig. 1A and B) as measured both by the NTA and the APA. Genotoxicity was measured in B[a]P at LOEC = 100 ng/ml (ANOVA $P < 0.001$, Dunnett t -test $P < 0.05$) and 100 ng/ml (ANOVA $P = 0.01$, Dunnett t -test $P < 0.05$) for the NTA and APA, respectively. Indeed, B[a]P is oxidized by the P4501A1 enzyme system to the diol epoxide metabolite, which is in turn a genotoxic carcinogen [6]. Rainbow trout hepatocytes abound in the cytochrome P450 system, particularly the P4501A1 isozyme, and retain their inducibility for 48 h [5]. Hence it is a pertinent model for assessing the effects of PAH contamination in environmental sediment extracts. In the NTA and in the APA, a decrease in the slope is observed and is probably linked to saturation of B[a]P metabolism thereby limiting the production of DNA-reactive B[a]P metabolites or/and saturation in the influx of B[a]P in hepatocytes.

Table 1
Chemical characteristics of marine sediment extracts

Distance (m)	Depth (cm)	Total PAH ^a (µg/g)	
1 Intertidal	0-2	1.52	g,e,h,j,i,d,f,a,c ^b
1	3-5	209.11	e,g,h,c,d,i,f,j,k,m,a,l,n,p,b,o
1	0-2	26.57	g,h,e,j,i,l,f,k,m,d,p,c,a,b
1	2-4.5	6.62	g,h,e,j,m,l,i,n,p,d,a,f,k,c,b
5	0-2.5	3.97	e,g,h,d,j,i,f,c,a,l,m,p,n
5	2.5-4.5	0.64	e,g,h,i,j,d,c,a,f
40	0-2	0.78	g,e,h,j,i,a,f,d,c
40	5.5-7.5	0.12	a,e,h,g,c,d
50	0-2	0.83	g,e,m,h,j,i,l,a,f,d,c
50	4-6	0.54	g,e,h,j,a,i,d,c,f
1 Subtidal	0-2	16.19	g,e,h,j,i,l,d,m,f,c,k,n,p,a
1	7.5-10	5.18	g,e,h,j,i,d,l,m,f,c,a
5	0-2	1.18	g,e,h,j,c,a,d,i,f
5	7-9	0.25	e,g,h,j,a,d,c
5	0-2	1.30	g,e,h,j,i,d,c,a,f
5	8-10	0.38	g,e,h,j,a,i,d,c
40	0-2	0.83	g,h,e,i,j,l,m,f,d,a,c
40	8-10	0.14	e,g,h,d,c,a
50	0-2	29.03	g,e,h,j,m,l,i,k,n,p,d,f,o,c,a,b
50	8-10	2.54	g,h,i,j,e,k,l,f,a,d,c,b
Wharf material	—	141 871	e,g,h,d,c,f,j,i,l,k,a,m,n,o,b,p
'Clean' sediment ^c	—	nd ^d	

^aTotal PAH is defined by the sum of each PAH concentration. Sample results are based on dry weight.

^bPAHs are ranked by decreasing concentration in the extracts: a, naphthalene; b, acenaphthylene; c, acenaphthene; d, fluorene; e, phenanthrene; f, anthracene; g, fluoranthene; h, pyrene; i, benzo[a]anthracene; j, chrysene; k, benzo[b]fluoranthene; l, benzo[k]fluoranthene; m, B[a]P; n, ideno[1,2,3,c,d]-pyrene; o, dibenzo[a,h]anthracene; p, benzo[g,h,i]perylene.

^cClean sediment is sand which is thought not contaminated.

^dnd, not detected.

3.2. Chemical characteristics of sediment extracts

The wharf wood was treated with a creosote stain for preservation and durability before immersion in the water in July 1993. A portion of the treated wood was extracted as described and contained 16 different PAHs (Table 1). Sediment samples were taken at the intertidal and subtidal sections of the wharf with intertidal samples collected at low tide. The intertidal sediment samples collected were observed to contain substantially more PAHs than the samples from the subtidal section. Of the 16 PAHs measured, the following were relatively more abundant as was also the case with the wharf material: fluoranthene (g), phenanthrene (e), pyrene (h) and chrysene (j). However, considerable differences in total PAH concentrations were encountered at the same distance and depth (see 1 m distance, 0-2 cm depth). Moreover, the relative amount of each PAH varied with distance and depth, suggesting a heterogeneous dis-

3.4. Correlation between chemical and toxicological data

In order to determine probable links between PAH concentrations and viability as well as genotoxicity in these sediment extracts, they were compared by Spearman rank-correlation. Although a positive correlation does not necessarily imply causality between the two variables, this analysis can help identify chemicals in complex mixtures which may be responsible for the measured effect. Of course, these findings need to be confirmed or disproved with appropriate experimental designs. Table 3 shows the significant positive correlations between chemical and toxicological data. As expected, it can be observed that no correlation was obtained between the APA and total PAH concentrations or the 16 PAHs individually. The NTA was positively correlated with 6 out of 16 PAHs (32.5%): naphthalene, acenaphthylene, fluorene, phenanthrene, anthracene, and pyrene. The most abundant PAHs (phenanthrene and pyrene) were correlated with genotoxicity (NTA) even though some of the lower concentrations of PAHs were also positively correlated. Cell toxicity was correlated with 5 out of 16 PAHs (31.2%): acenaphthylene, anthracene, fluoranthene, phenanthrene, and dibenzo[*a,h*]anthracene. These PAHs were not necessarily correlated with genotoxicity (dibenzo[*a,h*]anthracene, acenaphthene,

fluoranthene), suggesting that toxicity may not necessarily proceed by genotoxicity only — other cellular sites may be affected. These trends show that some PAH concentrations vary with cell genotoxicity although synergistic/antagonistic effects can also occur in this complex mixture, as suggested by others [19]. It remains to be seen whether these genotoxic PAHs are actually genotoxic alone or in combination to trout hepatocytes. Nevertheless other constituents, for example pyridine or *ortho*-cresol, and interactions with naturally occurring sediment compounds can possibly elicit (geno)toxic effects to trout hepatocytes. On the whole, some PAHs correlated with the NTA while 2 of the most abundant PAHs (phenanthrene and fluoranthene) correlated with cytotoxicity. Rainbow trout hepatocytes appear to be a pertinent model to detect (geno)toxic compounds in contaminated sediment extracts which can potentially harm the aquatic biota.

Acknowledgements

The helpful comments of Joan Dyer for the preparation of the manuscript are recognized. This project was supported by the management of the Environmental Protection branch, Prairie and Northern Region and in part by the St. Lawrence Centre, Quebec Region.

References

- [1] Malins, D.C., Krahn, M.M., Myers, M.S., Rhodes, L.D., Brown, D.W., Krone, D.W., McCain, B.B. and Chan, S.L. (1985) Toxic chemicals in sediment and biota from a creosote-polluted harbour: relationships with hepatic neoplasms and other hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*). *Carcinogenesis* 6, 1463–1469.
- [2] Soderman, J.V. (1987) Handbook of Identified Carcinogens and Non-carcinogens: Carcinogenicity-mutagenicity Database, Vol. 1, CRC Press, USA.
- [3] Vogelbein, W.K., Fournie, J.W., Van Veld, P.A. and Hugget, R.J. (1990) Hepatic neoplasms in the mummichog *Fundulus heteroclitus* from a creosote-contaminated site. *Cancer Res.* 50, 5978–5986.
- [4] Baksi, S.M. and Frazier, J.M. (1990) Isolated fish hepatocytes — model systems for toxicology research. *Aquat. Toxicol.* 16, 229–256.
- [5] Pesonen, M., Goksoyr, A. and Andersson, T. (1992) Expression of P450IA1 in a primary culture of rainbow trout hepatocytes exposed to β -naphthoflavone and

Table 3
Spearman rank-correlations between chemical and toxicological data

Viability	NTA	APA
c ^a (<i>R</i> = 0.513)*	a (<i>R</i> = 0.573)	nd ^b
f (<i>R</i> = 0.556)	b (<i>R</i> = 0.456)	
e (<i>R</i> = 0.479)	d (<i>R</i> = 0.484)	
g (<i>R</i> = 0.511)	e (<i>R</i> = 0.508)	
o (<i>R</i> = 0.449)	f (<i>R</i> = 0.525)	
	h (<i>R</i> = 0.455)	

^aa, naphthalene; b, acenaphthylene; c, acenaphthene; d, fluorene; e, phenanthrene; f, anthracene; g, fluoranthene; h, pyrene; i, benzo[*a*]anthracene; j, chrysene; k, benzo[*b*]fluoranthene; l, benzo[*k*]fluoranthene; m, B[*a*]P; n, ideno[1,2,3,4,6]perylene; o, dibenzo[*a,h*]anthracene; p, benzo[*g,h,i*]perylene.

^bnd, not detected.

- 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Arch. Biochem. Biophys. 292, 228-233.
- [6] DeBethizy, J.P. and Hayes, J.R. (1989) Metabolism: a determinant of toxicity. In: W. Hayes (Ed.), Principles and Methods of Toxicology, 2nd Ed., Raven Press, New York.
- [7] Environmental Protection Agency (1986) Method 3540, 3630, and 8270. In: Test Methods for Evaluating Solid Waste, SW-846, Revision 0, Office of Solid Waste, Washington, D.C.
- [8] Klauning, J.E., Ruch, R.J. and Goldblatt, P.J. (1985) Trout hepatocyte culture: isolation and primary culture. In Vitro Cell. Dev. Biol. 21, 221-228.
- [9] Zucker, R.M., Elstein, K.H., Easterling, R.E. and Massaro, E.J. (1988) Flow cytometric analysis of the cellular toxicity of tributyltin. Toxicol. Lett. 43, 201-218.
- [10] Snyder, R.D. and Matheson, D.W. (1985) Nick translation — a new assay for monitoring DNA damage and repair in cultured human fibroblasts. Environ. Mutagen. 7, 267-279.
- [11] Gagné, F. and Blaise, C. (1995) Evaluation of genotoxicity of environmental contaminants in sediments to rainbow trout hepatocytes. Environ. Toxicol. Water Qual. 10, (in press).
- [12] Olive, P.L. (1988) DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. Environ. Mol. Mutagen. 11, 487-495.
- [13] West, D.C., Sattar, A. and Kumar, S. (1985) A simplified in situ solubilization procedure for the determination of DNA and cell number in tissue cultured mammalian cells. Anal. Biochem. 147, 289-295.
- [14] Horning, W.B. II and Weber, C.I. (1985) Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. EPA-600/4-85-014. Office of Research and Development, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati. Environmental Protection Agency, 152 pp.
- [15] Gagné, F. and Blaise, C. (1993) Evaluation de l'activité des oxydases à fonction mixte dans les hépatocytes de truites arc-en-ciel. Methodological report, St-Lawrence Center, Environnement Canada, Montréal, Québec, Canada.
- [16] Schoor, W.P., Williams, D.E. and Takahashi, N. (1991) The induction of cytochrome P-450-IA1 in juvenile fish by creosote-contaminated sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20, 497-504.
- [17] Roberts, M.H. Jr., Hargis, W.J. Jr., Strobel, C.J. and DeLisle, P.F. (1989) Acute toxicity of PAH contaminated sediments to the estuarine fish, *Liestomus xanthurus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 42, 142-149.
- [18] Bos, R.P., Hilshof, C.T., Theuws, J.L. and Henderson, P.T. (1983) Mutagenicity of creosote in the Salmonella/microsome assay. Mutat. Res. 119, 21-25.
- [19] Nylund, L., Heikkilä, P., Hameila, M., Pyy, L., Linnainmaa, K. and Sorsa, M. (1992) Genotoxic effects and chemical composition of four creosotes. Mutat. Res. 265, 223-236.