

UNIVERSITÉ DE NANTES
UFR SCIENCES ET TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE VENAM

Année 2010

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**Étude des voies de bioactivation du
benzo[a]pyrène et du fluoranthène chez la sole
commune (*Solea solea*) :
Profil métabolique et génotoxicité**

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : physiologie, biologie des organismes, populations, interactions
Spécialité : écotoxicologie marine

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Nathalie WESSEL

Le 29 janvier 2010, devant le jury ci-dessous

Président	Docteur Jean-Pierre CRAVEDI, chercheur, INRA Toulouse
Rapporteurs	Professeur Paule VASSEUR, professeur, Université de Metz Docteur Laury GAUTHIER, maître de conférences, ECOLAB Toulouse
Examineurs	Docteur Thierry BURGEOT, chercheur, Ifremer Nantes Docteur Richard COSSON, chercheur, Université de Nantes Docteur Farida AKCHA, chercheur, Ifremer Nantes Docteur Awadhesh JHA, chercheur, University of Plymouth, UK Docteur Hélène BUDZINSKI, chercheur, Université de Bordeaux 1

Directeur de thèse : Docteur Thierry BURGEOT

UNIVERSITÉ DE NANTES
UFR SCIENCES ET TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE VENAM

**Étude des voies de bioactivation du
benzo[a]pyrène et du fluoranthène chez la sole
commune (*Solea solea*) :
Profil métabolique et Génotoxicité**

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : physiologie, biologie des organismes, populations, interactions
Spécialité : écotoxicologie marine

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Nathalie WESSEL



Le 29 janvier 2010, devant le jury ci-dessous

Président	Docteur Jean-Pierre CRAVEDI, chercheur, INRA Toulouse
Rapporteurs	Professeur Paule VASSEUR, professeur, Université de Metz Docteur Laury GAUTHIER, maître de conférences, ECOLAB Toulouse
Examineurs	Docteur Thierry BURGEOT, chercheur, Ifremer Nantes Docteur Richard COSSON, chercheur, Université de Nantes Docteur Farida AKCHA, chercheur, Ifremer Nantes Docteur Awadhesh JHA, chercheur, University of Plymouth, UK Docteur Hélène BUDZINSKI, chercheur, Université de Bordeaux 1

Directeur de thèse : Docteur Thierry BURGEOT

*Confronté à la roche, le ruisseau l'emporte toujours,
non par la force mais par la persévérance.*

H. Jackson Brown

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier le Professeur Paule Vasseur, et le Docteur Laury Gauthier d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit, et d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie également les Docteurs Richard Cosson, Awadhesh Jha, Hélène Budzinski et Jean-Pierre Cravedi, pour avoir bien voulu être les membres de mon jury.

Je souhaite remercier infiniment Farida Akcha, pour m'avoir encadrée et soutenue au cours de ces trois années de thèse. Je la remercie de s'être autant impliquée, d'avoir été toujours aussi disponible, et d'avoir fait en sorte que cette thèse se déroule dans les meilleures conditions possibles. Un manuscrit entier ne suffirait pas à lui exprimer toute ma gratitude. Je la remercie donc simplement d'être aussi formidable humainement et professionnellement, et j'espère pouvoir continuer à travailler à ses côtés le plus longtemps possible.

Je remercie également Thierry Burgeot pour avoir été le directeur de cette thèse, et pour être un « boss-daddy » si sympathique. Son dynamisme, son humour et sa gentillesse, associés à son professionnalisme et à son implication font de lui un directeur de laboratoire hors du commun. Je le remercie vivement pour son soutien indéniab le et pour son aide précieuse au cours de cette aventure.

Je tiens à remercier Richard Cosson pour avoir accepté de codiriger cette thèse. Bien que n'étant pas dans le même laboratoire, il est resté à l'écoute de l'avancement de mes travaux et je l'en remercie chaleureusement.

Je remercie Marie Le Dû-Lacoste, et Hélène Budzinski du LPTC de Bordeaux pour avoir grandement contribué à ce travail de thèse.

Je remercie également Jean-Pierre Cravedi de m'avoir accueillie quelques semaines à l'UMR Xénobiotiques de l'INRA de Toulouse. Durant ce séjour, Elisabeth Perdu-Durand, Marc Audebert et Carine Jacques m'ont particulièrement aidée, et je les en remercie chaleureusement.

Je tiens à adresser à un grand merci à Karine Pichavant-Rafini, Hélène Ollivier et Stella Roy, pour nous avoir accueillies, Farida et moi, avec tant de gentillesse au Laboratoire d'Optimisation des Régulations Physiologiques de l'Université de Brest.

Merci également à Jérémie Le Goff de la société Adn'Tox du GRECAN à Caen, ainsi que Thierry Douki, du Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques du CEA de Grenoble pour leur aide précieuse sur l'étude des adduits à l'ADN

Cette thèse s'est déroulée dans le cadre du projet Sole BEMol, coordonné par une main de maître, Véronique Loizeau, que je remercie pour ses compétences, sa gentillesse, et son aide lors des nombreux prélèvements à Brest ou ailleurs. La nuit de dissection au Havre au mois de novembre en sa compagnie restera un moment mémorable de ma thèse. Merci également à Anne-Marie Le Guellec, du Laboratoire de Chimie des Contaminants Organiques, de l'Ifremer de Brest pour sa générosité, sa volonté, et sa bonne humeur constante.

Merci également à tous les participants de Sole BEMol, et parmi eux je souhaite remercier particulièrement Vincent Buchet, Nicolas Le Bayon, François Roupsard et Olivier Gastineau pour la mise en place et l'organisation toujours impeccable et avec le sourire des phases expérimentales de Sole BEMol.

Que toutes les personnes du département Biogéochimie et Ecotoxicologie de l'Ifremer, et plus généralement des centres Ifremer de Nantes et de Brest reçoivent toute ma considération pour leur aide, notamment Manoella Sibat et Florence Mondeguer pour leurs coups de mains en HPLC, et Christine Le Paul pour son aide précieuse dans la mise en forme de ce document. Un grand merci à Xavier Caisey pour son aide précieuse lors de mes passages à Brest, autant lors des expérimentations que lors des recherches de cahiers disparus... Merci également à Dominique Ménard pour son aide lors de certaines manips.

Que les équipages de Génavir sachent combien je garde un très bon souvenir des séjours en Baie de Seine à bord du Gwen Drez. Je les remercie pour leur travail formidable et pour leur accueil si chaleureux.

Je remercie Emilie Farcy pour avoir été la meilleure colloc' de bureau possible. Je la remercie pour son amitié, sa folie, son soutien et sa gentillesse, qui font d'elle une amie hors pair. Nos nombreuses discussions sérieuses ou beaucoup moins sérieuses autour d'un apéro m'ont beaucoup appris et aidé. Cette thèse n'aurait pas été la même sans sa présence et j'espère pouvoir un jour être de nouveau sa collèg' !

Je tiens à adresser un énorme merci à ma super copainne Sabine Stachowski-Haberkorn pour tout le soutien qu'elle m'a apporté. Je la remercie pour toutes les heures passées en sa compagnie, pour nos folles parties de wii-filles, pour nos plus que nombreux fous rires, pour sa gentillesse, pour son aide dans la mise en forme de ce manuscrit et pour la bonne humeur qu'elle apporte partout où elle passe.

Je remercie tous les membres de l'IPC pour tous les bons moments passés en leur compagnie. Parmi eux, je tiens à remercier infiniment Bruno Saint-Jean, Julien Schaeffer, Jean Baptiste Bérard, et Sylvain Parmaudeau. Leur présence à mes côtés, les nombreux moments pleins de fous rires passés avec eux, mais également les quelques discussions sérieuses que nous avons pu avoir vont me manquer terriblement. Où que l'avenir me mène, vous aurez toujours accès à mon.....logement bien sur !

Je tiens à remercier vivement Amandine Cozic-Houly et Isabelle Guerrit, mes toutes premières amies de thèse. Leur soutien depuis le début a été très important pour moi. Je les remercie pour leur présence tout au long de ces trois années.

Je souhaite adresser un gros merci à Alice pour s'être révélée une formidable amie, et dont l'angoisse permanente n'a d'égal que sa gentillesse.

Un gros merci également à Estelle Le Bras, Julien Rouxel, et Romain Davy pour leur aide, leur amitié et pour le super boulot qu'ils font au laboratoire.

Je remercie également les personnes de passage à l'Ifremer : Sabrina qui m'a souvent manquée au cours de cette thèse ; les stagiaires de choc de la cellule ARC, Maude, Anne-

Isabelle, et Ombeline. Merci à Zaïna pour les bons moments passés ensemble. Merci beaucoup à Alban pour son aide de re-lecteur.

J'adresse un énorme merci à tous mes amis brestois pour leur présence. Merci donc à Céline, Jona, Elo, Mel, MathGon, Rossana, Piero, Carlito, Caro, Flo, Yann, Minou et tous les autres !

Un énorme merci également à amis de toujours, Cindy, Jean-Marc, Elodie, Aurore et Morgane.

Je tiens à remercier sincèrement Matthieu Duchemin et Michel Auffret, qui ont été les premiers à me faire confiance en m'offrant la possibilité de faire un stage avec eux, alors que je n'y connaissais encore pas grand chose. Je les remercie de m'avoir fait découvrir et aimer l'écotoxicologie.

Merci aux stagiaires qui ont contribué à ce travail, Antoine Perhirin, Jeremy Pottier et Raphaël Santos.

Merci aux autres thésards de l'Ifremer, Julie, Haïfa, Sabine, Myriam, François, Thierry et Benoît pour leur soutien. Et surtout, bon courage et bonne chance pour la suite.

Mes plus grands remerciements s'adressent à mes parents sans qui je ne serais pas là bien sûr, mais surtout sans qui je n'en serais pas là. Merci de m'avoir toujours épaulée dans mes choix et de m'avoir toujours soutenue et poussée à me destiner vers un travail qui me passionne.

Je tiens à remercier infiniment Johann Bown, mon amoureux fou qui a réussi à me supporter qui m'a soutenue, conseillée, et réconfortée chaque jour pendant cette thèse et plus. Merci d'avoir toujours été auprès de moi malgré la distance qui nous sépare.

Merci beaucoup à Kelis Bown, dite pitchoucat pour sa présence et ses miaouages si apaisants.

Enfin, je m'excuse auprès de tous ceux que j'aurais pu oublier et je les remercie quand même de ne pas trop m'en vouloir...

Valorisation scientifique

Dix communications orales à des congrès nationaux et internationaux, dont quatre en premier auteur

Wessel N., Le Dû-Lacoste M., Ménard D., Budzinski H., Burgeot T., Akcha F. (2009).

In vitro metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the common sole (*Solea solea*). 22th Meeting of the International Society for Polycyclic Aromatic Compounds, Charleston, SC, USA.

Wessel N., Le Dû-Lacoste M., Ménard D., Budzinski H., Burgeot T., Akcha F. (2009).

Métabolisme et génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques chez la sole : expositions *in vitro*. Atelier international sur l'évaluation environnementale par mesure de biomarqueurs écotoxicologiques chez des espèces sentinelles bivalves, Anse Saint-Jean, Quebec.

Wessel N., Santos R., Menard D., LeMenach K., Buchet V., Lebayon N., Loizeau V., Burgeot T., Budzinski H., Akcha F. (2009).

Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and enzyme activities, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). 15th Symposium on Pollutant Responses In Marine Organisms (PRIMO), Bordeaux, France.

Akcha F., **Wessel N.**, Rousseau S., Munsch C., Arzul G., Quiniou F. (2008).

Applications of the alkaline comet assay in marine organisms: in situ and laboratory studies. 2nd International Symposium on Genotoxicity in aquatic systems: Causes, effects, regulatory needs (AGENTOX), Dessau, Germany, et 3ème Atelier international sur l'évaluation environnementale par mesure de biomarqueurs écotoxicologiques chez des espèces sentinelles bivalves (ECOBIM), Bordeaux, France.

Akcha F., **Wessel N.**, Rousseau S., Munsch C., Arzul G., Quiniou F., Burgeot T. (2007).

Applications of the alkaline comet assay in marine organisms: in situ and laboratory studies. VIIth Comet Assay Workshop, Coleraine, Northern Ireland.

Wessel N., Rousseau S., Caisey X., Quiniou F., Akcha F. (2007).

Embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, ethinyl oestradiol and endosulfan for *Crassostrea gigas* embryos. 14th International Symposium on Pollutant Responses In Marine Organisms, PRIMO 14, Santa Catarina, Florianopolis, Brazil.

Burgeot T., Akcha F., **Wessel N.**, Le Du M., Budzinski H. (2007).

DNA damage in *Limanda limanda* and potential application in biomonitoring of the Seine Estuary. ICES Working group of biological effects of the chemical pollutants, Alessandria, Italy.

Wessel N., Akcha F., Le Dû-Lacoste M., Pichavant K., Budzinski H., Burgeot T. (2007).

In vitro exposures of *Solea solea* microsomes and hepatocytes to benzo[a]pyrene and fluoranthene: metabolite identification and genotoxic effects. 34th Aquatic Toxicity Workshop, Halifax, Canada.

Wessel N., Rousseau S., Caisey X., Quiniou F., Akcha F. (2006).

Embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, ethinyl oestradiol and endosulfan for *Crassostrea gigas* embryos. Communication orale au 31ème Congrès de l'Union des Océanographes de France, Nantes, France.

Quatre communications écrites à des congrès nationaux et internationaux, dont trois en premier auteur

Wessel N., Le Dû-lacoste M., Budzinski H., Ménard D., Santos R., Akcha F. (2009). Metabolism and genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in sole : *in vitro* studies. 15th Symposium on Pollutant Responses In Marine Organisms (PRIMO), Bordeaux, France.

Evrard E., Quentel C., Lamour F., **Wessel N.**, Akcha F., Quiniou L., Laroche J. (2008).

Effets d'une contamination aux pesticides par voie orale sur un poisson plat, le flet (*Platichthys flesus*), Groupe Français des Pesticides, Brest, France.

Wessel N., Le Dû-Lacoste M., Loizeau V., Buchet V., Le Bayon N., Budzinski H., Cravedi J.P., Burgeot T., Akcha F. (2008).

In vitro and *in vivo* exposure of soles (*Solea solea*) to pyrene, benzo[a]pyrene, and fluoranthene : metabolite identification and genotoxic effects, 18th SETAC Europe annual meeting, Varsovie, Pologne.

Wessel N., Rousseau S., Caisey X., Quiniou F., Akcha F. (2007).

Oxidative DNA damage induced by benzo[a]pyrene and endosulfan for *Crassostrea gigas* embryos. 2nd Atelier international sur l'évaluation environnementale par mesure de biomarqueurs écotoxicologiques chez des espèces sentinelles bivalves (ECOBIM), Rimouski, Quebec.

Rédaction de six publications scientifiques dont deux parues, une acceptée, deux soumises, et une en préparation

N. Wessel, R. Santos, D. Ménard, K. LeMenach, V. Buchet, N. Lebayon, V. Loizeau, T. Burgeot, H. Budzinski, F. Akcha.

Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). *Marine Environmental Research* doi:10.1016/j.marenvres.2010.03.004 (IF : 2.032)

N. Wessel, S. Rousseau, X. Caisey, F. Quiniou, F. Akcha, 2007.

Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17 α -ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquatic Toxicology*, Volume 85, pp 133–142 (IF: 3.517)

N. Wessel, D. Ménard, K. Pichavant-Rafini, H. Ollivier, J. Le Goff, T. Burgeot, F. Akcha.

The toxicity of benzo[a]pyrene on sole (*Solea solea*) hepatocytes: assessment of genotoxic and enzymatic effects. Accepté pour publication dans le journal *Polycyclic Aromatic Compounds* (IF : 0.741)

N. Wessel, M. Le Dû-Lacoste, H. Budzinski, T. Burgeot, F. Akcha.

Quantification of some of the metabolites of Benzo[a]pyrene and Fluoranthene produced in vitro by sole (*Solea solea*) and dab (*Limanda limanda*) microsomes: Application of a sensitive UPLC MS/MS method. Soumis pour publication dans le journal *Comparative Biochemistry and Physiology*, part C (IF : 2.530).

N. Wessel, D. Ménard, K. Pichavant-Rafini, H. Ollivier, J. Le Goff, T. Burgeot, F. Akcha.

Genotoxic and enzymatic effects of fluoranthene in microsomes and freshly isolated hepatocytes from sole (*Solea solea*). Soumis pour publication dans le journal *Mutation Research – Genetic toxicology and Environmental Mutagenesis* (IF : 2.552)

N. Wessel, D. Ménard, K. Pichavant-Rafini, H. Ollivier, T. Burgeot, F. Akcha

Genotoxic and enzymatic effects of PAH metabolites in freshly isolated hepatocytes from sole (*Solea solea*). En préparation.

Sommaire

Résumé	1
Abstract	2
Avant-propos	3
Introduction générale et objectifs de l'étude	5
Chapitre 1 – Synthèse bibliographique	
<hr/>	
1. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	11
1.1. Introduction	11
1.2. Benzo[a]pyrène (BaP).....	12
1.2.1. Propriétés physico-chimiques.....	12
1.2.2. Propriétés toxicologiques.....	12
1.2.3. Effets toxiques	13
1.3. Fluoranthène	14
1.3.1. Propriétés physico-chimiques.....	14
1.3.2. Propriétés toxicologiques.....	14
1.3.3. Effets toxiques	15
1.4. Pyrène.....	15
1.4.1. Propriétés physico-chimiques.....	15
1.4.2. Propriétés toxicologiques.....	16
1.4.3. Effets toxiques	16
1.5. Concentrations environnementales en HAP	17
2. Biotransformation des HAP	19
2.1. Introduction	19
2.2. Biotransformation des HAP : réactions de phase I.....	19
2.2.1. Biotransformation du BaP.....	19
2.2.2. Biotransformation du Fluoranthène	26
2.3. Biotransformation des HAP : réactions de phase II.....	26
2.3.1. Conjugaison par les UDP-Glucuronosyltransférases	26
2.3.2. Conjugaison par les glutathion-S-transférases.....	27
2.3.3. Conjugaison par les Sulfotransférases.....	27
3. Génotoxicité des HAP	29
3.1. Adduits à l'ADN.....	30
3.1.1. Adduits du BaP	30
3.1.2. Adduits du Fluo.....	31
3.1.3. Signification biologique	32
3.2. Dommages oxydatifs à l'ADN	32
3.2.1. Espèces réactives de l'oxygène	32
3.2.2. Oxydation des bases de l'ADN.....	34

3.2.3. Défenses anti-oxydantes	37
3.2.4. Cassures de brins de l'ADN.....	38
3.2.5. Signification biologique des dommages oxydatifs à l'ADN.....	39
3.3. Mécanismes de réparation de l'ADN.....	39
3.3.1. Réparation par excision de bases (BER)	39
3.3.2. Réparation par excision de nucléotides (NER)	40
3.3.3. Réparation des mésappariements (MMR).....	42
3.3.4. Autres mécanismes de réparation	43
4. Sole commune, <i>Solea solea</i> : espèce modèle.....	45
4.1. Généralités.....	45
4.2. Répartition géographique	45
4.3. Cycle de vie	46
4.4. Physiologie.....	46
4.5. Espèce sentinelle du milieu marin.....	47
Chapitre 2 – Métabolisme des HAP <i>in vitro</i>	
<hr/>	
1. Objectifs	51
2. Matériel et méthodes	53
2.1. Protocole d'incubation de microsomes.....	53
2.1.1. Incubations pour analyses en Radio-HPLC.....	53
2.1.2. Incubations pour analyse en UPLC-MS/MS	53
2.2. Détection et quantification des métabolites formés	54
2.2.1. Profilage métabolique des HAP par Radio-HPLC	54
2.2.2. Quantification des métabolites par UPLC-MS/MS	55
Article 1 – Development and validation of a sensitive ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method (UPLC™-MS/MS) for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites.....	56
3. Résultats et discussion.....	71
3.1. Résultats obtenus en Radio-HPLC chez la sole	71
3.1.1. Métabolisme du BaP.....	71
3.1.2. Métabolisme du Fluo	73
3.2. Résultats obtenus en UPLC-MS/MS chez la sole et la limande	75
Article 2 – Quantification of Benzo[a]pyrene and Fluoranthene metabolites produced in vitro by sole (<i>Solea solea</i>) and dab (<i>Limanda limanda</i>) microsomes: Application of a sensitive UPLC MS/MS method.....	76
3.3. Comparaison des méthodes analytiques	96
4. Conclusion	101

Chapitre 3 – Génotoxicité des HAP

1. Objectifs	105
2. Méthodes de mesure de la génotoxicité des HAP	107
2.1. Mesure du niveau de cassures de brins de l'ADN : le test des comètes	107
2.2. Mesure de la base oxydée de l'ADN 8-oxodGuo	107
2.2.1. Protocole d'extraction d'ADN	108
2.2.2. Digestion et injection de l'ADN	108
3. Modèles d'expositions <i>in vitro</i>	115
3.1. Exposition d'hépatocytes primaires de sole	115
3.1.1. Méthode d'isolement et d'exposition d'hépatocytes primaires de sole	115
3.1.2. Validation de la méthode	115
3.1.3. Optimisation du système d'exposition en primo-cultures	116
3.1.4. Miniaturisation du système d'exposition	117
3.1.5. Exposition aux métabolites de HAP	118
Article 3 – The toxicity of benzo[a]pyrene on sole (<i>Solea solea</i>) hepatocytes: assessment of genotoxic and enzymatic effects	120
Article 4 – Genotoxic and enzymatic effects of fluoranthene in microsomes and freshly isolated hepatocytes from sole (<i>Solea solea</i>)	130
Article 5 – Genotoxic and enzymatic effects of PAH metabolites in freshly isolated hepatocytes from sole (<i>Solea solea</i>)	150
3.2. Caractérisation des adduits formés <i>in vitro</i>	170
4. Etudes <i>in vivo</i> : projet Sole BEMol	173
4.1. Introduction	173
4.1.1. Matériel et méthodes	173
4.2. Résultats et discussion	175
4.2.1. Exposition <i>in vivo</i> à moyen terme (phase A)	175
4.2.2. Exposition <i>in vivo</i> à court terme (phase B)	178
Article 6 – Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (<i>Solea solea</i>)	180
5. Conclusion	185
Discussion générale, conclusion et perspectives	189
Références bibliographiques	195
Table des illustrations	209
Figures	209
Tableaux	212

Liste des Abréviations	213
Annexes.....	215
Article 7 : Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17α-ethinylestradiol and endosulfan on Crassostrea gigas embryos	235
Nouveau chapitre de la thèse 2009	247

Résumé

Cette thèse avait pour but d'étudier la biotransformation et les effets génotoxiques de deux HAP d'intérêt, le benzo[a]pyrène (BaP) et le fluoranthène (Fluo), chez la sole commune *Solea solea* qui est une espèce benthique sensible à la pollution chimique. L'utilisation de modèles *in vitro*, et l'application de différentes techniques de chimie analytique ont permis de démontrer que, comme chez les vertébrés supérieurs, les dihydrodiols et les phénols sont les métabolites du BaP et du Fluo formés majoritairement par les enzymes hépatiques de soles. *In vitro*, le potentiel génotoxique du BaP et du Fluo a été démontré chez la sole, par la production d'adduits et de dommages oxydatifs à l'ADN. Le Fluo présente une génotoxicité 50 fois plus faible que celle du BaP. Dans le cas du BaP, trois adduits formés chez la sole après activation microsomale ont pu être caractérisés par spectrométrie de masse. Comme chez les vertébrés supérieurs, les adduits formés sont issus de la voie d'activation des diol-époxydes. Les effets génotoxiques d'un mélange équimolaire de HAP (BaP, Fluo, Pyr) ont été confirmés *in vivo*, à l'échelle de l'organisme. Une corrélation a été observée entre le niveau de métabolites biliaires de HAP et le niveau de dommages oxydatifs à l'ADN. Les résultats de cette thèse ont démontré la capacité des enzymes hépatiques de soles à métaboliser le BaP et le Fluo par des voies similaires à celles décrites chez les vertébrés supérieurs. En effet, leur métabolisation se fait par la production de métabolites électrophiles capables de se lier à l'ADN. Certains métabolites peuvent quant à eux générer des espèces réactives de l'oxygène responsables de dommages oxydatifs à l'ADN.

Mots clés : Écotoxicologie ; Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques ; *Solea solea* ; Métabolisme ; Génotoxicité

Abstract

The aim of this Ph'D was to study the biotransformation and the genotoxicity of two PAH of interest, namely the benzo[a]pyrene (BaP) and the fluoranthene (Fluo), in the common sole *Solea solea*, which is a benthic species sensitive to chemical pollution. The use of *in vitro* exposure models and the application of two different chemical analytical techniques allowed demonstrating that, as in higher vertebrates, the dihydrodiols and the phenols of BaP and Fluo are the major metabolites produced by sole liver enzymes. *In vitro*, the genotoxic potential of BaP and Fluo was demonstrated in sole, by the production of DNA adducts and oxidative DNA damage. The genotoxicity of Fluo appeared to be 50 fold less important than the genotoxicity of BaP. In the case of BaP, three adducts produced in sole following microsomal activation have been identified by mass spectrometry. As in higher vertebrates, these adducts are produced through the diol-epoxide activation pathway. The genotoxicity of an equimolar mixture of PAHs (BaP, Fluo, Pyr) was confirmed *in vivo* at the individual scale. A correlation was observed between the level of biliary PAH metabolites and the level of oxidative DNA damage. These results showed the ability of sole liver enzymes to metabolise the BaP and the Fluo through similar pathways to those described in higher vertebrates. Indeed, their *in vitro* and *in vivo* metabolism occurs through the production of electrophilic metabolites, able to bind to DNA. Several metabolites are able to generate reactive oxygen species causing oxidative DNA damages.

Keywords: Ecotoxicology, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Solea solea*, Metabolism, Genotoxicity

Avant-propos

La sole est une espèce de poisson dont la valeur marchande fait partie des plus importantes en Europe. Outre la pression de pêche, la contamination des zones de nourriceries constituent une menace pour les juvéniles de soles qui s'y développent. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) font partie des contaminants chimiques retrouvés le plus fréquemment et le plus abondamment dans ces zones sensibles. Le devenir de ces polluants et leurs effets génotoxiques ont cependant été peu étudiés chez la sole. Cette thèse d'écotoxicologie propose donc une approche pluridisciplinaire (Biologie/Chimie) afin d'étudier les voies métaboliques et les effets génotoxiques de deux HAP chez la sole commune (*Solea solea*): le benzo[a]pyrène et le fluoranthène. Ces deux HAP présentent non seulement un intérêt environnemental, mais également sanitaire du fait de leur présence dans l'alimentation humaine.

Cette thèse intitulée « Étude des voies de bioactivation du benzo[a]pyrène et du fluoranthène chez la sole : profil métabolique et génotoxicité » a été co-financée par l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer) et par la Région « Pays de la Loire ».

Elle a été réalisée au Laboratoire d'Écotoxicologie du département Biogéochimie et Écotoxicologie de l'Ifremer, sous la direction du Docteur Thierry Burgeot, directeur du Laboratoire d'accueil. Le Docteur Richard Cosson, chargé de recherche au CNRS, affilié à l'équipe « Écophysiologie Marine Intégrée » de l'Isomer de Nantes en a été le co-directeur. La responsabilité scientifique et l'encadrement de cette thèse ont été réalisés par le Docteur Farida Akcha, chargée de recherche au Laboratoire d'Écotoxicologie de l'Ifremer. Pour les aspects de chimie analytique, une partie de ces travaux de thèse s'est déroulée en collaboration avec le Laboratoire de Physico- et Toxicochimie (LPTC ; directeur : H. Budzinski) de l'Université de Bordeaux 1, ainsi qu'avec l'Unité Mixte de Recherche (UMR) Xénobiotiques de l'INRA de Toulouse (Directeur : J.P. Cravedi).

Cette thèse a été réalisée dans le cadre du projet national Sole BEMol (**Sole Bioaccumulation Écotoxicologie Modélisation**), financé par l'Agence Nationale de la Recherche et coordonné par le Docteur Véronique Loizeau, chargée de recherche au Laboratoire de Chimie des Contaminants Organiques du centre Ifremer de Brest.

Introduction générale et objectifs de l'étude

De nos jours, la pression anthropique subie par l'environnement est très importante. Avec l'existence d'environ 37 millions de substances chimiques et la production et/ou l'utilisation d'environ 100 000 substances sur le marché européen (ENVLIT, 2005), les écosystèmes côtiers et estuariens, qui sont les zones principales de déversement de ces polluants sont en danger constant. Ces substances peuvent engendrer des effets toxiques irréversibles sur les organismes exposés, de l'échelle moléculaire à celle de la population. Une prise de conscience européenne sur le risque que représentent ces contaminants pour l'homme et pour l'environnement a conduit à la mise en place d'une réglementation (Registration Evaluation Autorisation of Chemicals : REACH) et de directives de bon état écologique (Directive Cadre Européenne sur l'EAU (DCE) et Directive Cadre de stratégie pour le milieu marin (DCSMM)). La DCE et la DCSMM ont pour objectif d'assurer la conservation et la gestion des écosystèmes marins de façon à ce que la pression anthropique qu'ils subissent soit compatible avec un bon état écologique. Pour leur application, des programmes de surveillance du milieu marin en Atlantique Nord-Est (Programme Coordonné de surveillance continue de l'Environnement : OSPAR-CEMP) et en Méditerranée (Convention de Barcelone, Programme MEDPOL) ont été créés. Ces programmes visent à évaluer et limiter l'impact des contaminants sur les organismes notamment par la mesure des niveaux de contamination chimique du milieu et de biomarqueurs d'exposition et d'effets chez des espèces sentinelles.

Parmi les contaminants les plus fréquemment détectés dans le milieu marin se trouve la famille des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP). Ces molécules comprenant au moins deux cycles benzéniques sont formées lors de la combustion de matière organique. Elles sont donc naturellement produites lors d'éruptions volcaniques, de feux de forêt, et sont présentes dans les combustibles fossiles. Outre les apports naturels, les activités anthropiques comme le raffinage du pétrole, la production et la combustion du charbon, ou l'utilisation du goudron génèrent une production importante de HAP, ce qui entraîne une contamination chronique du milieu. De plus, ils peuvent être apportés dans l'environnement en grandes quantités de façon ponctuelle lors des marées noires ou des déballastages illicites, générant ainsi des épisodes de contamination aiguë (ERIKA, Prestige, Amoco Cadiz...). Les HAP sont donc des contaminants ubiquitaires dans le milieu marin. Les principales sources de contamination des milieux côtiers proviennent des apports fluviaux ainsi que des retombées atmosphériques des HAP produits par combustion (Gustafsson et al., 1997).

Les HAP, très peu hydrosolubles, sont présents en concentrations très faibles à l'état dissous mais sont fortement disponibles par diffusion passive. Du fait de leur hydrophobicité, ils s'adsorbent principalement sur les particules en suspension dans l'eau (Cailleaud et al., 2009) et sont biodisponibles surtout par voie trophique. Parce que les HAP s'accumulent dans les sédiments, ils constituent une menace particulière pour les organismes benthiques, puisqu'une contamination par contact est alors également possible. Certains poissons plats, comme la

sole, le flet ou la limande sont considérés comme des espèces sentinelles du milieu marin pour les études de biosurveillance en Atlantique Nord-Est (JAMP, 2009). En effet, de part leur mode de vie benthique, elles sont fortement exposées aux contaminants accumulés dans les sédiments. Les juvéniles de soles, plus sessiles que les adultes, reflètent particulièrement bien les caractéristiques du milieu dans lequel ils évoluent. La sole, du fait de sa forte valeur économique présente un intérêt particulier. En Europe, trois zones particulières constituent les grands stocks de sole : la Mer du Nord, la Manche Est, et le Golfe de Gascogne.

A l'inverse de certains polluants organiques persistants (POP) comme les polychlorobiphényles (PCB) ou les polybromodiphényléthers (PBDE), les HAP sont généralement peu bioaccumulés dans les tissus. Une fois absorbés par les organismes, ils sont biotransformés par différentes réactions métaboliques impliquant l'action d'enzymes visant à rendre ces molécules plus hydrophiles afin de pouvoir être excrétées ensuite par les voies biliaires et urinaires (Meador et al., 2008 ; Van der Oost et al., 2003). Au cours de ces réactions, des espèces chimiques toxiques peuvent être produites et ainsi exprimer la toxicité des HAP, notamment en termes de dommages à l'ADN. Si ces dommages ne sont pas réparés ou dans le cas d'une réparation incomplète, des mutations peuvent être engendrées et mener à la formation de cancers. La génotoxicité des HAP étant dépendante de leur biotransformation, on parle alors de bioactivation.

En milieu aquatique, des études *in situ* ont permis de mettre en évidence une corrélation entre la présence de HAP dans l'environnement et les niveaux de dommages à l'ADN chez les poissons (Aas et al., 2001 ; Barbee et al., 2008). De plus, les HAP sont connus comme induisant de nombreux effets toxiques (mutagénicité, embryotoxicité, tératogénicité, immunotoxicité, cytotoxicité...). De ce fait, les HAP font partie de la liste des 33 substances prioritaires dangereuses établie par la Directive Cadre Européenne sur l'Eau (DCE) présentée en annexe 1 (2000/60/CE). L'agence de protection de l'environnement des États-Unis (US EPA) a également établi une liste de 16 HAP considérés comme des substances prioritaires (Annexe 2). Cette liste sert de référence au niveau mondial.

Parmi les HAP présents dans l'environnement marin, le benzo[a]pyrène (BaP) est le plus étudié. En effet, ses mécanismes de bioactivation et ses effets génotoxiques, mutagènes et cancérigènes ont été décrits chez les rongeurs et chez certains organismes marins (Akcha et al., 2003 ; Xue et Warshawski, 2005). Sa conformation présentant une région dite « région baie » est importante, puisqu'elle conditionne les lieux d'addition de certains groupements entraînant la formation de métabolites électrophiles comme le BaP-diol-époxyde (BPDE). Le BaP est donc couramment utilisé comme modèle dans les études de cancérogénèse chimique. Le Fluoranthène (Fluo) est quant à lui un des HAP les plus abondants dans le milieu marin et dans l'alimentation humaine. Pourtant, ses mécanismes de biotransformation ont été peu étudiés, particulièrement chez les organismes marins. De plus, son potentiel génotoxique et mutagène est controversé chez les vertébrés supérieurs. La conformation du Fluo ne présentant pas de région « baie », ses mécanismes de biotransformation pourraient donc impliquer des voies d'activation différentes de celles du BaP. Il apparaît donc pertinent d'étudier son métabolisme et ses effets génotoxiques chez les organismes marins.

Dans ce contexte, le but des travaux de cette thèse était d'acquérir de nouvelles connaissances quant au devenir et à la génotoxicité de deux HAP d'intérêt, le BaP et le Fluo, chez les poissons marins. Cette thèse pluridisciplinaire impliquant des aspects de chimie et de biologie s'est organisée autour de deux axes principaux.

Le premier axe visait à étudier le métabolisme du BaP et du Fluo *in vitro* par la détection et la quantification de certains métabolites produits chez la sole. Il devait permettre notamment de déterminer les métabolites formés majoritairement, d'évaluer les parts relatives de chaque famille de métabolites et de calculer certains paramètres cinétiques de biotransformation des HAP. Pour cela, des microsomes hépatiques de soles (*Solea solea*, Linnaeus 1758) et de limande (*Limanda limanda*, Linnaeus 1758) ont été exposés au BaP et au Fluo. Les microsomes sont des fractions du réticulum endoplasmique contenant les enzymes de biotransformation des xénobiotiques. Ils sont donc considérés comme des réacteurs enzymatiques, capables de générer rapidement des métabolites en grandes quantités. Les métabolites produits au cours de ces expositions aux HAP ont été analysés par deux techniques complémentaires. La première méthode devait permettre l'observation du profilage métabolique complet du BaP et du Fluo par Chromatographie Liquide Haute Pression couplée à un détecteur de radioactivité (Radio-HPLC) à la suite d'expositions de microsomes de soles aux HAP radio-marqués au ^{14}C (Perdu et al., 1993). La seconde technique est basée sur une nouvelle méthode d'analyse par Chromatographie Liquide Ultra Pression couplée à de la Spectrométrie de Masse en tandem (UPLC-MS/MS) (Le Dû-Lacoste, 2008). Cette méthode devait permettre de quantifier de façon sensible les métabolites produits pour lesquels des standards sont disponibles. Ces analyses ont été réalisées en étroite collaboration avec l'UMR Xénobiotiques de l'INRA et le LPTC, en liens avec les travaux de thèse de Carine Jacques et de Marie Le Dû-Lacoste respectivement.

Le second axe de cette thèse visait à étudier les effets génotoxiques des HAP et de leurs métabolites, en termes de dommages oxydatifs (oxydation des bases de l'ADN, cassures de brins de l'ADN), et de formation d'adduits à l'ADN. Pour cela, des expérimentations *in vitro* de microsomes hépatiques et de primo-cultures d'hépatocytes de sole ont été réalisées. Ce type de modèles permet la réalisation d'expositions rapides, dont les résultats renseignent quant à la génotoxicité des HAP aux niveaux subcellulaires et cellulaires.

De plus, afin d'étudier les effets des HAP à l'échelle de l'individu, des expérimentations *in vivo* ont été réalisées dans le cadre du projet national Sole BEMol (Sole Bioaccumulation Ecotoxicologie Modélisation), financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR). Ce projet vise à étudier le devenir et les effets biologiques de trois familles de contaminants organiques (HAP, PCB, PBDE) chez des juvéniles de sole, de l'individu à la population, afin de prédire le potentiel des réponses des poissons à la contamination chimique du milieu. Au cours de ce projet, des données concernant la biodisponibilité, la bioaccumulation et la biotransformation des contaminants sont obtenues lors d'études *in situ* et lors d'expérimentations contrôlées. Divers marqueurs d'exposition et d'effets biologiques des contaminants sont étudiés. L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce projet a pour objectif de développer un modèle de type Bilan Energie Dynamique (DEB) sur le devenir des contaminants organiques dans les soles, en y intégrant un volet contaminants (DEB-Tox). Des

soles ont été exposées par la voie trophique à un mélange de BaP, Fluo et Pyr pendant différentes périodes à différentes concentrations. Au cours de ces expositions, les niveaux de métabolites biliaires et de dommages à l'ADN ont été mesurés respectivement en tant que marqueur d'exposition et d'effet. L'objectif de ces expositions était d'étudier la relation entre la biotransformation des HAP et leurs effets génotoxiques. Au cours de ces expositions, des paramètres physiologiques de croissance et de reproduction ont été mesurés par des laboratoires partenaires, permettant ainsi d'étudier le lien entre la génotoxicité des HAP et les effets physiologiques des HAP chez la sole.

Chapitre 1 – Synthèse bibliographique

1. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

1.1. Introduction

Les HAP sont des contaminants hydrophobes présents dans la totalité des compartiments environnementaux (atmosphère, sols, fleuves et rivières, océans...). Leur présence dans l'environnement résulte principalement des activités anthropiques, mais ils sont également apportés dans le milieu de façon naturelle, lors d'éruptions volcaniques, pouvant avoir lieu au fond des océans, mais également lors de feux de forêts. La production des HAP résulte principalement de 3 processus (Baumard et al., 1998 ; Neff et al., 2005) :

- les fuels fossiles utilisés pour le raffinage du pétrole, sont composés de HAP pétrogéniques et sont formés par maturation de la matière organique suivant un gradient géothermique ;
- les HAP pyrogéniques ou pyrolytiques dérivent de la combustion de la matière organique ;
- les HAP diagéniques sont formés par la dégradation rapide de précurseurs organiques par des procédés chimiques ou biologiques.

L'étude du profil chimique des HAP dans le milieu ainsi que le suivi spatio-temporel de leur niveau à grande échelle renseignent sur leur origine dans l'environnement (Bouloubassi et Saliot, 1993). En général, la présence de HAP en milieu marin résulte principalement d'apports pyrolytiques anthropiques, avec des apports pétrogéniques supplémentaires aux abords des ports et des raffineries de pétrole (Skarphedinsdottir et al., 2007). En baie de Seine (Figure 1) les apports dus aux retombées atmosphériques représentent une part non négligeable, bien que les apports fluviaux et par ruissellement soient majoritaires.

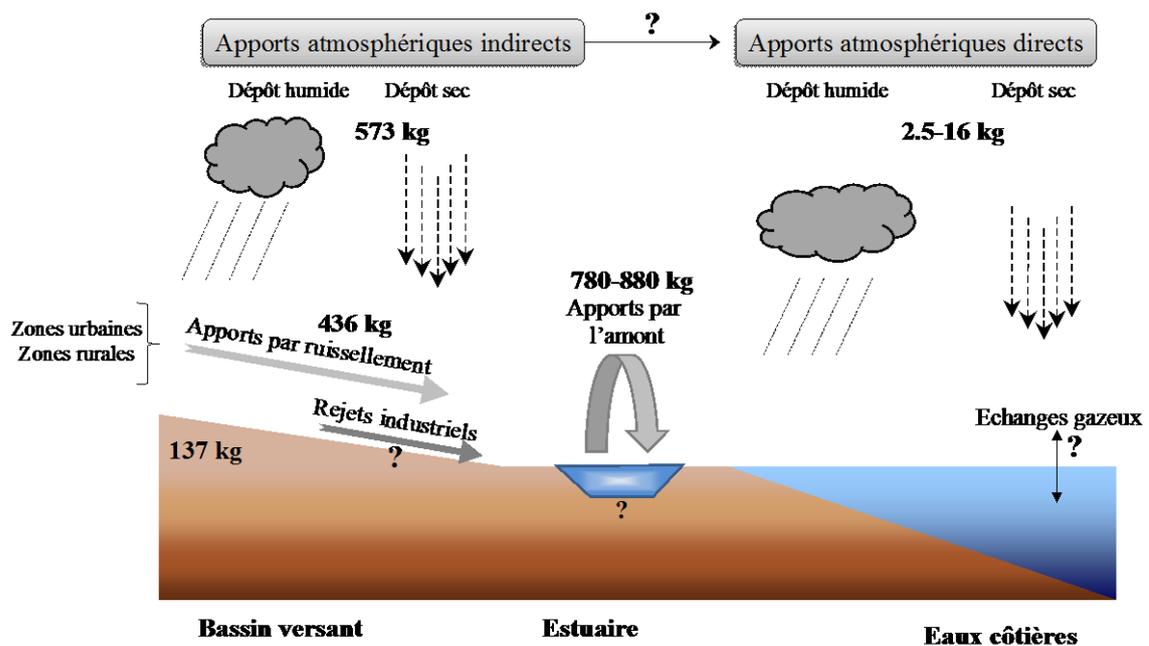


Figure 1 – Bilan des apports en HAP dans l'estuaire de la Seine en 2002-2003 (d'après Motelay-Massei et al., 2007).

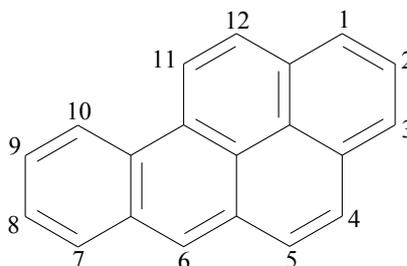
Bien que les HAP soient connus comme étant toxiques à différents niveaux, leurs effets les plus étudiés concernent leur cancérogénicité pour l'homme. Ils sont donc classés au niveau européen et mondial selon leur potentiel cancérogène. Les critères de distinction des effets cancérogènes de molécules sont décrits en annexe 3. Au cours de cette thèse, deux HAP ont été principalement étudiés *in vitro* et *in vivo* : le benzo[a]pyrène (BaP) et le fluoranthène (Fluo), en termes de métabolisme et de génotoxicité. Le BaP, connu pour son potentiel génotoxique, mutagène et cancérigène, est utilisé comme contaminant modèle. Le Fluo présente un intérêt particulier car c'est un des HAP les plus abondants dans le milieu marin et dans l'alimentation humaine. Néanmoins, ses voies de métabolisation et ses effets génotoxiques sont peu connus. Le pyrène (Pyr) a également été très étudié. Sa biotransformation générant uniquement le 1-OH-Pyr, ce dernier est fréquemment utilisé comme traceur de contamination par les HAP. Les principales caractéristiques physico-chimiques ainsi que quelques propriétés toxicologiques et écotoxicologiques de ces trois HAP sont rapportées ci-après.

1.2. Benzo[a]pyrène (BaP)

Numéro CAS : 50-32-8

Formule brute : $C_{20}H_{12}$

Formule semi-développée :



1.2.1. Propriétés physico-chimiques

Masse molaire	252,32 g/mol
Solubilité eau douce	12 nM
Log K_{ow}	5,97
Densité	1,351

Tableau 1 – Paramètres physico-chimiques du BaP

La solubilité du BaP dans l'eau de mer est fortement dépendante de la salinité. La solubilité du BaP apparaît cependant comme étant plus faible en eau de mer qu'en eau douce (Turner et Rawling, 2002).

1.2.2. Propriétés toxicologiques

Lors d'expositions aiguës, des doses létales 50 (DL50) ou concentrations létales 50 (CL50) ont pu être calculées (Tableau 2). Elles correspondent respectivement à la dose et à la concentration entraînant 50% de mortalité.

Tableau 2 – Résumé des DL50 et CL50 mesurées après expositions aiguës (ED : organismes d'eau douce)

	Espèce	Voie d'exposition	DL50/CL50	Source
Vertébrés supérieurs	Souris	orale	> 1600 mg/kg	INERIS, 2006
	Souris	intrapéritonéale	250 mg/kg	
	Rat	sous-cutanée	50 mg/kg	Perez et al., 2003
	Kératinocytes épidermaux humains	<i>In vitro</i>	2,0 µM	
Invertébrés aquatiques	<i>Daphnia pulex</i> (ED)	Eau	5 µg/L (96h)	INERIS, 2006
	<i>Eurytemora affinis</i> (ED)	Eau	58 µg/L (96h)	Forget-Leray et al., 2005

À la suite d'expositions chroniques, des concentrations sans effet observé (CSEO) ou des doses sans effet néfaste observé (DSENO) ont été calculés pour plusieurs espèces (Tableau 3).

Tableau 3 – Résumé des CSEO/DSENO mesurées après expositions chroniques

	Espèce	Voie d'exposition	CSEO/DSENO	Source
Vertébrés supérieurs	Rat	Orale	12,5 mg/kg	Saunders et al., 2002
	Rat	Orale	150 mg/kg/j	INERIS, 2006
Invertébrés aquatiques	<i>Eurytemora affinis</i>	Eau	12 µg/L (10j)	Forget-Leray et al., 2005

1.2.3. Effets toxiques

En termes de cancérogénicité, le BaP est classé par l'Union Européenne comme substance cancérogène pour l'homme (catégorie 2). Au niveau mondial, il est identifié comme cancérogène pour l'homme par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) (groupe 1, IARC, en préparation) et comme probablement cancérogène pour l'homme par l'US EPA (classe B2).

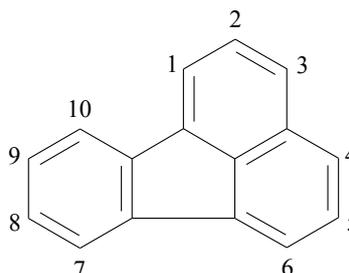
L'Union Européenne a également classé le BaP comme ayant des effets toxiques sur la reproduction (catégorie 2). En effet, chez les rongeurs, il induit une diminution du poids des gonades chez les femelles et des modifications morphologiques du sperme chez les mâles (Wyrobeck et al., 1983). De plus, une réduction de la fertilité chez les individus exposés *in utero* a été démontrée (IARC). Le BaP est principalement connu pour ses effets mutagènes, génotoxiques et cancérogènes. Des effets immunotoxiques du BaP ont également été rapportés chez le poisson (Carlson et al., 2002).

1.3. Fluoranthène

Numéro CAS : 206-44-0

Formule brute : C₁₆H₁₀

Formule semi-développée :



1.3.1. Propriétés physico-chimiques

Masse molaire	202,26 g/mol
Solubilité eau douce	1,28 µM
Log Kow	5,10
Densité	1,252

Tableau 4 – Paramètres physico-chimiques du fluoranthène.

1.3.2. Propriétés toxicologiques

À la suite d'expositions aiguës, des DL50/CL50 ont pu être calculées chez différentes espèces de vertébrés supérieurs, invertébrés et vertébrés aquatiques (Tableau 5).

Tableau 5 – Résumé des DL50/CL50 calculées à la suite d'expositions aiguës (ED : organismes d'eau douce ; EM : organismes d'eau de mer).

	Espèce	Voie d'exposition	DL50/CL50	Source
Vertébrés supérieurs	Rat	orale	2000 mg/kg	INERIS, 2005
	Souris	orale	100 mg/kg	
	Lapin	cutanée	3180 mg/kg	
Invertébrés aquatiques	<i>Hydra americana</i> (ED)	Eau	0,07 mg/L (96h)	Spehar et al., 1999
	<i>Daphnia magna</i> (ED)	Eau	0,117 mg/L (96h)	
	<i>Gammarus minus</i> (ED)	Eau	0,032 mg/L (48h)	Horne et Oblad, 1983
	<i>Chironomus thummi</i> (ED)	Eau	0,044 mg/L (96h)	
Poissons	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (ED)	Eau	0,187 mg/L (96h)	Horne et Oblad, 1983
	<i>Ictalurus punctatus</i> (ED)	Eau	0,036 mg/L (96h)	Gendusa, 1990
	<i>Pleuronectes americanus</i> (EM)	Eau	>0,188	Spehar et al., 1999

Lors d'expositions chroniques ou sub-chroniques, des CSEO ou DSENO ont été calculées, et sont récapitulées dans le Tableau 6.

Tableau 6 – Résumé des CSEO/DSENO calculées suite à des expositions chroniques (ED : organismes d'eau douce ; EM : organismes d'eau de mer).

	Espèce	Voie d'exposition	NOEC/NOAEL	Source
Vertébrés supérieurs	Souris	orale	125 mg/kg/j	INERIS, 2005
Invertébrés aquatiques	<i>Ceriodaphnia dubia</i> (ED)	Eau	0,001 mg/L	INERIS, 2005 Spehar et al., 1999
	<i>Daphnia magna</i> (ED)	Eau	0,01 mg/L	
	<i>Mysidopsis bahia</i> (EM)	Eau	0,011 mg/L	
Poissons	<i>Pimephales promelas</i> (ED)	Eau	0,010 mg/L	Spehar et al., 1999

1.3.3. Effets toxiques

En termes de cancérogénicité, le Fluo n'est pas considéré comme cancérogène pour l'homme que ce soit par l'IARC (Groupe 3, IARC, 1987) ou l'US EPA (classe D, US EPA, 1989). Peu d'études ont été réalisées quant à la toxicité du Fluo. Cependant, des effets mutagènes du Fluo ont été mis en évidence chez le rat (Babson et al., 1986a). De plus, en conditions d'exposition sub-chronique, des effets sur les paramètres hématologiques ont été démontrés (Knuckles et al., 2004). En conditions d'exposition sub-aiguë (injection intrapéritonéale de 100, 200, ou 400 mg/kg), des effets comportementaux ont également été observés (Saunders et al., 2003).

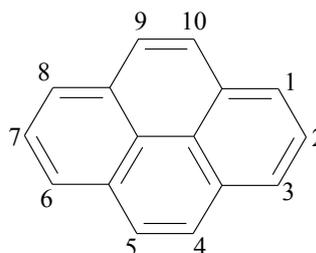
Chez la souris, le Fluo semble induire des effets sur la reproduction et le développement (INERIS, 2005). Lors d'expositions *in vitro* de différents types de cellules humaines, le Fluo induit également un effet immunotoxique (Oostingh et al., 2008).

1.4. Pyrène

Numéro CAS : 129-00-0

Formule brute : $C_{16}H_{10}$

Formule semi-développée :



1.4.1. Propriétés physico-chimiques

Masse molaire	202,26 g/mol
Solubilité eau douce	0,64 μM
Log Kow	5,32
Densité	1,271

Tableau 7 – Paramètres physico-chimiques du Pyrène.

1.4.2. Propriétés toxicologiques

A la suite d'expositions aiguës ou chroniques, des DL50/CL50 (Tableau 8) et des CSEO/DSENO (Tableau 9) ont été calculées.

Tableau 8 – DL50/CL50 relevées pour le pyrène

	Espèce	Voie d'exposition	CL50/DL50	Source
Vertébrés supérieurs	Rat	Orale	2700 mg/kg	Sigma, 2008*
	Rat	Inhalation	170 mg/m ³	
Invertébrés terrestres	Lumbricus rubellus	contact	0,0068 mg/mL	Brown et al., 2004
	Folsomia candida	contact	21,7 µg/g	Herbert et al., 2004
Invertébrés aquatiques	Utterbackia imbecillis (ED)	Eau	2,63 µg/L (24h)	Weinstein et Polk, 2001
	Grandidierella japonica (EM)	Eau	58,2 µg/L (96h)	Lee et al., 2005
	Gammarus eaqueicauda (EM)	Eau	73,49 µg/L (48h)	Sanz-Lazaro et al., 2008
	Gammarus locusta (EM)	Eau	60,78 µg/L (48h)	
	Corophium multisetosum (EM)	Eau	25,29 µg/L	
	Oithona davisae (EM)	Eau	0,8 µM (48h)	Barata et al., 2005
Poissons	Oncorhynchus mykiss (ED)	Eau	>2,00 mg/L	Sigma, 2008*

* : données provenant des feuilles de sécurités des produits commercialisés par la société Sigma-Aldrich.

Tableau 9 – CSEO/DSENO relevées pour le pyrène

	Espèce	Voie d'exposition	CSEO/DSENO	Source
Vertébrés supérieurs	Souris	orale	75 mg/kg/j	US EPA, 1989
Invertébrés terrestres	<i>Folsomia candida</i>	contact	5 mg/kg (28j)	Herbert et al., 2004
	<i>Folsomia fimetaria</i>	contact	15 mg/kg	Jensen et Sverdrup, 2002
Invertébrés aquatiques	<i>Grandidierella japonica</i> (EM)	Eau	25 µg/L	Lee et al., 2005

1.4.3. Effets toxiques

Du fait du nombre restreint d'études relatant un effet cancérigène du pyrène, l'IARC et l'US EPA le considèrent comme non classifiable quant à sa cancérogénicité pour l'homme (Groupe 3 et classe D respectivement). Peu d'études concernent directement la toxicité du pyrène. Il n'est considéré ni comme génotoxique, ni comme mutagène, ni comme cancérigène. Lors d'une étude récente, des juvéniles de truite (*Oncorhynchus mykiss*) ont été exposés durant 4 jours à du pyrène, à des concentrations de 25 et 100 µg/L (Krasnov et al., 2005). À la suite de ces expositions, l'expression de nombreux gènes a été mesurée par l'utilisation de puces à ADN. Le pyrène semble affecter principalement les gènes impliqués dans la maintenance de l'intégrité génétique, la réponse immunitaire, la glycolyse et l'homéostasie du fer.

1.5. Concentrations environnementales en HAP

Plusieurs études de terrain ont été menées afin de mesurer le niveau des HAP en milieu marin. En France, le bassin de la Seine est un site particulièrement exposé aux HAP, du fait des fortes activités industrielles des villes desservies par la Seine, telles que Paris, Rouen, ou Le Havre. Les HAP étant des molécules hydrophobes, leur concentration dans la phase particulaire est bien plus élevée que dans la phase dissoute. Le niveau d'exposition des organismes marins aux HAP peut être évalué de façon indirecte principalement par la mesure des HAP dans la phase particulaire (Tableau 10) et dans les sédiments (Tableau 11).

Le long du littoral français, le Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin a effectué un suivi de la contamination des mollusques bivalves de 2001 à 2004. Le niveau de HAP présents dans les huîtres et les moules prélevées a été estimé par les concentrations en Fluo. La contamination des mollusques par les HAP est apparue comme hétérogène, avec un gradient Nord-Sud très marqué de Dunkerque à la Bretagne nord. De très fortes concentrations ont été mesurées dans les bivalves prélevés en baie de Seine et plus particulièrement au cap de la Hève ($180 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de poids sec) (Claisse et al., 2006). Au cours d'une étude menée en estuaire de Seine en juin 2003 et juin 2004, la somme des teneurs de 21 HAP a été mesurée dans les dreissènes provenant de plusieurs sites (HAP mesurés : NAPH, ACE, Acénaphthylène, FLU, PHE, FTH, ANT, PYR, BaA, CHR+triphénylène, BbF+BkF+BjF, BaP, BeP, Pérylène, BghiP, IcdP, DahA+DacA). Les dreissènes de la partie amont de l'estuaire sont apparues comme étant 2 à 3 fois plus contaminées en HAP que celles provenant de la partie aval. Sur le site de La Bouille, situé en amont, les teneurs en HAP atteignent 1000 ng.g^{-1} de poids sec de dreissène (Cachot et Degrémont, 2008).

Tableau 10 – Concentrations en HAP dans l'eau (ng.L^{-1}).

Site	Matrice	BaP	Fluo	Pyr	Σ HAP	Référence
Seine (Station de Tancarville)	Phase dissoute	0,30	1,40	2,80	11,10	Cailleaud et al., 2007
Seine (Station de Tancarville)	Phase particulaire	278,00	377,00	346,00	3361,00	Cailleaud et al., 2007
Bassin de la Seine (six stations)	Phase dissoute	< 1,0	2 à 20	2 à 20	–	Tusseau-Vuillemin et al., 2007
Bassin de la Seine (Moyenne 25 sites)	Phase dissoute	traces	3,00	5,00	20,00	Fernandes et al., 1997
Bassin de la Seine (Moyenne 25 sites)	Phase particulaire	16,00	23,00	22,00	204,00	Fernandes et al., 1997
Bassin de la Seine, Site du vieux port	Phase particulaire	55,00	91,00	82,00	687,00	Fernandes et al., 1997

Tableau 11 – Concentrations en HAP dans les sédiments (ng.g⁻¹ ps).

Site	Matrice	BaP	Fluo	Pyr	Σ HAP	Référence
Baie de Seine, Le Havre	Sédiments de surface	145,00	253,00	215,00	1623,00	Cachot et al., 2006
Seine, St Maurice (Amont de Paris)	Sédiments (0-0.5 cm)	3020,00	4630,00	4510,00	33600,00	Ollivon et al., 2002
Seine, St Maurice (Amont de Paris)	Sédiments (0.5-2 cm)	1680,00	4040,00	2510,00	24500,00	Ollivon et al., 2002
Seine, St Cloud (Aval de Paris)	Sédiments (0-2 cm)	300,00	560,00	420,00	3330,00	Ollivon et al., 2002
Sud Ouest de la mer de Barents	Sédiments de surface (0-1cm)	3,69	5,94	4,09	194,00	Boitsov et al., 2009
Delta du Rhône (9 sites)	Sédiments de surface (0-1cm)	170,00	405,00	335,00	4144,44	Bouloubassi et Saliot, 1993
Port de Vendres (intérieur)	Sédiments de surface (0-2 cm)	570,00	970,00	800,00	6900,00	Baumard et al., 1998
Port de Vendres (extérieur)	Sédiments de surface (0-2 cm)	14,00	19,00	16,00	150,00	Baumard et al., 1998
Port de Barcelone (intérieur)	Sédiments de surface (0-2 cm)	170,00	180,00	190,00	1700,00	Baumard et al., 1998
Port de Barcelone (extérieur)	Sédiments de surface (0-2 cm)	610,00	1300,00	1100,00	8400,00	Baumard et al., 1998
Baie d'Arcachon (7 sites)	Sédiments de surface (0-2 cm)	149,22	326,82	248,98	1918,24	Baumard et al., 1999
Mer baltique zones urbanisées/ industrialisées (3 sites)	Sédiments de surface (0-5 cm)	609,03	1434,00	1347,33	9169,67	Baumard et al., 1999
Mer baltique zones offshore (5 sites)	Sédiments de surface (0-5 cm)	0,54	0,94	0,70	8,36	Baumard et al., 1999

2. Biotransformation des HAP

2.1. Introduction

Les HAP, une fois absorbés par les organismes, vont être biotransformés en composés plus hydrosolubles, afin de pouvoir être excrétés. La biotransformation se divise en deux phases : une première phase dite de fonctionnalisation vise à introduire un groupement fonctionnel sur la molécule afin de la rendre plus polaire (Michel, 1993); une seconde phase dite de conjugaison vise à conjuguer les métabolites issus de la première phase à des composés hydrosolubles (glutathion, sulfates, acides mercapturiques et glucuroniques) pour en faciliter l'excrétion. Certains métabolites produits au cours de la biotransformation peuvent se lier de façon covalente à l'ADN et former des adduits à l'ADN. De plus, lors de certaines réactions au cours de la biotransformation, des espèces réactives de l'oxygène (ERO) peuvent être générées et entraîner des dommages oxydatifs à l'ADN. Chez les vertébrés supérieurs, la biotransformation du BaP est bien connue.

2.2. Biotransformation des HAP : réactions de phase I

Il existe 3 voies principales de bioactivation des HAP, toutes impliquant l'action de plusieurs enzymes. Ces enzymes ont pour particularité d'être inductibles. Présentes à un faible niveau de base dans les organismes, la présence de HAP va induire leur production par divers processus. Les principales réactions des différentes voies de bioactivation des HAP, et le rôle des différentes enzymes impliquées, sont décrits ci-après.

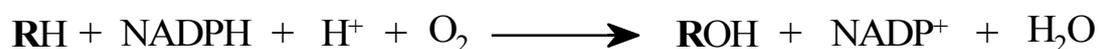
2.2.1. Biotransformation du BaP

2.2.1.1. Voie des diol-époxydes

Enzymes impliquées

Enzymes d'oxydation

Au cours du métabolisme des HAP, les enzymes impliquées dans les réactions d'oxydation sont dépendantes du cytochrome P450 (CYP450). Les CYP450 constituent une superfamille multigénique d'enzymes inductibles catalysant la plupart des réactions d'oxydation et de réduction du métabolisme des xénobiotiques et de certaines molécules endogènes (Gerbal-Chaloin, 2000). Chez l'homme, 17 familles de CYP450 ont été dénombrées. Parmi elles, les familles CYP1, CYP2, et CYP3 sont impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques (Gerbal-Chaloin, 2000). Les CYP450 sont associés à des chaînes de transfert d'électrons dont la source est le NADPH. De manière générale, les réactions d'hydroxylation catalysées par le CYP450 mènent à l'insertion d'un atome d'oxygène dans un substrat. Ces réactions peuvent s'écrire sous la forme suivante :



L'expression des CYP1A, 1B et 1C est contrôlée par le récepteur Aryl hydrocarbure (AhR) (Spink et al., 2008). Les récepteurs Ah sont situés principalement dans le cytoplasme, associés à des protéines chaperonnes du type Heat Shock Protein 90. Lorsque le ligand entre dans le cytoplasme et se lie à l'AhR, le complexe formé est alors transporté dans le noyau où il forme des dimères avec des protéines de translocation nucléaire de l'AhR (ARNT). Le complexe ligand-AhR-ARNT interagit avec les éléments de réponse de l'AhR pour activer ou réprimer la transcription et la traduction des gènes cibles, dont les gènes des CYP450. Le CYP1A semble être le plus fortement induit par l'AhR (Hahn et al., 2005). Chez les mammifères et les poissons, l'existence d'un gène codant pour un répresseur de la fonction AhR, le gène AhR repressor, a été démontrée (Hahn, 2002).

Les CYP1A1, 1A2 et 1B1 sont les formes du CYP450 les plus impliquées dans l'activation des HAP (Shimada et al., 2001). Bien que le CYP1A2 soit exprimé en particulier dans le foie, il catalyse la production des dihydrodiols à un taux nettement plus faible que les CYP1A1 et 1B1, qui sont des isoformes préférentiellement exprimées dans les organes extra-hépatiques. Le CYP1A1 semble être impliqué plutôt dans la détoxification du BaP que dans son activation, qui est plutôt catalysée par les enzymes du CYP1B1 (Uno et al., 2006). En effet, chez la souris et l'humain, le CYP1B1 ne catalyse pas la transformation du BaP en 4,5-dihydrodiol-BaP, tandis qu'il semble être impliqué dans la formation de métabolites pouvant mener à la formation d'adduits, tels que le 7,8-dihydrodiol, les phénols et les quinones (Nesnow et al., 2002).

Les enzymes du cytochrome P450 ont été largement étudiées. L'enzyme représentative du CYP1A1 la plus étudiée est la 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) (Burgeot et al., 1996). De par son implication dans les mécanismes de biotransformation de nombreux contaminants hydrophobes tels que les HAP ou les PCB, elle est couramment utilisée comme biomarqueur d'exposition (Minier et al., 2000). Des effets d'induction ou d'inhibition ont été observés après expositions *in vitro* et *in vivo* chez les vertébrés supérieurs (Shimada et Guengerich, 2006 ; Till et al., 1999), mais également chez les poissons (Ahokas et Pelkonen, 1984 ; Fent et Bästsch, 2000 ; Kopecka-Pilarczyk et Correia, 2009 ; Willett et al., 1998). Pour la plupart des HAP induisant une modulation de l'activité EROD *in vitro*, celle-ci suit généralement une courbe « en cloche », définie par une induction aux plus faibles concentrations, suivie d'une diminution de l'induction avec l'augmentation de la concentration en HAP et du temps d'exposition (Spink et al., 2008 ; Till et al., 1999). Certains HAP comme le fluoranthène ont cependant été démontrés comme entraînant une diminution de l'activité EROD induite par le BaP (Willett et al., 2001). Les auteurs suggèrent que le Fluo pourrait inhiber l'activité de l'EROD par la régulation du CYP450.

Enzymes d'hydrolyse

L'hydrolase la plus impliquée dans le métabolisme des HAP est l'époxyde hydrolase (EH). Chez les mammifères, il existe des EH microsomaux qui ont pour substrats préférentiels les *cis*-époxydes et les arène-oxydes, dont celles des HAP. Il existe également des EH cytosoliques qui ont pour substrat préférentiel les *trans*-époxydes (Fretland et al., 2000 ; Hammock et Hasagawa, 1983). L'induction de l'activité enzymatique, ainsi que du niveau de

protéines et d'ARNm de l'EH microsomale a été démontrée *in vitro* chez les vertébrés supérieurs (Pushparajah et al., 2008a), alors qu'aucune étude n'a encore mis en évidence un effet chez une espèce de poisson (James et al., 1997).

Réactions métaboliques de la voie des diol-époxydes

Chez les vertébrés supérieurs, la voie des diol-époxydes est considérée comme majoritaire et a été très étudiée dans le cas du BaP (Xue et Washawsky, 2005). Elle se déroule en trois étapes.

La première étape consiste en l'oxydation d'une double liaison, catalysée par les enzymes du cytochrome P450 (CYP450), menant à des arène-oxydes (=dihydro-époxydes) très instables (Jacob et Grimmer, 1996). Trois arène-oxydes sont formés majoritairement : le 4,5-, 7,8- et le 9,10-époxyde-BaP. Ils peuvent ensuite être rapidement hydrolysés par l'action de l'époxyde hydrolase (EH) pour former les *trans*-dihydrodiols correspondants (Borgen et al., 1973) ou être réarrangés en phénols (1-OH, 3-OH, 7-OH, ou 9-OH-BaP) (Jiang et al., 2007). Parmi les phénols produits, le 3-OH-BaP est formé majoritairement (Pandey et al., 2006). Les phénols produits vont être ensuite auto-oxydés en 1,6-, 3,6-, et 6,12-dione-BaP (Figure 4) (Cooper et al., 1983). Le 7,8-*trans*-dihydrodiol-BaP est quant à lui considéré comme le dihydrodiol majoritaire. Il subit une seconde oxydation de la double liaison adjacente à la fonction diol, catalysée par les enzymes du CYP450, pour générer le 7,8-diol-époxyde-BaP (BPDE), considéré comme le carcinogène ultime du BaP. Le BPDE peut ensuite être hydrolysé en tétraols inactifs (Xue et Warshawsky, 2005), ou conduire à des dommages à l'ADN par la formation d'adduits à l'ADN (Chen et al., 1996), ou par le biais de stress oxydatif (Douki et al., 2008).

Due à la prochiralité de la majorité des liaisons aromatiques des HAP, la formation des métabolites se fait sous une pression de stéréo-sélectivité importante. Chez les vertébrés supérieurs, l'oxydation de la liaison 7,8 du BaP mène quasiment exclusivement à la formation du 7R,8S-époxyde-BaP, et très peu au 7S,8R-époxyde-BaP (Yang, 1988). L'hydrolyse des époxydes génère exclusivement les *trans*-dihydrodiols, ce qui conduit à la formation respective du 7R,8R-dihydrodiol-BaP et du 7S,8S-dihydrodiol-BaP, le 7R,8R- étant nettement majoritaire (Levin et al., 1980). La métabolisation des dihydrodiols se fait préférentiellement en région « baie » ou « fjord » des HAP (Figure 2).

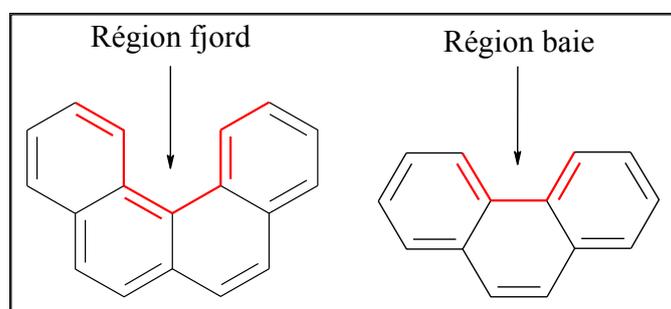


Figure 2 – Conformation des régions « baie » et « fjord ».

Dans le cas du BaP, l'époxydation du 7,8-dihydrodiol-BaP mène donc au 7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde-BaP, suivant 4 configurations isomériques : 2 paires d'énantiomères (\pm)-anti-

isomères et (\pm)-syn-isomères. Comme pour les précédentes réactions, les formes prédominantes sont produites suivant une grande stéréo-sélectivité. Chez des rats prétraités au 3-méthylcholanthrène, la forme prédominante est le (+)-anti-isomère : (7R,8S,9S,10R)-dihydrodiol-époxyde-BaP, qui possède les plus importantes propriétés carcinogènes. Les différentes étapes de cette voie de biotransformation sont représentées sur la Figure 3.

2.2.1.2. Voie des *o*-quinones

Cette voie d'activation du BaP (Figure 3) a également été largement décrite chez les vertébrés supérieurs.

Enzymes impliquées

Les premières étapes de formation des *o*-quinones sont communes à celles de la voie des diol-époxydes, jusqu'à l'obtention du 7,8-dihydrodiol-BaP. Les enzymes du CYP450 et l'EH sont donc impliquées dans cette voie de biotransformation.

Ensuite, les Aldo-Kéto Réductases (AKR) sont les enzymes impliquées dans la formation des *o*-quinones. Les AKR constituent une super-famille d'enzymes d'oxydoréduction (Jez et Penning, 2001). Elles ont été largement étudiées chez les vertébrés supérieurs et les bactéries (Jez et Penning, 2001), mais très peu d'études ont été conduites chez les poissons.

Une fois les quinones et les *o*-quinones formées, les nitroréductases jouent un rôle clé dans leur détoxification. Parmi elles se trouve la NAD(P)H-quinone oxydoréductase 1 (NQO1), également appelée DT diaphorase. Son induction est contrôlée par le récepteur Ah. Chez les poissons comme chez les vertébrés supérieurs, la NQO1 est la réductase principale des quinones (Hasspieler et al., 1996). Bien que sa fonction principale soit liée à la détoxification des quinones, elle semble être impliquée dans le mécanisme de génotoxicité des quinones, par la production NADPH dépendante d'ERO (Lemaire et al., 1996). Son rôle en termes de génotoxicité apparaît comme étant plus faible chez les poissons que chez les vertébrés supérieurs (Hasspieler et al., 1996).

Réactions métaboliques de la voie des *o*-quinones

Chez les vertébrés supérieurs, la dihydrodiol déshydrogénase (DD), appartenant à la famille des AKR, entre en compétition avec le CYP450, afin de catalyser l'oxydation NADP⁺ dépendante des trans-7,8-dihydrodiols du BaP en catéchols (Penning et al., 1996). Le catéchol étant lui même instable, il est transformé en *o*-quinone (7,8-dione-BaP) par deux oxydations successives à 1 e⁻ ; la première oxydation menant à la formation d'un radical semi-quinone, et la seconde à la *o*-quinone. Les quinones ainsi formées peuvent être retransformées en catéchol, via une réduction non enzymatique à 2 e⁻, ou en radical semi-quinone via une réduction enzymatique à 1 e⁻ (Penning et al., 1998), catalysée par des réductases.

Les *o*-quinones peuvent alors être inactivées par l'action de la NQO1, qui catalyse la réduction à 2 e⁻ des quinones et *o*-quinones en hydroquinones inactives (Ross et Siegel, 2004).

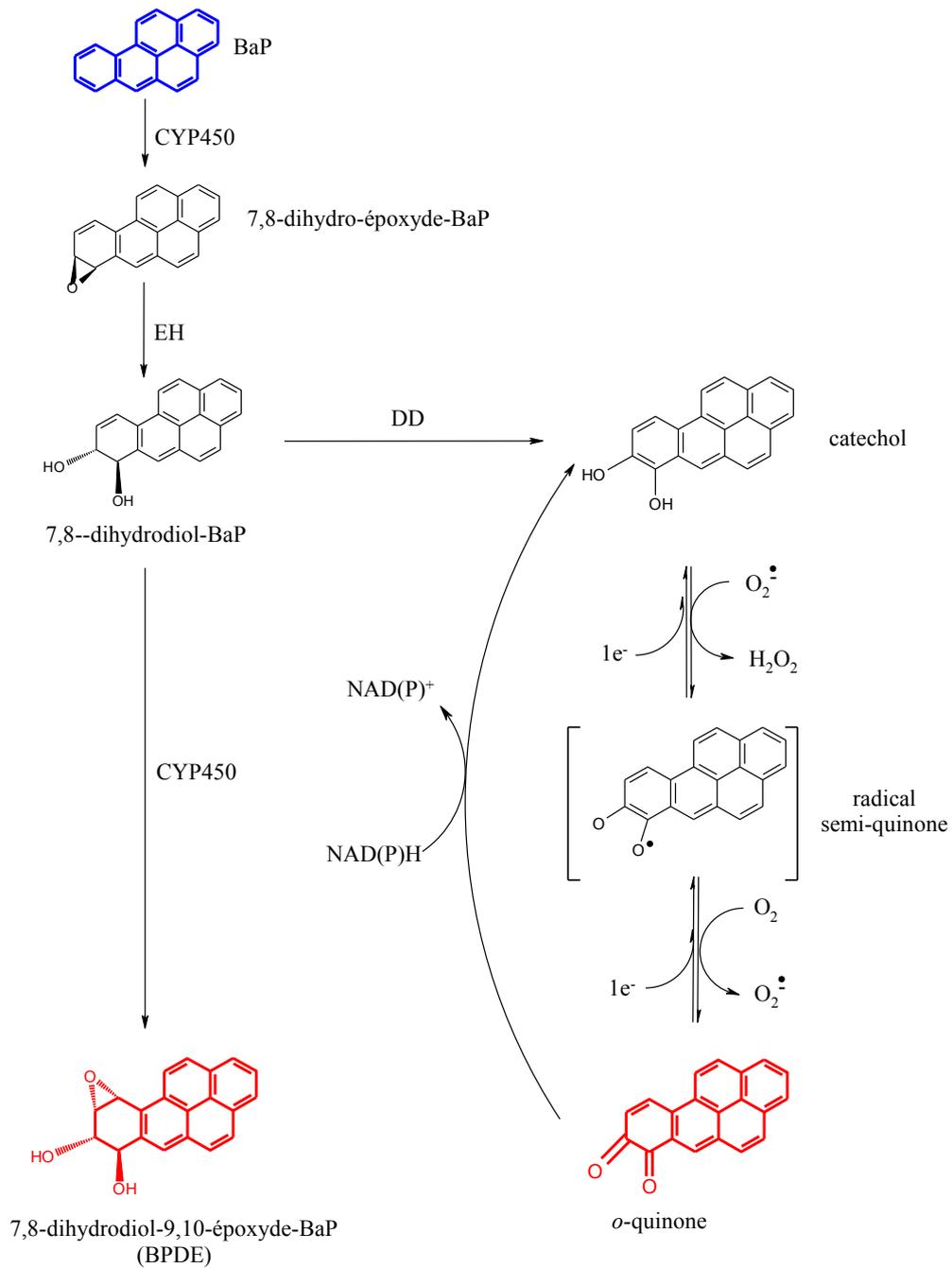


Figure 3 – Activation métabolique du BaP par les voies des diol-époxydes et des o-quinones, menant principalement à la formation respective du 7,8-BaP-diol-époxyde, et de la 7,8-dione-BaP (d'après Burczynski et al., 1998). (CYP450 : Cytochrome P450 ; EH : Epoxyde Hydrolase ; DD : Dihydrodiol Deshydrogénase).

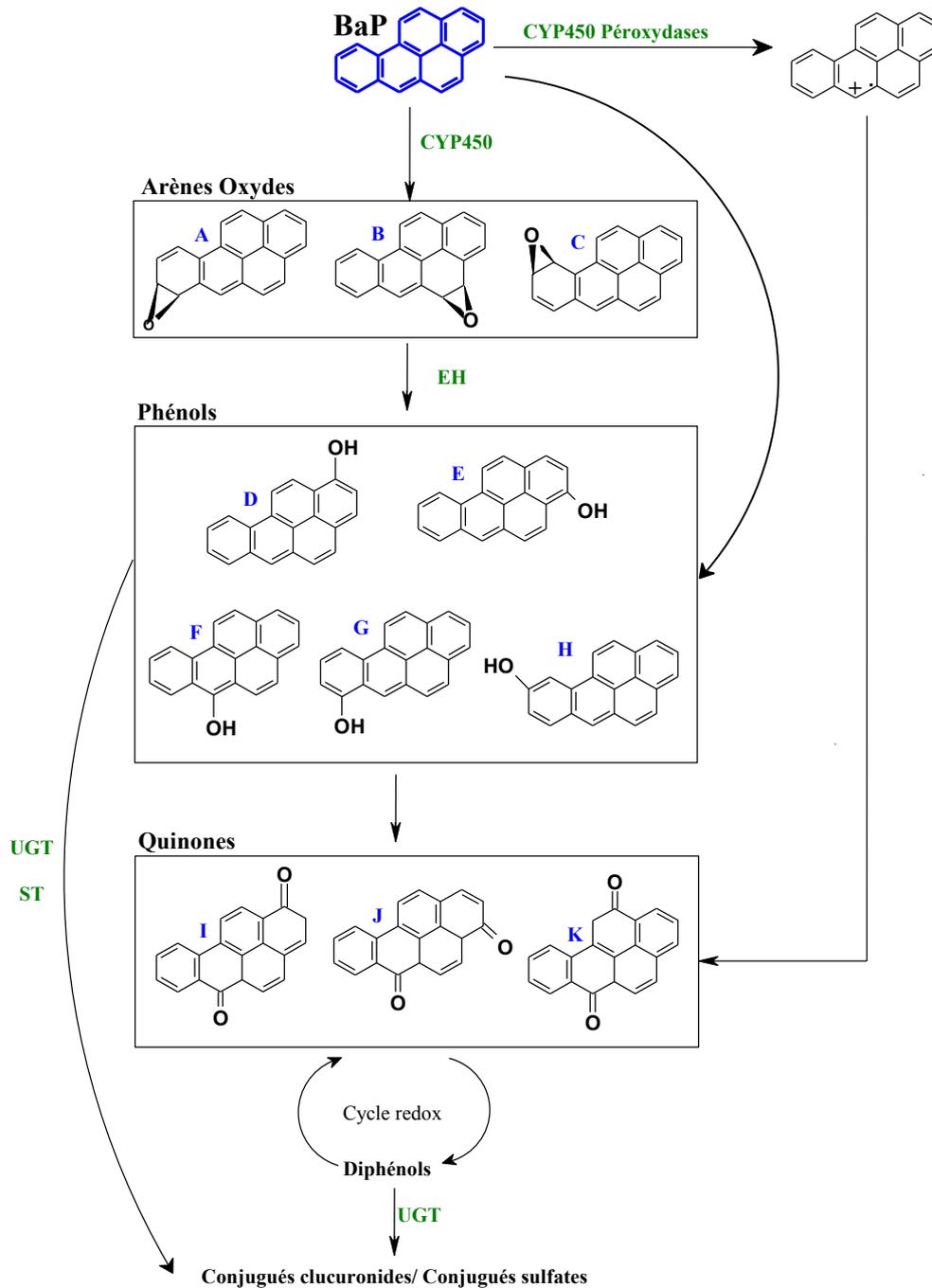


Figure 4 – Activation métabolique du BaP en quinones.

(A : 7,8-dihydro-époxyde-BaP ; B : 4,5-dihydro-époxyde-BaP ; C : 9,10-dihydro-époxyde-BaP ; D : 1-OH-BaP ; E : 3-OH-BaP ; F : 6-OH-BaP ; G : 7-OH-BaP ; H : 9-OH-BaP ; I : 1,6-dione-BaP ; J : 3,6-dione-BaP ; K : 6,12-dione-BaP)

Les abréviations en vert représentent les enzymes impliquées (CYP450 : Cytochrome P450 ; EH : Epoxyde hydrolase ; UGT : Glucuronosyl transférase ; ST : Sulfotransférase).

2.2.1.3. Voie du radical cation

La troisième voie principale impliquée dans la biotransformation des HAP est la voie du radical cation, également appelée voie du carbocation, décrite chez les vertébrés supérieurs par Cavalieri et Rogan (1985). Lors de cette voie, le carbone le plus électrophile du HAP, le C6

dans le cas du BaP, subit une oxydation à un électron. Cette réaction, catalysée par des peroxydases dépendantes du CYP450, entraîne la formation du radical cation activé (Penning et al., 1998). Bien qu'elles n'aient pas encore été isolées, les peroxydases responsables de la formation du radical cation ne semblent dépendre ni du CYP1A1, ni du CYP1B1 (Jiang et al., 2007). Le HAP activé va être transformé en phénol correspondant (6-OH-BaP), qui par auto-oxydation va former les 1,6-, 3,6-, ou 6,12-dione-BaP (Harvey, 1991). Les quinones ainsi formées peuvent subir des réactions d'oxydoréduction afin d'être transformées en semi-quinones, qui peuvent être retransformées en quinones (Kim et al., 2000).

Les réactions des trois principales voies de biotransformation des HAP sont résumées sur la Figure 5.

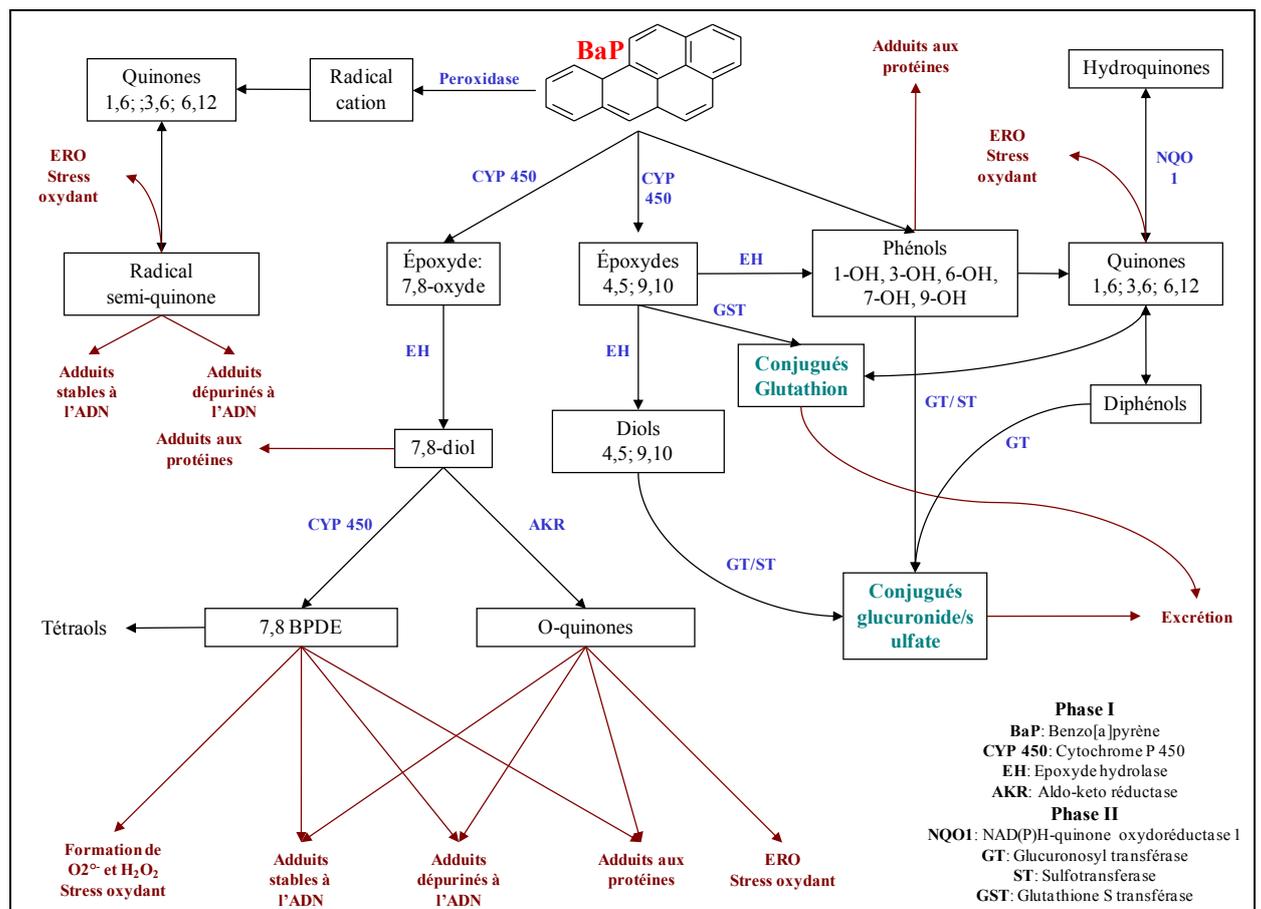


Figure 5 – Schéma d'activation métabolique du BaP chez les vertébrés supérieurs proposé à partir d'une synthèse de la littérature.

2.2.1.4. Autres voies mineures

La transformation des HAP par la formation d'esters d'acide sulfurique est considérée comme une voie mineure. Elle est impliquée uniquement dans la transformation des HAP possédant un groupement méthyle (-CH₃), et ceux pour lesquels le métabolisme génère un second groupe benzylique-alcoolique. Cette voie de biotransformation se fait par l'action de sulfotransférases, catalysant l'estérification d'acide sulfurique (Akcha et al., 2003 ; Xue et Warshawsky, 2005).

2.2.2. Biotransformation du Fluoranthène

Du fait de ses différences de conformation avec le BaP, notamment l'absence de région baie, le Fluo pourrait être biotransformé par des voies différentes de celles du BaP. Chez les poissons, très peu d'études portent sur la biotransformation du Fluo. Chez les vertébrés supérieurs, il semble que les mécanismes de biotransformation du Fluo et du BaP soient assez proches. Lors d'études menées *in vitro* chez des rongeurs et des humains, le Fluo semble être oxydé principalement en position 2,3-. Cette réaction catalysée par l'époxyde hydrolase mène à la formation du 2,3-dihydrodiol-Fluo. C'est le métabolite considéré comme un des métabolites majoritaires du Fluo, puisqu'il représente 70 à 90% des métabolites totaux chez l'homme (Day et al., 1992) et 29 à 43% chez les rongeurs (Babson et al., 1986a). Ce dihydrodiol est ensuite oxydé pour former les diol-époxydes correspondants (syn et anti 2,3-diol-1,10b-époxydes-Fluo) ainsi que le trans-2,3-dihydroxy-1,10-époxy-1,2,3,10b-tetrahydroFluo (2,3-DFLA) (Walker et al., 2006). D'autres métabolites ont été caractérisés chez les rongeurs. Parmi eux, la 2,3-dione-Fluo et le 3-OH-Fluo pourraient provenir du 2,3-dihydrodiol-Fluo (Babson et al., 1986a). De plus, la formation de 1-OH-Fluo et de 8-OH-Fluo démontre la possibilité pour le Fluo d'être oxydé en d'autres positions que la 2,3-. Deux dihydrodiols correspondants à ces phénols ont été identifiés, le 1,10b-dihydrodiol-Fluo et le 7,8-dihydrodiol-Fluo (Babson et al., 1986a).

Chez les poissons, aucune étude ne porte sur le métabolisme *in vitro* du Fluo. Une étude *in vivo* a révélé la présence de quatre métabolites conjugués majoritaires dans la bile de soles exposées par injection péritonéale au Fluo radiomarké. Ces métabolites, le 7-O-glucuronide-Fluo, le 8-O-glucuronide-Fluo, le trans-2,3-dihydro-3-hydroxy-2-O-glucuronide-Fluo, et le cis-2,3-dihydro-2-hydroxy-3-O-glucuronide-Fluo, détectés par Radio-HPLC, représentent 75 % de la radioactivité initiale associée au composé parent, dans la bile des poissons (Hillenweck et al., 2008).

2.3. Biotransformation des HAP : réactions de phase II

Les réactions de conjugaison sont catalysées par l'action de différentes enzymes dont les principales sont décrites ci-après.

2.3.1. Conjugaison par les UDP-Glucuronosyltransférases

Les UDP-Glucuronosyltransférases (UGT) représentent un groupe majoritaire d'enzymes de conjugaison, situé dans le réticulum endoplasmique. Elles sont dépendantes du récepteur Ah et catalysent la réaction de glucuronidation des dihydrodiols, c'est à dire la conjugaison des dihydrodiols avec le glucuronide. De plus, les quinones formées par oxydation des phénols peuvent subir une réduction pour former les diphénols correspondants, qui peuvent être conjugués au glucuronide afin d'être excrétés. Chez le rat, deux isoformes de la famille 1 (UGT1A6 et UGT1A7) et deux isoformes de la famille 2 (UGT2B1 et UGT2B2) catalysent la glucuronidation des dihydrodiols, des phénols et des diphénols du BaP (Bock et al., 1999). L'isoforme UGT1A7 semble être impliquée préférentiellement dans la conjugaison de la 3,6-dione-BaP (Grove et al., 2000). Une possible interaction protéine-protéine entre le CYP1A et

les UGT responsables de la conjugaison des phénols pourrait intervenir dans le mécanisme d'action de ce type de conjugaison (Taura et al., 2004). En effet, l'activité des UGT semble liée à l'activité du CYP450.

Chez les poissons, plusieurs isoformes ont été identifiées. Chez la plie (*Pleuronectes platessa*), l'isoforme UGT1A6 catalyse la conjugaison des phénols (George et al., 1998). Chez le poisson zèbre (*Danio rerio*), au moins 14 isoformes ont été identifiées, parmi lesquelles six gènes ont été reliés aux familles 1A, 1B, et 2 (George et Taylor, 2002).

2.3.2. Conjugaison par les glutathion-S-transférases

Cette superfamille d'enzymes catalyse la conjugaison du glutathion avec certaines molécules électrophiles, en particulier les époxydes (Fjellstedt et al., 1973). Les arènes oxydes, ainsi que les diol-époxydes issus de la transformation par les HAP, sont donc des substrats préférentiels pour ces enzymes (Jernström et al., 1996). Chez les vertébrés supérieurs comme chez les poissons, elles sont classées en 7 familles cytosoliques et 2 familles membranaires, l'abondance relative de chaque famille étant dépendante de l'espèce considérée (Schlenk et al., 2008). Chez les poissons plats, l'isoforme prédominante est la famille « Rho » (Konishi et al., 2005). L'activité de base, ainsi que la capacité d'induction de la GST par les HAP étant considérées comme faibles, cette enzyme ne peut pas prendre en charge seule la production de la totalité des métabolites de HAP (Pushparajah et al., 2008,b).

2.3.3. Conjugaison par les Sulfotransférases

Les sulfotransférases (ST) sont des enzymes cytosoliques catalysant le transfert du groupe sulfonate provenant du 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate à un groupe hydroxyle ou amine. Dans le cas d'une contamination aux HAP, les phénols, dihydrodiols et hydroquinones sont les substrats des ST (Glatt, 2000). Chez l'homme, du fait d'un fort polymorphisme, des variations inter-individuelles importantes de l'activité des ST ont été observées (Tang et al., 2003). Au cours de la conjugaison, une charge négative est introduite sur le composé permettant d'augmenter son hydrosolubilité, ainsi que la possibilité de diffusion passive au travers des membranes cellulaires. Les conjugués sulfates peuvent alors être excrétés plus facilement par les voies biliaires et urinaires (Glatt, 2000). Dans certains cas, comme dans le cas des HAP méthylés, les réactions de sulfonation peuvent réactiver un métabolite hydroxylé (Schlenk et al., 2008). Les différentes formes de ST existantes au sein d'une même espèce ont chacune des substrats préférentiels (Glatt, 1997). Le 7,8-dihydrodiol-BaP semble être un substrat très faible des ST chez les mammifères. Bien que peu d'études soient disponibles concernant ces enzymes chez les poissons, une étude réalisée chez le poisson-chat a également démontré une faible affinité des ST pour le 7,8-dihydrodiol-BaP (Van den Hurk et James, 2000).

3. Génotoxicité des HAP

Les dommages à l'ADN peuvent se produire sur les quatre bases de l'ADN (Figure 6). Le plus souvent, ce sont les dommages à la guanine qui sont étudiés. En effet, les adduits à l'ADN provenant des HAP semblent se former majoritairement sur cette base. De plus, elle apparaît comme étant la base la plus sensible aux oxydations (Cadet et al., 1999).

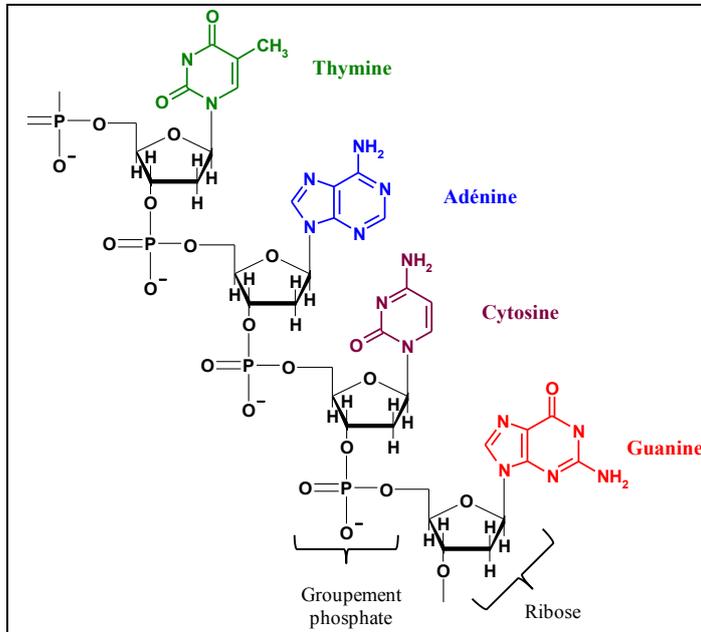


Figure 6 – Configuration d'un brin d'ADN.

Les différents types de dommages à l'ADN existants, leurs mécanismes de réparation et les conséquences possibles en cas de non-réparation sont illustrés sur la Figure 7, publiée par Hoeijmakers (2001).

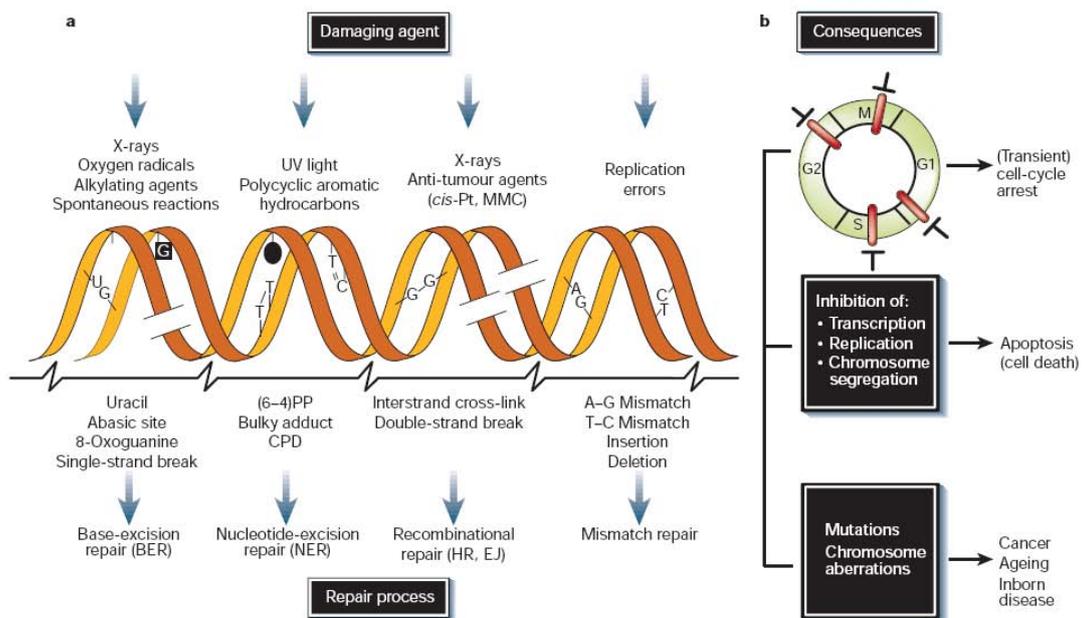


Figure 7 – Dommages à l'ADN engendrés par différents agents génotoxiques, conséquences biologiques et mécanismes de réparation chez l'homme (Hoeijmakers, 2001)

3.1. Adduits à l'ADN

Le terme d'adduit à l'ADN désigne le produit résultant de l'addition d'un xénobiotique sur un nucléotide. Dans le cas des HAP, les métabolites électrophiles très réactifs formés au cours de la biotransformation vont interagir par liaison covalente avec les centres nucléophiles des macromolécules cellulaires, telles que l'ADN, l'ARN, les lipides ou les protéines. Les bases azotées de l'ADN sont considérées comme des cibles privilégiées (Rether et al., 1997). Les désoxyribonucléosides puriques (dGuo et dAdo), étant plus réactifs que les désoxyribonucléosides pyrimidiques (dCyd et dThy), ont un potentiel de formation d'adduits plus important. Les sites nucléophiles de la dGuo sont situés en N2, N3, N7, et C8 tandis que la dAdo n'en possède que 2 situés en N6 et N7. Parmi les nucléosides pyrimidiques, seule la dCyd possède un site nucléophile, situé en N4, permettant la formation d'adduits. La localisation de la liaison sur le nucléoside considéré va déterminer la stabilité chimique de l'adduit formé. En effet, les adduits formés en position N2 du groupement exocyclique de la dGuo sont stables, tandis que les adduits formés en N7 ou C8 de la guanine sont instables et entraînent la formation d'un site abasique par la rupture de la liaison N-glycosidique (Marie, 2007). De même pour la dAdo, les adduits positionnés en N6 sont stables tandis que les adduits en N3 ou en N7 ne le sont pas. Du fait de la perte d'une base de l'ADN, ces adduits sont dits « adduits dépurinés ». La formation d'adduits à l'ADN est considérée comme la lésion majoritaire après exposition au BaP (Tarantini et al., 2009). Chez les poissons, la mesure du niveau d'adduits à l'ADN constitue un biomarqueur d'effets (Van der Oost et al., 2003). En effet, elle permet d'obtenir des informations sur le potentiel génotoxique de l'ensemble des contaminants chimiques présents (JAMP, 2009). De plus, les adduits étant les seules lésions de l'ADN spécifiques d'une molécule, la caractérisation structurale des adduits permet de renseigner quant à la génotoxicité de chacun des contaminants d'un mélange.

3.1.1. Adduits du BaP

Chez les mammifères comme chez les poissons, l'exposition au BaP mène principalement à la formation d'adduits à la désoxyguanosine (dGuo) (Rotchell et al., 2008). Chez les vertébrés supérieurs, il semble que les adduits dépurinés du BPDE à la dGuo sont nettement minoritaires (1%) par rapport aux adduits stables (Tarantini et al., 2009). En effet, l'adduit considéré comme étant formé majoritairement résulte de l'addition du BPDE en position N2 de la dGuo (Figure 8) (Boysen et Hecht, 2003). Un autre adduit stable résultant de l'addition du BPDE en position N6 de la dAdo a pu être caractérisé (Figure 8) (Marie, 2007). Bien que le BPDE soit considéré comme le carcinogène ultime du BaP, d'autres métabolites du BaP peuvent former des adduits. En effet, le potentiel de la 7,8-dione-BaP à former des adduits stables à l'ADN a récemment été démontré. Parmi ces adduits, certains ont pu être identifiés comme étant des adduits stables, liés à la Guanine, à l'Adénine, et à la Cytosine (Balu et al., 2004 ; Balu et al., 2006). Certains phénols, comme le 3-OH-BaP, peuvent générer des adduits aux protéines (Sugihara et James, 2003). Le radical cation du BaP, très réactif, est également capable de former des adduits à l'ADN sur tous les sites nucléophiles de la dGuo ainsi qu'en N7 de la dAdo (Marie, 2007). De plus, les radicaux semi-quinones produits à partir des quinones issues de cette voie de biotransformation, ont été démontrés comme pouvant

s'ajouter à l'ADN, ainsi qu'aux protéines (Shimada, 2006). Les adduits stables semblent donc provenir majoritairement de la voie des diol-époxydes, tandis que les dépurinés semblent être engendrés par celle du radical cation (Tarantini et al., 2009 ; Chen et al., 1996).

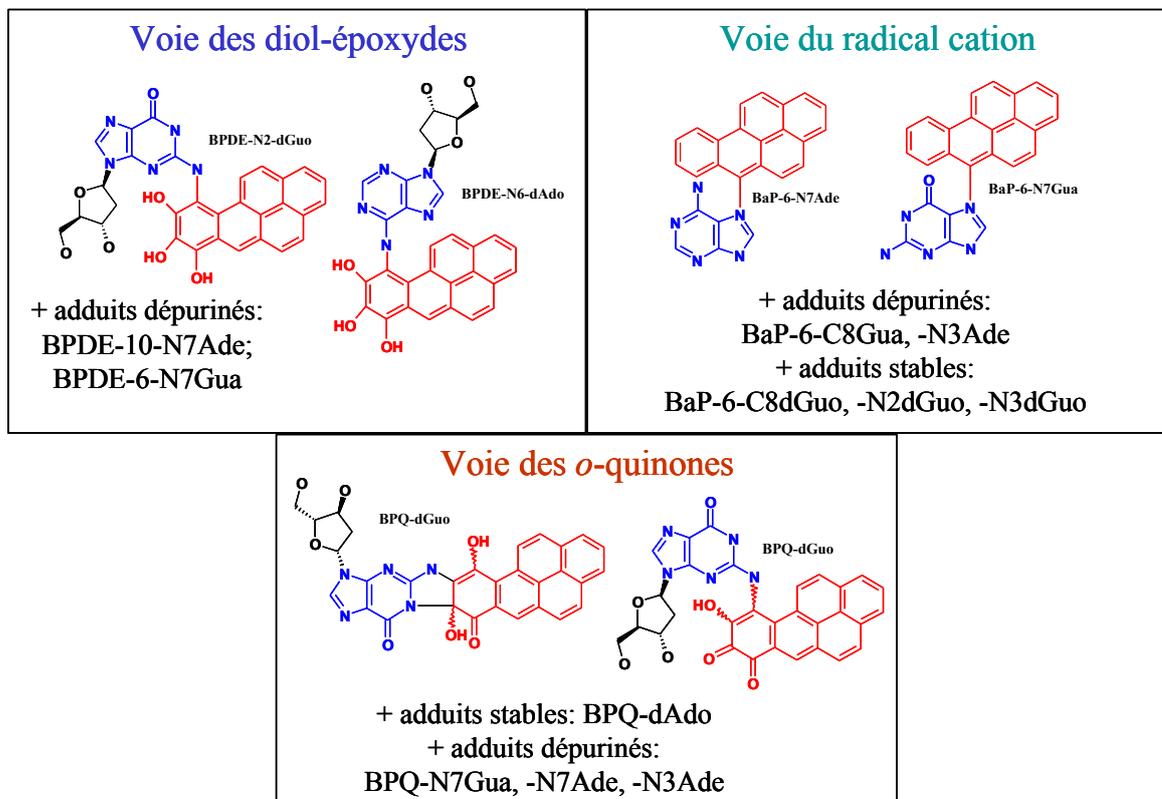


Figure 8 – Principaux adduits du BaP (d'après Marie, 2007 ; Balu et al., 2004)

3.1.2. Adduits du Fluo

La formation d'adduits du Fluo est quant à elle plus controversée. En effet, peu d'études concernent les effets génotoxiques du Fluo, en particulier chez les poissons. Chez *Fundulus heteroclitus*, aucun adduit n'a été détecté 4 jours après une injection intrapéritonéale de 5 ou 50 mg/kg de Fluo (Willett et al., 2001). Chez les vertébrés supérieurs, certaines études ont permis de mettre en évidence la formation d'adduits à l'ADN *in vitro*. En effet, l'exposition d'ADN de thymus de veau en présence de protéines microsomales de rat ayant été pré-traités *in vivo* à l'Aroclor, mène à la formation de deux adduits à l'ADN. Ces deux adduits proviennent de l'addition de métabolites en N2 de la guanine (Babson et al., 1986b). Du fait de la production majoritaire du 2,3-dihydrodiol-Fluo, les auteurs ont supposé que l'adduit majoritairement formé dérivait de l'*anti*-Fluo-2,3-diol-1,10b-époxyde, considéré comme étant un métabolite directement mutagène, pouvant réagir avec l'azote exocyclique de la dGuo. L'adduit en résultant a été proposé comme étant le 10b-(désoxyguanosine-N2-yl)-1,2,3-trihydroxy-1,2,3,10b-tétrahydroFluo. Le second adduit détecté est supposé être un stéréoisomère de l'adduit majoritaire. La formation de deux adduits à l'ADN a ensuite été confirmée lors d'expositions similaires à des concentrations de 70-100 μM de Fluo (Gorelick et Wogan, 1989). L'adduit majoritairement formé a été identifié ici comme résultant de l'addition de l'*anti*-2,3-dihydroxy-1,10b-époxy-1,2,3-trihydroFluo (*anti*-FADE) en position

N2 de la dGuo, et le second adduit comme son *syn*-isomère. L'organe cible principal de la formation d'adduits à l'ADN du Fluo semble être le poumon, bien que l'adduit majoritaire ait également été détecté dans le foie, le rein, le cœur et l'intestin (Gorelick et al., 1989). La formation majoritaire de l'adduit dérivant de l'addition de l'anti-FADE sur la dGuo a été confirmée plus tard chez le rat comme chez la souris (Figure 9) (Wang et al., 1995 ; Walker et al., 2007).

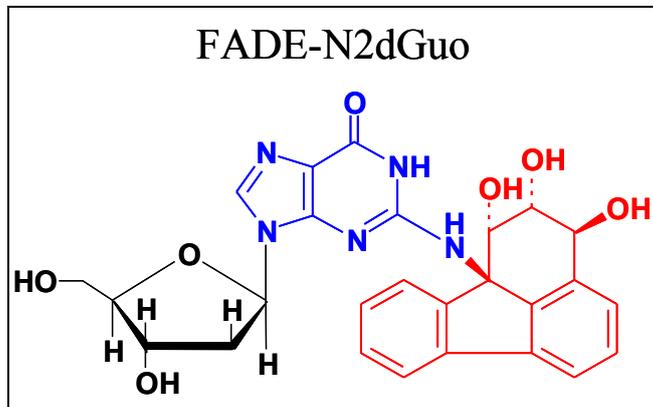


Figure 9 – Adduit majoritaire du Fluo chez les vertébrés supérieurs

3.1.3. Signification biologique

La formation d'adduits à l'ADN entraîne une modification de la configuration spatiale de l'ADN. Ces modifications peuvent alors perturber le processus de réplication, et entraîner des mutations. Lors d'expositions *in vivo* ou *in situ* chez les poissons, les adduits à l'ADN sont majoritairement formés dans le foie, organe contenant la majorité des enzymes impliquées dans la biotransformation des HAP (Van der Oost et al., 2003). Il a été démontré que la sole anglaise (*Parophrys vetulus*) avait la capacité de métaboliser le BaP en adduits à l'ADN à un niveau équivalent à celui observé chez les mammifères (Varanasi et al., 1981). Lors d'études en milieu naturel, la présence d'adduits à l'ADN dans le foie de plusieurs espèces de poissons a été mise en relation avec le niveau de contamination en HAP (Aas et al., 2001). La mesure des adduits formés est donc couramment utilisée comme biomarqueur d'effet de la contamination. Très peu d'études portent sur les effets du Fluo chez les poissons.

3.2. Dommages oxydatifs à l'ADN

3.2.1. Espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites à partir de la réduction partielle de l'oxygène présent dans les cellules. Les ERO sont naturellement présentes dans l'organisme à des concentrations pouvant être prises en charge par les défenses anti-oxydantes. Elles sont notamment produites lors des voies métaboliques aérobie, telles que la phagocytose, la respiration cellulaire, la phosphorylation oxydative, ou lors de la synthèse et la dégradation de biomolécules (Azqueta et al., 2009). Elles peuvent également être produites au cours des réactions de phase I de la biotransformation des HAP. Ce sont des molécules instables, et par conséquent très réactives, ce qui leur confère un potentiel toxique important. Bien que la

présence d'ERO n'induit pas nécessairement de toxicité, de nombreux polluants dont les HAP induisent leur production en quantités trop importantes pour être prises en charge par les défenses anti-oxydantes, générant ainsi un stress oxydatif. Il existe plusieurs ERO (Gardès-Albert et al., 2003) dont les principales sont décrites ci-dessous, leurs interactions étant illustrées dans la Figure 10.

- L'oxygène singulet, $^1\text{O}_2$: il s'agit d'une forme excitée de l'oxygène moléculaire O_2 . Sa formation est sensible à différents rayonnements. A cours de la bioactivation des HAP, il joue un rôle majeur dans le stress oxydatif induit par le BPDE en présence de rayonnements UV (Gao et al., 2005).
- L'anion superoxyde, $\text{O}_2^{\bullet-}$: résultant de la capture d'un électron par la molécule d' O_2 , il est formé lors de nombreux processus physiologiques et réactions enzymatiques, essentiellement au niveau des membranes cellulaires. Il peut être produit lors du métabolisme des quinones (1,6 et 3,6-dione-BaP) (Burdick et al., 2003). De plus, il est impliqué dans la formation des *o*-quinones à partir des dihydrodiols et est régénéré en fin de production, permettant ainsi de reproduire un cycle (Penning et al., 1996).
- Le peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 : il est obtenu lors de la réduction de l'anion superoxyde. Ne possédant pas de charge, il est faiblement réactif mais son potentiel de diffusion est très important. Au cours de la biotransformation des HAP, il est notamment produit lors de la formation des quinones et *o*-quinones (Burdick et al., 2003 ; Penning et al., 1996).
- Le radical hydroxyle, OH^\bullet : il peut être formé à partir du $\text{O}_2^{\bullet-}$ et du H_2O_2 par la réaction d'Haber Weiss (Figure 11, (1)), ou à partir du H_2O_2 en présence de métaux catalyseurs comme le fer par la réaction de Fenton (Figure 11, (2)). Il est très réactif et est considéré comme responsable de nombreux dommages à l'ADN (Cadet et al., 1999).
- Les radicaux organiques, R^\bullet : Ils sont formés à partir d'un xénobiotique et en présence du radical hydroxyle.
- Les hydroperoxydes organiques, ROOH : ils sont des produits de la peroxydation lipidique initiée par le radical hydroxyle en présence d'acides gras insaturés. La peroxydation lipidique est à la fois une cause et une des conséquences majeures du stress oxydant pour les cellules (Cadet et al., 1997). L'étape d'initiation de cette réaction mène à la production du radical lipidique (R^\bullet) par l'action du radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) sur un acide gras insaturé. En présence d'oxygène moléculaire, le radical lipidique va être transformé en radical lipidique peroxyde (ROO^\bullet). Enfin, au cours de la phase terminale, le radical peroxyde lipidique mis en présence d'un lipide non oxydé forme un lipide peroxyde (ROOH), ainsi qu'un nouveau radical lipidique. Ce dernier pouvant être de nouveau oxydé, on parle alors de propagation. Les composés réactifs produits au cours de la peroxydation lipidique peuvent diffuser à travers les membranes, atteindre et endommager l'ADN. Les radicaux peroxydes sont considérés comme étant mutagènes et carcinogènes (Niki, 2009).

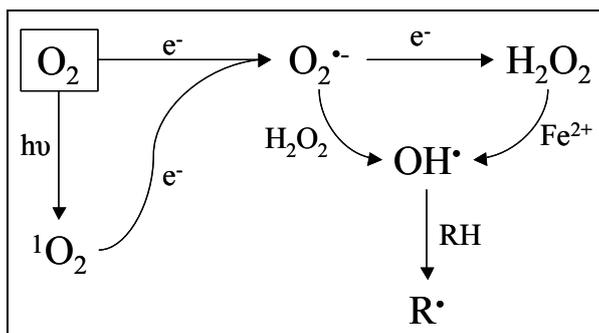


Figure 10 – Réactions entre les principales espèces réactives de l'oxygène

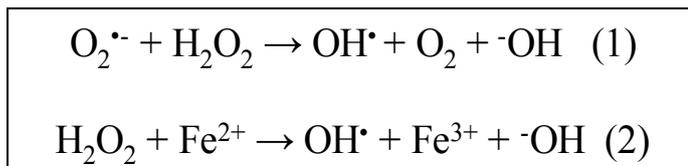


Figure 11 – Réactions d'Haber Weiss et de Fenton

3.2.2. Oxydation des bases de l'ADN

L'oxydation des bases de l'ADN peut entraîner des mutations (Marnett, 2000). Le radical hydroxyle OH^{\bullet} est l'ERO la plus impliquée dans les mécanismes d'oxydation des bases de l'ADN (Bjelland et Seeberg, 2003 ; Cadet et al., 1999). La plupart du temps, la formation de radicaux en C3, C4 et C5 des bases de l'ADN mène à des cassures de brins de l'ADN.

3.2.2.1. Oxydation des bases puriques de l'ADN (Guanine et Adénine)

La guanine est la base la plus sensible aux oxydations par le radical hydroxyle, l'oxygène singulet, le peroxydant et les oxydants à 1 e^- (Cadet et al., 1999). Son attaque semble favorisée lorsqu'elle est placée en 5' d'une autre purine, et particulièrement s'il s'agit d'une autre guanine. L'attaque de l'ADN en position C8 par le OH^{\bullet} ou l'hydratation du radical cation de la guanine entraînent la formation du radical 8-hydroxy-7,8-dihydroguanyl (radical 8-yl), qui peut ensuite subir deux réactions compétitives dont l'importance relative dépend des caractéristiques réductrices et de la concentration en oxygène moléculaire dans la solution. L'oxydation du radical 8-yl mène à la formation de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxodGuo), tandis que la réduction à 1 e^- entraîne la formation du 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGuo) (Figure 12) (Burrows et Muller, 1998 ; Cadet et al., 2003). L'attaque de la guanine par le radical hydroxyle peut également se faire en position C4 ou C5. Ces deux oxydations sont souvent réversibles, et en gagnant un électron, la base oxydée revient à un état non oxydé (Burrows et Muller, 1998).

L'oxygène singulet est connu pour réagir exclusivement avec la guanine, générant la 8-oxodGuo par des mécanismes n'impliquant pas de radicaux (Cadet et al., 2003). En effet, la principale réaction de l'oxygène singulet avec la guanine semble être une cycloaddition de type Diels-Alder sur la liaison 4,8 de l'imidazole de la base. Cette addition génère des diastéréoisomères 4,8-endopéroxydes instables, qui vont être réarrangés en 8-hydroperoxy-2'-

désoxyguanosine. Ces derniers semblent ensuite être réduits pour former la 8-oxodGuo (Figure 12). L'oxygène singulet n'induit pas de formation de FapyGua (Cadet et al., 2003).

De la même façon, l'adénosine peut être attaquée par le radical hydroxyle en C8 et en C4. Bien que l'oxydation en C4 soit majoritaire, elle est facilement réversible, tandis que l'oxydation en C8 génère la formation de la 8-oxodAdo, ainsi que la FapyAde (Burrows et Muller, 1998). La formation de la 8-oxodAdo et de la FapyAde est cependant minoritaire par rapport à la formation de la 8-oxodGuo et de la FapyGua.

Les radicaux alkyl peroxy ROO^\bullet semblent également être impliqués dans la formation de la 8-oxodGuo par addition à la guanine en C8. L'anion superoxyde, très instable, est quant à lui rapidement transformé en H_2O_2 et O_2 .

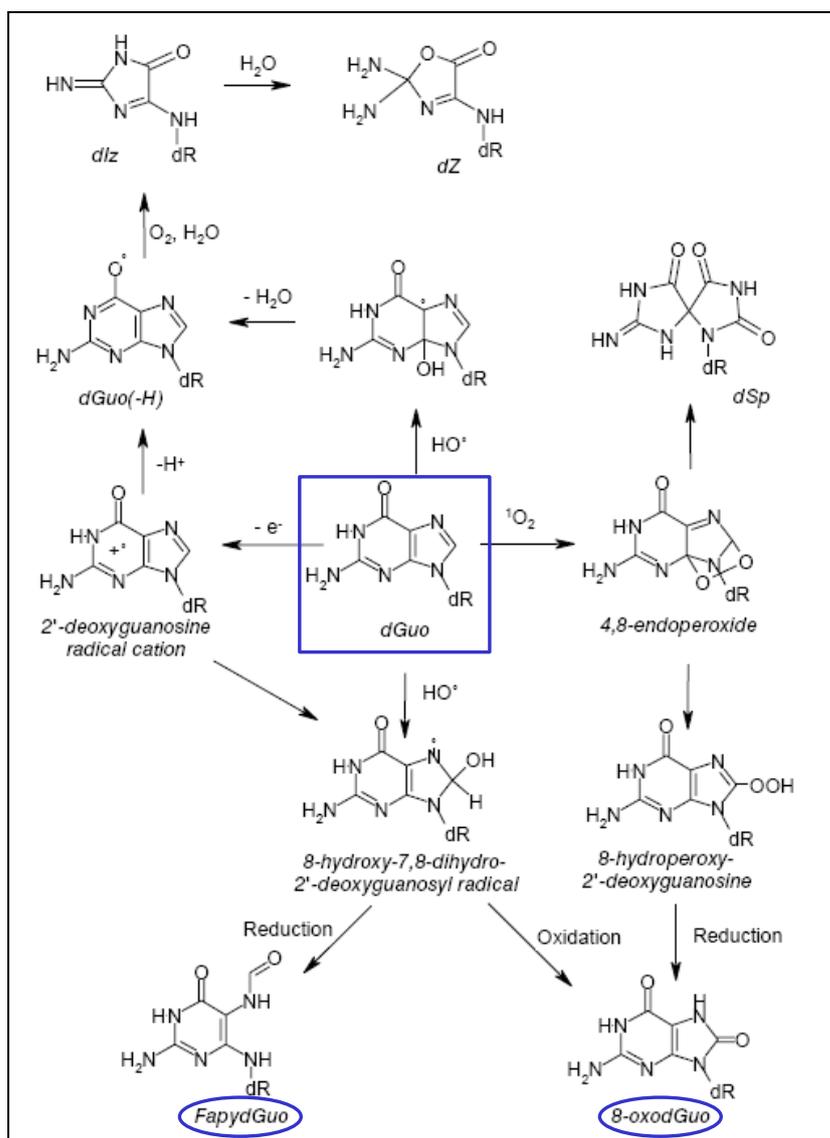


Figure 12 – Oxydation de la guanine par le radical hydroxyle (Cadet et al., 2003)

3.2.2.2. Oxydation des bases pyrimidiques de l'ADN (Thymine et Cytosine)

Les radicaux cations des bases pyrimidiques sont les intermédiaires réactifs initiaux des oxydations de la thymine, la cytosine et la 5-méthyl-cytosine. L'attaque de la thymine par le radical hydroxyle (Figure 13) se fait principalement en C5 (60%), entraînant la formation d'un radical réduit centré en C6. Le carbone C6 est quant à lui moins favorable aux réactions avec le radical hydroxyle (35%), et mène à la formation d'un radical oxydé centré en C5. Une 3^{ème} réaction se fait en proportions nettement moindres (5%) par l'arrachement d'un atome d'hydrogène au groupement méthyle, générant un radical exocyclique (Cadet et al., 1999). Les radicaux produits au cours de ces trois réactions sont ensuite convertis en radicaux peroxydes correspondants (Figure 13, 5-7), par réaction avec l'oxygène moléculaire. Ces radicaux peroxydes sont ensuite pour la moitié d'entre eux réduits en hydro-péroxydes instables (Figure 13, 8-10). Ces peroxydes vont être convertis en différents composés plus stables dont certains ont pu être identifiés (Figure 13, 11-16) (Cadet et al., 1997).

L'oxydation de la cytosine par le radical hydroxyle se fait également principalement en C5 (87%) et en C6 (10%), et génère une cascade de produits dont l'importance relative varie selon les conditions d'oxydo-réduction du milieu. Ces différentes cascades réactionnelles peuvent entraîner la désamination du groupe amine N4 par hydrolyse. Les principaux produits de l'oxydation de la cytosine sont donc des dérivés de l'uracile. Parmi eux, le composé majoritaire est le 5,6-dihydroxy-5,6-dihydro-uracile. L'oxydation de la double-liaison 5,6 de la cytosine rend la liaison glycosidique plus labile et favorise la formation de sites abasiques (Burrows et Muller, 1998).

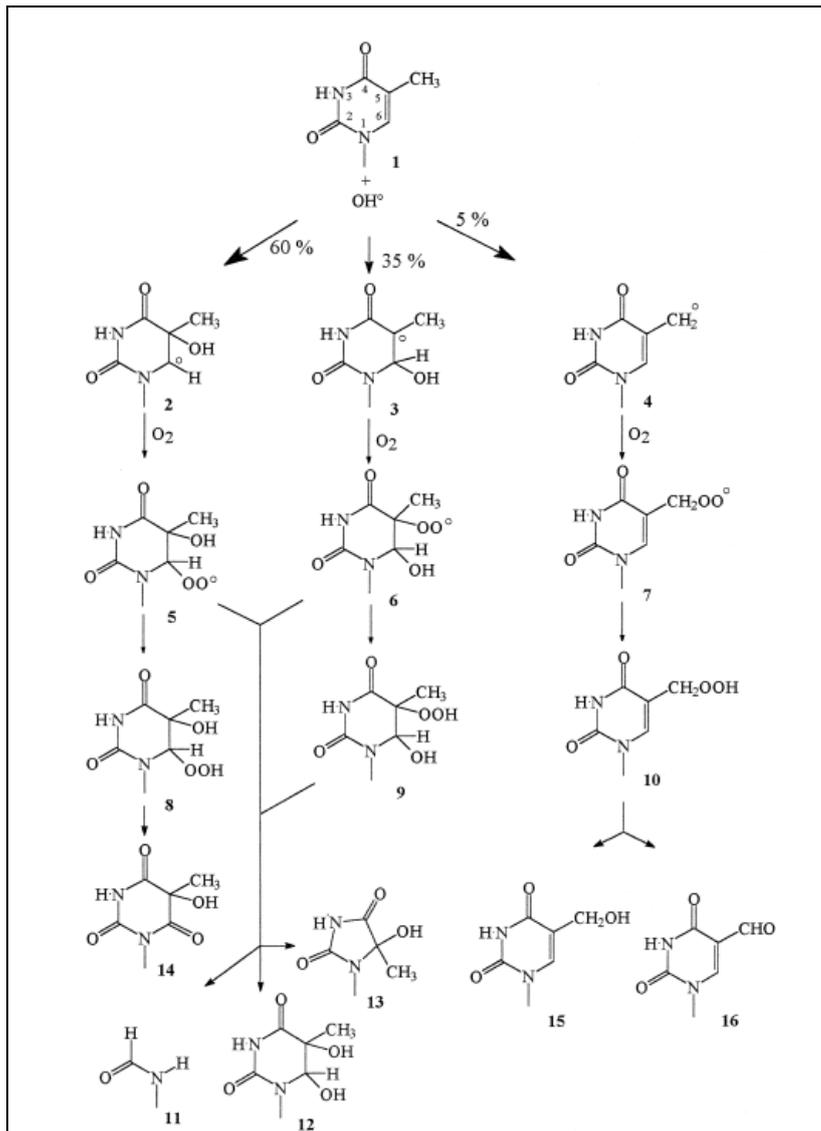


Figure 13 – Principales réactions d'oxydation de la thymine par le radical hydroxyle (Cadet et al., 1997)

3.2.3. Défenses anti-oxydantes

Les ERO étant naturellement formées au cours de processus physiologiques, il existe des défenses anti-oxydantes les prenant en charge. Ces défenses sont de type enzymatique comme la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT), ou de type non enzymatique comme les vitamines A et C ou le glutathion (Di Giulio et Meyer, 2008).

La SOD a pour fonction d'accélérer la dismutation de l'anion superoxyde par l'acceptation d'un électron provenant d'une molécule d'anion superoxyde, qui va être attribué à une seconde molécule d'anion superoxyde. Les produits résultants de cette réaction sont le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène (Figure 14, (1)).

La catalase et les peroxydases prennent en charge les peroxydes, notamment le peroxyde d'hydrogène. L'activité de la catalase est spécifiquement inféodée à la transformation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau (Figure 14, (2)). Elle est principalement située dans le peroxydosome. Elle prévient donc des dommages oxydatifs au sein du peroxydosome, mais

de par son action envers le peroxyde d'hydrogène, elle empêche sa propagation dans le reste de la cellule. La Glutathion Peroxydase (GPX) catalyse la réduction d'un peroxyde en son alcool correspondant (Figure 14, (3)). Cette réaction est couplée avec l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en sa forme disulfide (GSSG). Certaines Glutathion Transférases (GST) possèdent une activité de peroxydase uniquement envers les lipides peroxydés (Figure 14, (4)). De plus, le glutathion et les vitamines A, C, et E peuvent piéger de façon non-enzymatique certaines ERO.

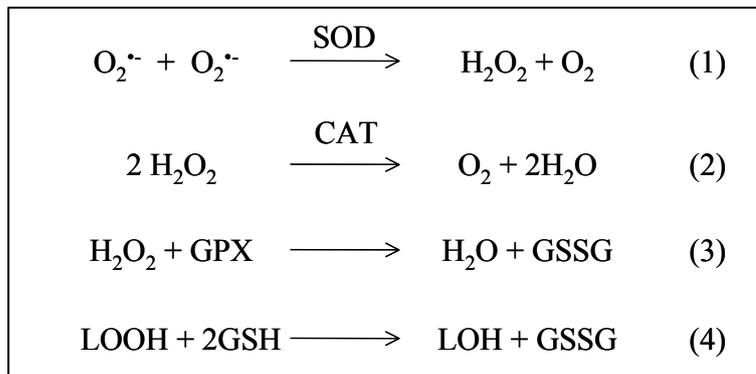


Figure 14 – Réactions catalysées par les enzymes anti-oxydantes.

Lorsque la production d'ERO est trop importante pour être prise en charge par ces défenses, elle peut entraîner de nombreux dommages aux macromolécules cellulaires telles que les lipides ou les acides nucléiques, dont l'ADN. L'attaque de l'ADN par des ERO peut conduire à une oxydation des bases de l'ADN et à une fragmentation du matériel génétique (cassures simple et double-brins). Ces lésions à l'ADN peuvent être responsables de mutations, constituant ainsi un facteur de risque dans l'initiation et le développement de cancers (Gardès-Albert et al., 2003).

3.2.4. Cassures de brins de l'ADN

Les cassures de brins de l'ADN peuvent être engendrées lors des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN (adduits ou stress oxydant), ou directement au cours du stress oxydant via l'attaque de l'ADN par les oxyradicaux (Tarantini et al., 2009). De manière générale, le clivage des brins d'ADN se fait premièrement sur le nucléoside, puis la base subit une série de réactions chimiques. Une première étape de déglycosilation catalysée par des enzymes se fait par hydrolyse acide et génère la formation d'un site abasique. Les groupements phosphates sont ensuite éliminés du site abasique (Burrows and Muller, 1998). Le groupement phosphate 3' est éliminé en premier (β -élimination), suivi par le 5' (δ -élimination). Les purines étant plus basiques que les pyrimidines, elles sont plus sensibles à l'hydrolyse de la liaison glycosidique en conditions acides.

Les radicaux intermédiaires formés au cours de l'oxydation des pyrimidines peuvent entraîner des cassures de brins directement par l'arrachement d'un atome d'hydrogène du ribosyl adjacent (Burrows et Muller, 1998).

3.2.5. Signification biologique des dommages oxydatifs à l'ADN

La présence de bases oxydées de l'ADN est considérée comme mutagène (Azqueta et al., 2009). En effet, si la formation de 8-oxodGuo n'est pas réparée avant la réplication de l'ADN, cela peut entraîner un mésappariement de l'adénine avec la 8-oxodGuo, générant des inversions $G \rightarrow T$ et $A \rightarrow C$. De plus, les lésions à la thymine peuvent également entraîner occasionnellement des inversions $A:T \rightarrow G:C$. La thymine oxydée a la capacité d'interrompre la réplication et la transcription de l'ADN, tandis que la 8-oxodGuo entraîne des mutations lors de la transcription (Larsen et al., 2004). Ces effets sur la transcription, la traduction et la réplication peuvent engendrer l'apoptose. De plus, ce type de lésion peut jouer un rôle important dans la cancérogénèse (Cooke et al., 2003). La présence de dommages oxydatifs à l'ADN a également été démontrée comme ayant un rôle important chez les rongeurs dans les mécanismes de tératogénicité (Wells et al., 1997).

Les cassures de brins de l'ADN dues notamment aux ERO peuvent engendrer des instabilités génomiques telles que les remaniements chromosomiques. Les cassures double-brins de l'ADN sont létales et entraînent un arrêt du cycle cellulaire. Si leur réparation n'est pas complète, cela peut mener notamment à l'apparition de cancers. De plus, lors de la réparation des cassures de brins de l'ADN, des mutations peuvent apparaître.

3.3. Mécanismes de réparation de l'ADN

3.3.1. Réparation par excision de bases (BER)

Chez les mammifères comme chez les bactéries, c'est le mécanisme de réparation prédominant des bases oxydées de l'ADN, des cassures simple-brins et des petites altérations chimiques de l'ADN en général (Figure 15) (Bjelland et Seeberg, 2003 ; Hoeijmakers, 2001). L'initiation de ce type de réparation se fait par des ADN glycosylases, capables d'éliminer une base modifiée de l'ADN (Figure 15). La 8-oxodGuo glycosylase 1 (OGG1) est considérée comme étant la glycosylase la plus impliquée dans l'initiation de la réparation de la 8-oxodGuo chez les mammifères. Chez *E. Coli*, une autre enzyme, l'ADN-formamidopyrimidine glycosylase (Fpg), homologue de l'OGG1, initie également ce type de réparation (Larsen et al., 2004). Chez les mammifères, l'OGG1 reconnaît et libère la 8-oxodGuo provenant du mésappariement 8-oxodGuo :C, générant un site apurinique (site AP), pouvant être incisé par des endonucléases (APE). Dans le cas d'une cassure simple-brin de l'ADN, la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) et la polynucléotide kinase (PNK) initient la réparation (Hoeijmakers, 2001). L'action de lyases ôte ensuite le sucre dont la base est manquante (Russo et al., 2007). L'action successive d'ADN polymérases et d'ADN ligases permet enfin de remplacer la base manquante et de restaurer la double hélice (Boiteux et Guillet, 2004 ; Azqueta et al., 2009). Lorsque la réparation ne peut avoir lieu, la production d'un mésappariement 8-oxodGuo :A peut être réparée par l'action d'une adénine glycosylase, catalysant l'excision de l'adénine. Le site abasique ainsi généré peut être remplacé par une paire de bases 8-oxodGuo :C par l'action du système BER. L'OGG1 peut alors prendre le relais afin de réparer la 8-oxodGuo. (Russo et al., 2007).

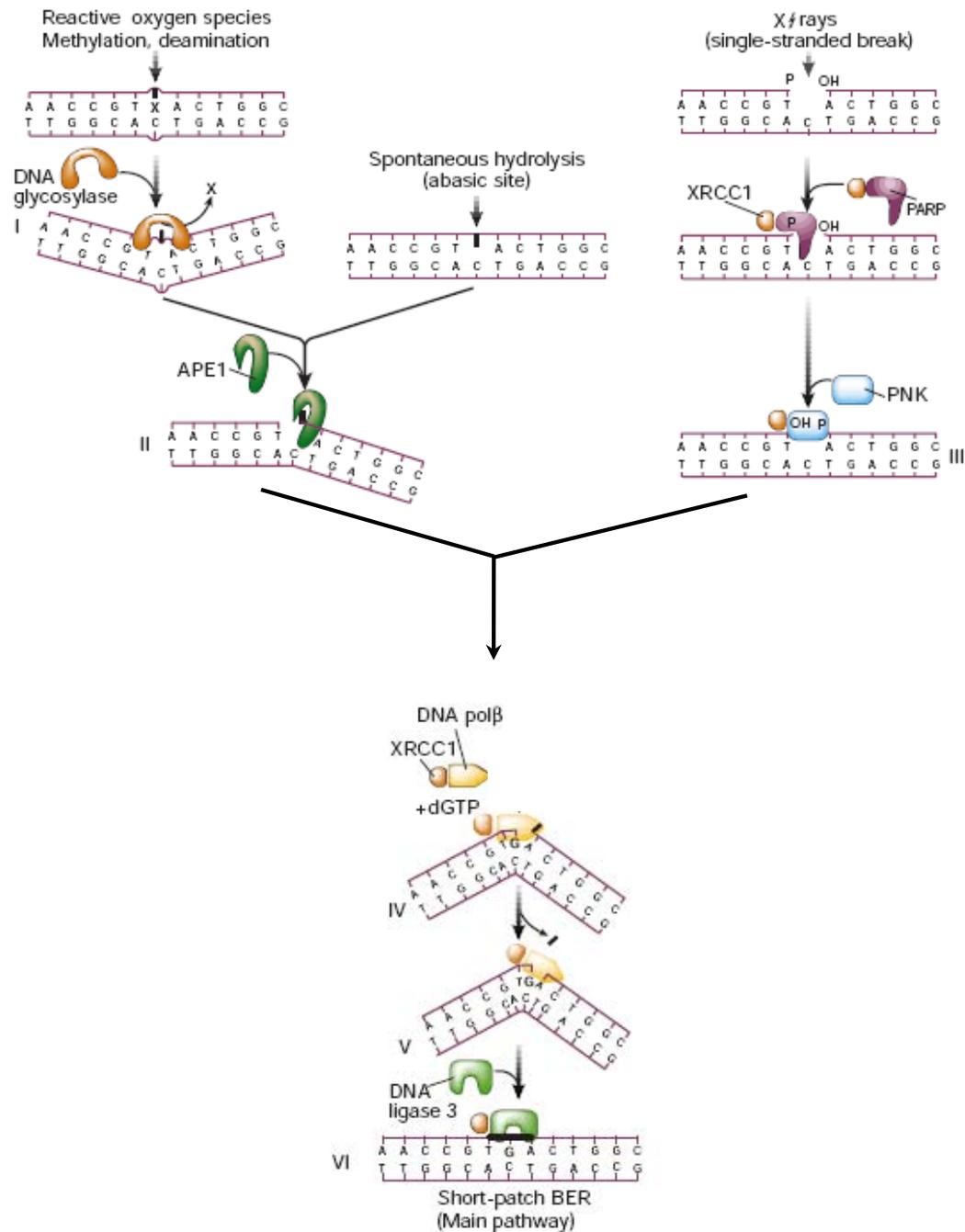


Figure 15 – Mécanisme de réparation par excision de bases (BER) (Hoeijmakers, 2001) (APE1 : Endonucléase ; PARP : Poly(ADP-ribose)polymérase ; PNK : Polynucléotide kinase ; XRCC1 : protéine scaffold)

3.3.2. Réparation par excision de nucléotides (NER)

Ce mécanisme est impliqué lors de dommages importants, comme les adduits à l'ADN (Figure 16) (Azqueta et al., 2009 ; Hansen et Kelley, 2000). Les dommages à l'ADN sont ici reconnus de manière physique de par la déformation de la structure de l'ADN. La reconnaissance peut se faire suivant deux voies. La première se fait par la réparation couplée à la transcription (RCT), qui permet la réparation prioritaire des gènes transcrits, est donc

importante pour la viabilité cellulaire. Au cours de cette voie, un complexe protéique permet de bloquer l'ARN polymérase au niveau du site lésé et de recruter le complexe protéique d'incision du système NER. La seconde voie, appelée Réparation Globale du Génome (RGG) permet la réparation de toutes les zones de l'ADN, codantes ou non, permettant ainsi aux cellules en division ou en différenciation de transmettre un ADN intact à leur descendance. La reconnaissance se fait également par un complexe protéique différent du complexe de la RCT, permettant le recrutement du complexe protéique d'incision du système NER (Millau, 2006). La réparation est alors initiée par l'interaction du complexe protéique formé par la protéine XPA et la protéine de réplication A (RPA), avec des facteurs de transcription ayant une activité d'hélicase. Ce complexe ouvre le brin endommagé sur une zone d'environ 30 paires de bases autour de la lésion (Hansen and Kelley, 2000). Le brin non endommagé est alors stabilisé par la liaison à la RPA. L'action d'exonucléases et d'endonucléases permet ensuite la scission du brin endommagé, générant un oligonucléotide de 24 à 32 bases, contenant la lésion à éliminer. La partie du brin endommagé ayant été éliminée, est ensuite remplacée par les mécanismes classiques de la réplication, impliquant des polymérases pour la re-synthèse, et des ligases pour la ligature, puis le complexe de protéines ayant participé à la réparation est dissocié (Hoeijmakers, 2001).

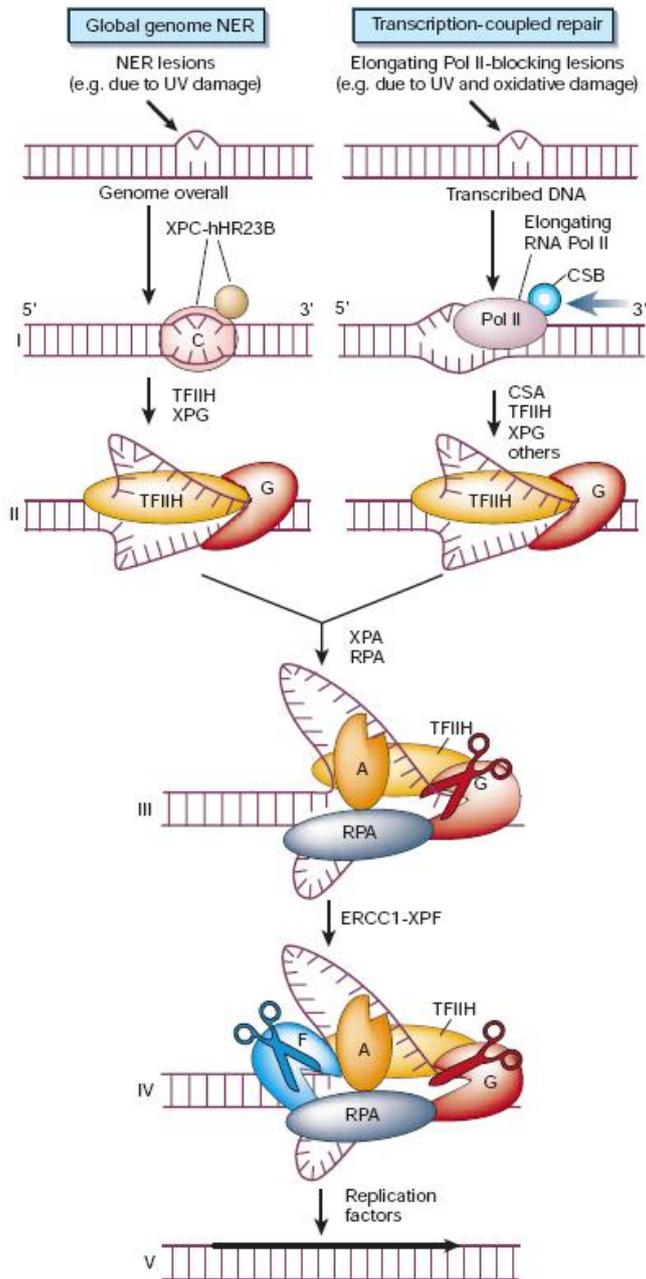


Figure 16 – Système de réparation par excision de nucléotides (Hoeijmakers, 2001). (CSA et CSB : facteurs spécifiques de la réparation par RCT ; XPA et XPC : hélicases ; TFIID : facteur de transcription ; RPA : Protéine de réplication A ; XPG et ERCC1/XPF : endonucléases).

3.3.3. Réparation des mésappariements (MMR)

La réparation des mésappariements se fait lors de la réplication (Russo et al., 2007). Elle est initiée par la reconnaissance du mésappariement par le dimère dit MutS, suivie de l'ouverture de la double hélice par des hélicases. Le brin portant la base mal appariée subit alors une cassure catalysée par des exonucléases et des endonucléases. L'action de l'ADN polymérase I permet ensuite de re-synthétiser le brin endommagé (Hoeijmakers, 2001 ; Russo et al., 2007).

3.3.4. Autres mécanismes de réparation

Les systèmes de réparation BER et NER ne prenant en charge que les lésions ayant lieu sur un seul brin d'ADN, d'autres mécanismes de réparation gèrent les cassures double-brins, notamment les recombinaisons homologues et non homologues, dont les périodes d'action varient en fonction du cycle cellulaire (Hoeijmakers, 2001). L'initiation de ces mécanismes se fait par des protéines kinases permettant notamment la phosphorylation d'histones dans une zone située en aval de la cassure.

La réparation par recombinaison non homologue permet de rejoindre deux extrémités d'ADN même si elles ont peu d'homologie entre elles. Dans un premier temps, les extrémités d'ADN sont liées par l'action d'un dimère Ku80/Ku70. La protéine DNA-PK est alors recrutée et activée afin de permettre l'action des protéines responsables de la préparation des extrémités d'ADN, de l'ajout ou de la suppression de nucléotides, et du maintien de l'organisation spatiale des brins d'ADN (Millau, 2006).

La réparation par recombinaison homologue permet de recombiner deux brins complémentaires et semble restreinte aux phases S et G2 du cycle cellulaire.

De plus, lorsqu'un dommage bloquant l'activité des polymérases n'a pas pu être réparé, il peut alors être pris en charge par des polymérases translésionnelles, capables de polymériser des nucléotides même si le brin matrice comporte un dommage.

Enfin, les dommages à l'ADN dus à la présence d'agents alkylants, peuvent être réparés par l'action d'alkyltransférases.

4. Sole commune, *Solea solea* : espèce modèle

4.1. Généralités

La sole commune *Solea solea* (Linnaeus, 1758) est un poisson plat téléostéen appartenant à l'ordre des pleuronectiformes et à la famille des Soleidae (Figure 17). La sole peut avoir une longévité d'une quarantaine d'années, et atteindre une taille de 70 cm. Comme pour tous les poissons, sa croissance est continue tout au long de sa vie. La taille minimale de pêche est fixée à 24 cm, ce qui correspond à un âge d'environ 2 ans, soit l'âge approximatif de la première maturité sexuelle. Vivant sur le fond, elle se nourrit principalement de vers, crustacés ou petits coquillages qu'elle chasse la nuit.



Figure 17 – Sole commune *Solea solea*

4.2. Répartition géographique

La sole est présente sur une zone allant des côtes nord-africaines jusqu'à la Mer d'Irlande et la Mer du Nord (CIEM), des franges côtières jusqu'à une profondeur d'environ 150 m. La sole est un poisson benthique, ayant pour préférence les fonds composés de sables fins, sables vaseux, ou vases. Elle supporte des variations de salinité importantes. On la rencontre donc toute l'année dans les estuaires. Les juvéniles sont particulièrement localisés dans les baies et les zones estuariennes (Le Pape et al., 2003 ; Rochette et al., 2009), comme présenté sur les Figure 18 et Figure 19.

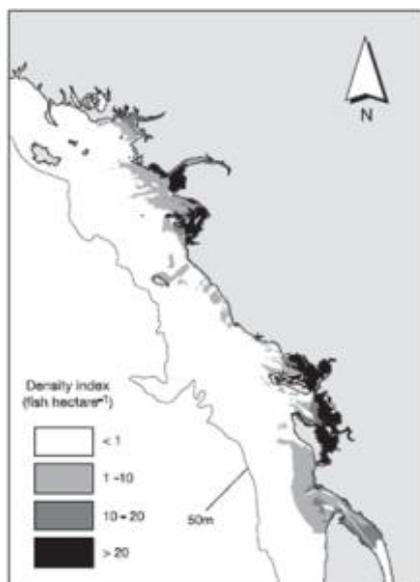


Figure 18 – Densité de sole G0 (nées dans l'année) dans le golfe de Gascogne (Le Pape et al., 2003)

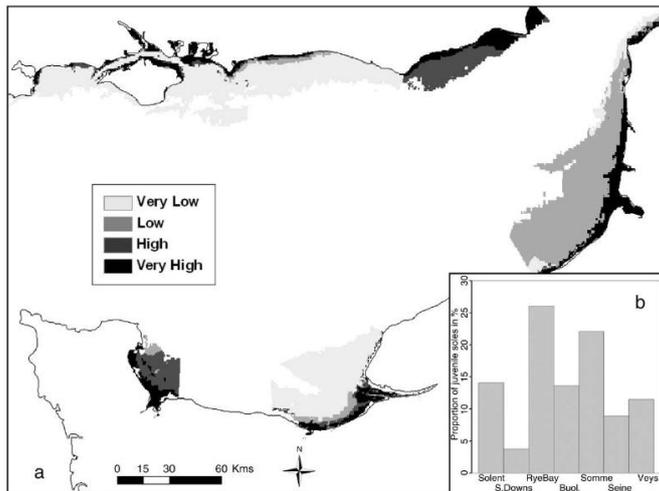


Figure 19 – Densité de soles G0 (nées dans l'année) le long de la Manche (Rochette et al., 2009).

4.3. Cycle de vie

La première maturité sexuelle est atteinte vers l'âge de 2-3 ans. Les périodes de pontes dépendent de la température de l'eau. Ainsi, elles s'effectuent principalement de janvier à mars dans le golfe de Gascogne, tandis qu'elles ont lieu plutôt vers le printemps en Mer du Nord. Les frayères se situent sur des fonds de 30 à 100 m de profondeur, au large des estuaires. Les femelles pondent entre 700 et 800 œufs par gramme de poisson, d'un diamètre de 1.0-1.6 mm. Les œufs subissent alors une phase pélagique, à une température d'environ 10°C. Après 7-8 jours, les larves de 2.5 à 4 mm éclosent, et se diffusent dans la colonne d'eau pendant une période d'environ 3 semaines, avant de se poser sur le fond après métamorphose. Elles atteignent alors une taille de 7-10 mm. Les juvéniles rejoignent ensuite les zones de nourriceries situées dans les estuaires et les baies, qu'ils quittent à l'âge adulte pour rejoindre les frayères. Après la ponte, les adultes tendent à se rapprocher des côtes pendant les périodes printanières et estivales, qu'ils quittent pour des eaux plus profondes en hiver.

4.4. Physiologie

Le système circulatoire des poissons est proche de celui des vertébrés supérieurs. En effet, le sang pompé par le cœur, est envoyé vers les branchies, où il est aéré, pour être redistribué au corps et aux divers organes. Les érythrocytes (ou globules rouges) transportent l'oxygène dans le sang, et sont caractérisés chez les poissons par une taille plus importante que chez les vertébrés supérieurs et par la présence d'un noyau. Lors de l'alimentation, les éléments nutritifs sont absorbés au travers des intestins, et transportés ensuite vers le foie, avant d'être diffusés par le sang à travers tout le corps. Le sang est ensuite purifié par le système rénal, et les déchets sont rejetés par l'urine.

Le rein, et plus particulièrement le rein antérieur, joue également un rôle important dans le système immunitaire, puisqu'il abrite les cellules immunitaires de différents types. La rate, zone de production des érythrocytes, et le thymus, où sont produits des lymphocytes, sont également impliqués dans la réponse immunitaire (Chilmonczyk, 1992 ; Hansen et Zapata, 1998).

Le système digestif chez la sole est également proche du système des vertébrés supérieurs. Une fois ingérés, les aliments sont digérés dans l'estomac par des enzymes stomacales, mais également par l'apport d'enzymes sécrétées par le foie et le pancréas. Le foie, qui est l'organe comportant le plus de lipides, est la cible principale des contaminants hydrophobes. Il joue un rôle essentiel dans la biotransformation des contaminants (Wall et al., 1991), afin de les rendre plus hydrosolubles, par différentes étapes d'oxydation et de conjugaison. Dans le cas des HAP, une fois transformés, ils sont excrétés par voies biliaires et urinaires (Meador et al., 2008 ; Van der Oost et al., 2003). Lorsque les contaminants ne peuvent être biotransformés, ils sont généralement stockés dans les lipides.

4.5. Espèce sentinelle du milieu marin

La sole est une espèce particulièrement sensible à la pression anthropique. En effet, de part son mode de vie benthique, elle est constamment au contact des sédiments, réservoirs de nombreux contaminants hydrophobes dont les HAP. De plus, ses nurseries se situent en milieu côtier et plus particulièrement en milieu estuarien, qui constituent les zones de déversement de nombreux polluants. Le cycle de vie de la sole est bien connu, permettant de la pêcher relativement facilement par chalutage. De plus, son élevage est désormais possible, permettant la réalisation d'expérimentations contrôlées en laboratoire sur des individus dont le trait de vie est parfaitement connu et maîtrisé. Enfin, la sole représente un fort intérêt économique. Dans le golfe de Gascogne, elle constitue la première espèce sur le plan économique (48 M€ en 2004, Durieux, 2007).

La sole peut donc être considérée comme une espèce sentinelle du milieu côtier. Les juvéniles étant plus sédentaires que les adultes, ils reflètent d'autant plus les paramètres de la zone sur laquelle ils sont capturés.

Chapitre 2 – Métabolisme des HAP *in vitro*

1. Objectifs

Le but de ce chapitre était d'étudier la métabolisation du BaP et du Fluo chez la sole par l'identification et la quantification des métabolites produits. Des différences entre espèces ayant déjà été observées dans le métabolisme des HAP (Sikka et al., 1990), il est apparu judicieux de réaliser une partie des expérimentations chez une autre espèce de poisson benthique marin, la limande (*Limanda limanda*). Bien que le métabolisme du BaP chez d'autres espèces suggère une activation par des voies similaires à celle décrites chez les vertébrés supérieurs, les résultats obtenus pourraient apporter des informations complémentaires. Concernant le Fluo, chez les vertébrés supérieurs, il semble être biotransformé par les mêmes voies que le BaP. Cependant, très peu d'études sont disponibles chez le poisson. Le Fluo présentant des différences de conformation par rapport au BaP, il est possible que d'autres mécanismes de biotransformation soient impliqués.

Cette étude a été réalisée par des expositions de microsomes hépatiques de sole et de limande. Les microsomes, renfermant les enzymes impliquées dans les mécanismes de biotransformation, sont considérés comme des réacteurs enzymatiques capables de produire rapidement et en grande quantité les métabolites de HAP.

L'identification et la quantification des métabolites produits ont été réalisées suivant deux techniques analytiques. Une première méthode utilisée consiste à mesurer le niveau de métabolites produits après exposition à des molécules radiomarquées (Perdu et al., 1993). Des microsomes hépatiques de sole ont été exposés à différentes concentrations de BaP et de Fluo radiomarqués (^{14}C). Les métabolites formés ont par la suite été détectés par une méthode basée sur la Chromatographie Liquide Haute Pression couplée à un détecteur de radioactivité (Radio-HPLC). Ces expérimentations ont été réalisées en collaboration avec l'UMR Xénobiotiques de l'INRA de Toulouse. Cette méthode a rendu possible l'obtention des profils métaboliques complets du BaP et du Fluo. Bien qu'une identification *a priori* ait pu être réalisée pour certains des métabolites formés, l'utilisation de la spectrométrie de masse reste indispensable pour leur caractérisation complète, ce qui n'a pas pu être réalisé dans le cadre de cette thèse. Les rendements de biotransformation ainsi que les parts relatives de chaque métabolite détecté et leurs paramètres cinétiques ont pu être calculés. Une seconde méthode basée sur de la Chromatographie Liquide Ultra Pression couplée à de la Spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS) a permis de quantifier de façon très sensible les métabolites de HAP pour lesquels des standards sont disponibles. Cette méthode d'analyse a été développée par Marie Le Dû-Lacoste (2008) au cours de ses travaux de thèse au LPTC de l'Université de Bordeaux 1. Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec le LPTC. Les résultats obtenus devaient permettre de déterminer les concentrations pour lesquelles la production de métabolites était maximale. Par la suite, les cinétiques de biotransformation ont été étudiées, permettant ainsi de suivre l'évolution des proportions de chaque famille de métabolites au cours du temps. Ces résultats ont ainsi permis de comparer les profils métaboliques et l'efficacité de la biotransformation chez les deux espèces considérées.

Le couplage de ces deux méthodes a permis de caractériser et de quantifier certains des métabolites majoritaires du BaP et du Fluo après exposition de microsomes de sole, et ainsi de préciser les voies de biotransformation de ces HAP.

2. Matériel et méthodes

2.1. Protocole d'incubation de microsomes

Les microsomes utilisés lors de ces différentes expositions ont été préparés à partir de foies de soles et de limandes sauvages. Les microsomes hépatiques ont été extraits par des étapes successives de broyage au potter, centrifugation et ultra-centrifugation. La quantification des protéines microsomales extraites a été réalisée par la méthode de Bradford (1976). Le protocole détaillé de l'extraction et de la quantification des protéines microsomales est décrit en annexe 4.

Au cours de cette étude, deux méthodes d'expositions et d'analyses ont été testées, afin de comparer les résultats obtenus après quantification des métabolites en radio-HPLC, ou en UPLC-MS/MS.

2.1.1. Incubations pour analyses en Radio-HPLC

La première méthode d'exposition et d'analyse a été réalisée en collaboration avec l'UMR xénobiotiques de l'INRA de Toulouse. Ces incubations ont été réalisées dans des tubes en corex silanisés, permettant de limiter les phénomènes d'adsorption, comme décrit par Perdu et al. (1993). Lors de ces incubations les protéines microsomales étaient exposées au BaP et Fluo pendant 2 h à 30°C. La concentration en protéines microsomales était de 2 mg/mL de milieu réactionnel, composé de tampon Tris HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7,4, supplémenté par 1 mM de NADP, 1,5 mg/mL de Glucose-6-Phosphate (G6P), et 2 U/mL de G6P-deshydrogénase (G6PDH). Les microsomes ont été exposés au BaP et au Fluo radiomarqués (BaP ¹⁴C, 68mCi/mmmole ; Fluo ¹⁴C, 43.5mCi/mmmole), dilués dans du DMSO de façon à ce que la concentration finale de DMSO dans les échantillons soit de 0,5%. Lors des expositions au BaP, le volume final des incubations était de 1 mL, et contenait une radioactivité totale de 150 000 dpm, tandis que pour le Fluo, le volume final des incubations était de 0,5 mL avec une radioactivité totale de 80 000 dpm. Pour chaque HAP, les microsomes de 3 pools constituant 3 réplicats ont été exposés à des gammes de concentration de 10, 20, 40, 60, 80 µM pour le BaP, et 10, 20, 40, 60, 100, 150 µM pour le Fluo.

Les échantillons ont été agités durant la totalité de l'exposition, et la réaction a été bloquée par l'ajout de 3 volumes de méthanol. Après centrifugation (8 000 rpm pendant 10 min à 4°C), les surnageants contenant le milieu d'incubation, le méthanol, le BaP non métabolisé et les métabolites, ont ensuite été congelés avant analyse en HPLC couplée à un détecteur de radioactivité (Radio-HPLC).

2.1.2. Incubations pour analyse en UPLC-MS/MS

Les expositions réalisées pour analyse en UPLC-MS/MS ont été faites en cryotubes, permettant la congélation directe de la totalité de l'échantillon. Cette méthode, réalisée en collaboration avec le LPTC, est décrite dans l'article 2 (pages 76-95).

2.2. Détection et quantification des métabolites formés

2.2.1. Profilage métabolique des HAP par Radio-HPLC

Avant injection, 200 μ L de chaque incubat ont été prélevés et ont été évaporés sous flux d'azote pour atteindre un volume de 100 μ L. Pour chaque échantillon, 300 μ L de phase A (95% acétate d'ammonium 20 mM pH 3,5 / 5% acétonitrile) et 100 μ L de phase B (acétonitrile 100%) ont été ajoutés. Les 500 μ L ont ensuite été injectés sur une colonne Zorbax (250*4,6 mm, 5 μ m) couplée à une précolonne C18. La température de la colonne était fixée à 30°C. L'HPLC était reliée à un détecteur de radioactivité (Packard® Flow scintillation analyzer 500 TR) (Figure 20).



Figure 20 – Système de Radio-HPLC de l'UMR xénobiotiques de l'INRA

– Pour le BaP, le gradient de solvants était le suivant :

0 minutes : 100% phase A et 0% de phase B

0-35 minutes : de 100 à 40% de phase A ; de 0 à 60% de phase B

35-50 minutes : de 40 à 0% de phase A ; de 60 à 100% de phase B

50-60 minutes : 0% de phase A et 100% de phase B

60-65 minutes : de 0 à 100% de phase A ; de 100 à 0% de phase B

– Pour le Fluo, le gradient de solvants était :

0 minutes : 100% de phase A et 0% de phase B

0-10 minutes : de 100 à 75% de phase A ; de 0 à 25% de phase B

10-20 minutes : 75% de phase A ; 25% de phase B

20-25 minutes : de 75 à 65% de phase A ; de 25 à 35% de phase B

25-35 minutes : 65% de phase A ; 35% de phase B

35-40 minutes : de 65 à 0% de phase A ; de 35 à 100% de phase B

40-50 minutes : 0% de phase A ; 100% de phase B

50-55 minutes : de 0 à 100% de phase A ; de 100 à 0% de phase B

55-60 minutes : 100% de phase A ; 0% de phase B

2.2.2. Quantification des métabolites par UPLC-MS/MS

La méthode de dosage des métabolites de HAP par UPLC-MS/MS a été mise au point par Marie Le Dû-Lacoste (2008). Cette méthode a pu être en partie validée par la quantification des métabolites produits lors des expositions de microsomes hépatiques de sole réalisées dans le cadre de mon travail de thèse. La mise au point et la validation de cette méthode ont fait l'objet d'une publication en cours de préparation, qui constitue l'article 1 (pages 56-70).

Résumé de l'article 1 (pages 56-70)

Une méthode rapide et fiable a été développée afin d'analyser certains métabolites du BaP et du Fluo par l'utilisation de la Chromatographie Liquide Ultra Pression, couplée à de la Spectrométrie de Masse en tandem. Une ionisation en électrospray a été réalisée en modes d'ionisation négatif et positif afin de détecter une sélection de dihydrodiols, de quinones et de métabolites monohydroxylés du BaP et du Fluo. La très bonne linéarité (4 ordres de grandeur) et le très faible bruit de fond fournis par la méthode MRM ont permis le développement d'une méthodologie sensible et spécifique en UPLC-MS/MS. Les limites de détection des métabolites monohydroxylés testés au cours de cette étude sont situées entre 0,6 et 0,9 pg sur la colonne utilisée. L'application de cette méthode sur des microsomes de soles exposés au BaP et au Fluo a permis de valider son applicabilité lors d'études du métabolisme.

Article 1 – Development and validation of a sensitive ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method (UPLC™-MS/MS) for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites.

In preparation

Marie Le Dû-Lacoste^a, Nathalie Wessel^b, Karyn Le Menach^a, Patrick Pardon^a, Farida Akcha^b,
Hélène Budzinski^{a*}

^aISM-LPTC, UMR 5255 CNRS, University of Bordeaux 1, FRANCE

^bLaboratoire d'Ecotoxicologie, Ifremer, Nantes, FRANCE

* Corresponding author: h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Tel: + 33 540 006 998

Fax: + 33 540 002 267

Abstract

A rapid and reliable method was developed to analyze selected benzo(a)pyrene (BaP) and fluoranthene (Fluo) metabolites by Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC™) coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS). Electrospray ionization was operated in both negative and positive ion mode to detect a selection of BaP-diols, BaP-diones, Fluo-diol, Fluo-dione and mono-hydroxylated Fluo and BaP metabolites. The excellent linearity (4 orders of magnitude) and the signal-to-noise performance provided by the MRM method allowed the development of a sensitive and specific UPLC-MS/MS methodology. The limits of detection ranged from 11 to 24 pg on column for diol and dione metabolites and varied from 0.6 and 0.9 pg on column for monohydroxylated metabolites tested in this study. Applied to liver microsomes from soles exposed to BaP and Fluo, this methodology has proved to be suitable for metabolism study.

Keywords: PAH metabolites, UPLC, tandem mass spectrometry, fish.

1. Introduction

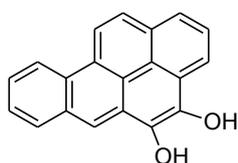
Many classes of chemicals are thought to be genotoxic or/and carcinogenic. Among these, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are one of the most significant priority pollutants based upon their toxic properties and the amounts produced by combustion of biogenic and anthropogenic materials [1]. As major pollutants in the marine environment, PAH toxicity is well investigated in marine organisms. The expression of PAH toxicity requires a biotransformation process. In fish and bivalves, similarities were reported with higher vertebrates in the biotransformation of the model PAH, benzo[a]pyrene (BaP) [2-7]. In most cases, oxidation of PAHs by P450 enzymes is an initial step in the activation process producing major metabolites such as phenols, dihydrodiols and diones. These metabolites can be conjugated to glucuronic acid, sulphate and glutathione to become more water-soluble facilitating their excretion. The biotransformations of PAHs produce also polar biochemically reactive electrophilic species (ultimate carcinogenic metabolites) capable of interacting with cellular macromolecules, particularly nucleic acids and proteins. Bioactivation to reactive metabolites for the DNA is known as a key event in the initiation of carcinogenesis, aging and in some pathologies including those related to the reproduction process. The identification and characterization of ultimate metabolites and of DNA/protein adducts contribute to the elucidation of the mechanisms involved in the metabolic activation of PAHs and in chemical carcinogenesis[8]. PAHs are known as pro-carcinogens due to the metabolic activation requires for the expression of their genotoxicity and cancerogenicity [4-6, 9]. For other major PAH compounds like fluoranthene (Fluo), there are still some uncertainties concerning their bioactivation pathways and their genotoxic potential. Fluoranthene is one of the PAHs the most abundant in the different compartments of the marine environment. Its genotoxic properties are well controverted [10]. Therefore our goal was to develop a sensitive and reliable method to quantify BaP and Fluo metabolism in fish.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) methods with Ultra-Violet (UV) detection were originally used to quantify PAH metabolites[11-18]. In recent years liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) instruments has become available in many laboratories, a major driving force being their widespread use in drug discovery and development. With LC coupled to triple-stage quadrupole tandem mass spectrometers (LC-MS/MS), a wide range of substances in complex biological matrixes can be quantified at low levels and with high specificity. Despite this advantage, relatively few LC-MS methods have been reported for the determination of PAH metabolites. Van de Wiele *et al.*[19] have developed an LC-MS method that utilized a single quadrupole instrument with electrospray ionization in negative mode (ESI-) for the determination of phenolic metabolites of PAHs from *in vitro* metabolism studies. Several LC/MS methods using atmospheric pressure chemical ionization (APCI) or ESI, both in positive and negative mode, for determination of various hydroxylated PAH metabolites have been reported but not applied to biological samples [20-23]. More recently, LC-MS/MS methods for selective detection and quantification of selected monohydroxy PAH metabolites in human urine were reported [24-27]. However none of these methods were dedicated to the study of pro-carcinogen metabolites which are more reactive and sensible to degradation. One additional difficulty is

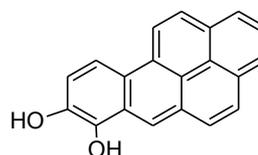
that BaP metabolites share mostly the same parent and product ion patterns making impossible the use of mass spectrometry to distinguish them without good chromatographic separation.

Recently, ultra-performance liquid chromatography (UPLC) with $< 2 \mu\text{m}$ particle size column was introduced for rapid and efficient compound separation over traditional HPLC [28]. UPLC coupled with mass spectrometry is increasingly being used for rapid multiple component quantitation for *in vitro* and *in vivo* BaP metabolite characterization [29].

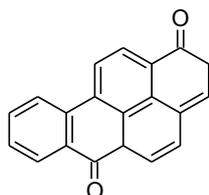
The objective of this study was to develop a new specific and sensitive UPLCTM-MS/MS method to separate and simultaneously quantify eight BaP and Fluo metabolites. This development showed overall improvement compared to currently used methods, and provided the methodological support to study the role of biotransformation enzymes (*e.g.* CYP1A1) in BaP and Fluo metabolism.



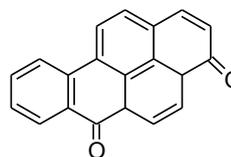
Benzo(a)pyrene-4,5-dihydrodiol (4,5-DHDBaP)



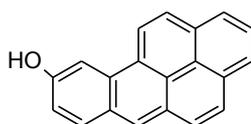
Benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol (7,8-DHDBaP)



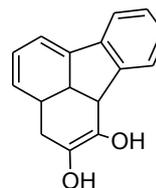
Benzo(a)pyrene-1,6-dione (1,6-DioneBaP)



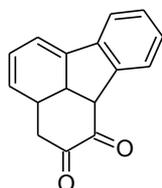
Benzo(a)pyrene-3,6-dione (3,6-DioneBaP)



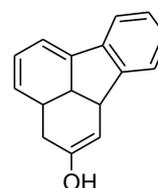
9-Hydroxybenzo(a)pyrene (9-OHBaP)



Fluoranthene-2,3-dihydrodiol (2,3-DHDFluo)



Fluoranthene-2,3-dione (2,3-DioneFluo)



3-hydroxyfluoranthene (3-OHFluo)

Figure 21 – Chemical structures of investigated PAH metabolites

2. Experimental

2.1 Materials and reagents

Benzo[a]pyrene (CAS No 50-32-8) and Fluoranthene (CAS No 206-44-0) were purchased from Sigma Aldrich Chemicals (St Quentin Falavier, France). BaP-4,5-dihydrodiol, BaP-7,8-dihydrodiol, BaP-1,6-dione, BaP-3,6-dione, 9-hydroxy BaP, Fluo-2,3-dihydrodiol, Fluo-2,3-dione and 3-hydroxy Fluo were purchased from National Cancer Institute Chemical Carcinogen Reference Standard Repository (Kansas City, MO, USA). 1-hydroxy pyrene-d9 was obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Cluzeau Info Labo, Sainte Foy la Grande, France). The structures of studied metabolites are shown in Figure 21. All the standards were of analytical grade (> 98%).

All the solvents used were of analytical grade (purity > 98%). Ultra gradient HPLC grade acetonitrile was obtained from J.T Baker (VWR International, Strasbourg, France). Methanol Supersolv was provided by Merck. Formic acid and acetic acid 100% Normapur (analytical reagent grade, Scharlau) were obtained from ICS (Belin-Beliet, France). Sodium acetate trihydrate 99% (purity > 99%) was purchased from Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Deionised water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). Two solid-phase extraction (SPE) cartridges were used: Strata-X cartridge (3 cc, 200 mg) was from Phenomenex (Le Pecq, France) and HF Bond Elut-PSA cartridge (3 cc, 500 mg) from Varian (Atlantic Labo, Eysines, France).

2.2 UPLC™ instrument and chromatographic conditions

The Ultra Performance™ Liquid Chromatography (UPLC) was performed on a Waters ACQUITY UPLC™ system (Milford, MA, USA), equipped with a binary solvent delivery manager, and a sample manager. The UPLC separation was performed on a Waters ACQUITY BEH™ C₁₈ column (1.7 μm, 2.1 mm x 150 mm) maintained at 30°C. A 0.2 μm precolumn filter (ACQUITY UPLC™ stainless steel in-line filter) was used to protect the analytical column. 10 μl sample, dissolved in acetonitrile, was injected for UPLC analysis. The mobile phase used was a mixture of 0.1 % of formic acid in acetonitrile (A) and 0.1 % of formic acid in Milli-Q water (B) with the following multi-step gradient: 0-2 min: 40/60 (A/B, v/v); 2-6 min: 40/60 (A/B, v/v) to 80/20 (A/B, v/v); 6-8 min: 80/20 (A/B, v/v) to 40/60 (A/B, v/v); 8-10 min: 40/60 (A/B, v/v) at a flow rate of 0.40 ml.min⁻¹. Total run time was 10 min per sample.

2.3 Mass Spectrometric conditions

Mass spectrometric (MS) measurement was performed on a Waters Micromass® Quattro Premier™ tandem quadrupole mass spectrometer (Manchester, UK) equipped with an electrospray ionization (ESI) source. The MS system was controlled by MassLynx™ 4.0 Software. All MS optimization experiments were performed in Scan mode and in product scan mode. All quantifications were performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The cone voltage and collision energies for each of the MRM transitions were optimized by infusing the individual neat standard solution into the mass spectrometer at 2 μg.ml⁻¹. To ensure that the ionisation source parameters were compatible with the mobile phase flow

during the tuning, a flow of $0.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ at 40% A was introduced into the mass spectrometer at the same time by using a PEEK T connector. MRM data collection during the chromatographic experiments were performed in both negative and positive mode with the capillary voltage fixed at 3.5 kV, the source temperature at 90°C , the desolvation temperature at 350°C , the desolvation gas flow at $900 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$, and the cone gas flow at $80 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$. Inter-scan delay for the polarity switching, inter-channel delay and dwell time for each MRM channel were set at 20, 5 and 50 ms, respectively. This allowed a sufficient cycle time to collect at least 15 data points per peak.

2.4 Standard and working solutions

Individual stock solutions of hydroxylated metabolites ($100 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) and internal standard ($50 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) were prepared in acetonitrile. Working standard solutions for linear calibration were prepared by mixing and diluting in acetonitrile the individual stock solutions of metabolites and internal standard. The final concentrations of compounds in the working solutions ranged from $1 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ to $8 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of solvent (ACN). Both the stock and working solutions were stored at -20°C until use. The samples were then extracted as described in section 2.5. Quality control (QC) samples were prepared at three different concentrations ($10 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, 0.1 and $1 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of bile), by adding working standard solutions in $100 \mu\text{l}$ bile. They were used to assess accuracy and precision.

2.5 Sample preparation

Samples were prepared according to a protocol developed by Le Dû-Lacoste and Budzinski [30].

The weighted samples ($100 \mu\text{l}$ of microsome and bile sample) were homogenized in 2 ml precooled buffered water (sodium acetate buffer at pH 5.0 with acetic acid). The internal standard, 1-hydroxypyrene-d9 was added to the samples ($20 \mu\text{l}$ of a diluted solution at $0.5 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of solvent). Glass vials were used to avoid adsorption phenomena on inner surface. Following centrifugation (10 min, 5,000 rpm, 20°C), samples were extracted on solid-phase Strata X cartridges which were preconditioned with 2 ml methanol and 4 ml buffered water. The supernatants were loaded on cartridges and washed with 2 ml buffered water and 2 ml water/methanol (70/30, v/v). Water traces were then removed by applying vacuum on the cartridges during 45 min. Metabolites were then eluted with 5 ml of methanol. Extracts were reduced to dryness under nitrogen stream and redissolved in 1 ml methanol/methylene chloride mixture (20/80, v/v) before purification. Solid-phase HF PSA Varian cartridges were used for the purification step. Before loading the extracts redissolved in methanol/methylene chloride (20/80, v/v), the cartridges were first preconditioned with 2.5 ml methanol/methylene chloride (20/80, v/v). The elution of the compounds was then performed with 6 ml of the same mixture. Extracts were finally reduced to dryness under a nitrogen stream and redissolved in $100 \mu\text{l}$ acetonitrile. Finally the extracts were stored at -20°C until injection.

2.6 Method validation

This UPLCTM-MS/MS method was validated considering different criteria, including linearity, inter- and intra-day precision, intra-day accuracy and recovery. The method was then

applied for the analysis of PAH metabolites produced by sole (*Solea solea*) following microsomal incubation.

2.6.1 Linearity and limits of detection

The calibration curves for metabolites were constructed by plotting measured peak ratios of analyte to internal standard (IS) against nominal OH-PAH concentrations in bile using a $1/x$ weighted linear least-squares regression model. The minimally acceptable correlation coefficient (r^2) for the calibration curve was 0.99 or greater. The only use of one IS is a limitation of the method due to the variability of chemical structure/properties between compound studied and the chosen internal standard. The choice of only one IS is explained by the very high cost of isotope labelled compounds and by the lack of adequate labelled metabolites. Detection limits were determined using a signal-to-noise approach (3:1). Standard solutions were used for the determination of instrumental detection limits (IDL). Bile samples spiked before extraction were used for method detection limits determination (MDL).

2.6.2 Precision and accuracy

In order to assess the intra- and inter-batch precision and accuracy, QC samples at three concentrations were prepared. The intra- and inter-batch precisions of the assay were assessed by calculating the relative standard deviation (RSD) for the analysis of QC samples in three replicates. Accuracy was presented as the percent bias of the calculated concentration in comparison to the nominal concentration. The criterion for acceptability of precision was that RSD for each concentration level should not exceed $\pm 15\%$ with the exception of the low level, for which it should not exceed $\pm 20\%$. Similarly, the averaged value for accuracy should be in the range of $\pm 15\%$ of the nominal concentration except for the lowest level ($\pm 20\%$) [31].

2.6.3 Extraction recoveries

The recoveries of PAH metabolites have been determined in triplicates using metabolite-free bile samples spiked with standard solutions of metabolites prepared in acetonitrile. Final concentrations of metabolites in bile were 10, 100 and 1,000 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of bile. The spiked samples were then extracted as described in Section 2.5. The extraction recoveries were calculated according to the internal standard methodology.

2.6.4 Microsomal incubation

Microsomes of sole liver were prepared and used for in vitro bioactivation of BaP and Fluo as described in a complementary study on PAH metabolism in fish by Wessel *et al.* [32]. Following exposure to 20 and 40 μM of each PAH, samples were prepared for analysis by UPLC-MS/MS as indicated in section 2.5.

3. Results and discussion

3.1 Mass spectrometry

For quantitative analysis, peak integration with high precision and reproducibility is critical for the final results. No less than 15 data points are generally recommended to defined chromatographic peaks [31]. As peaks become narrower, the mass spectrometer is required to acquire data faster. Such considerations make essential the use of tandem mass spectrometry, especially when UPLC technology is used for the chromatographic separation of compounds.

When optimizing an analytical method, it is desirable to produce an intense ion signal that is characteristic of the target compound. Using tandem mass spectrometry, selectivity and sensitivity are increased by almost suppressing the noise level. Thus mass spectrometric parameters were optimized to achieve maximum abundance of the product and fragmented ions of PAH metabolites. Acquisition parameters were determined by direct infusion into the tandem mass spectrometer of 2 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ solutions (in mobile phase) of each compound at a flow rate of 20 $\mu\text{l.ml}^{-1}$. Full scan and product ion mass spectra of each compound were obtained in positive ESI mode for dione and diol compounds and in negative ESI mode for IS and monohydroxylated metabolites. BaP-diols gave a precursor ion which corresponded to $[\text{M}-18]^+$. For Fluo-diol, it corresponded to $[\text{M}-15]^+$. For both BaP-dione and Fluo-dione, the precursor ion chosen was $[\text{M}+\text{H}]^+$. Finally in the negative mode, 3-OHFluo and 9-OHBaP gave a $[\text{M}-\text{H}]^-$ as precursor ion. The isolation time was set at 20 ms and the isolation window was fixed at 5 ms in all cases, in order to get good sensitivity and selectivity. The collision energies applied to the fragmentation of the parent ion was adjusted in order to avoid its complete disappearance. Fragmented ions under collision-induced decomposition were chosen upon the criterion of abundance in order to enhance the sensitivity of the analysis. The chosen m/z values for daughter ions were as follows: m/z 189 for 3-OHFluo and Fluo-2,3-diol, m/z 176 for Fluo-2,3-dione, m/z 239 for 9-OHBaP and BaP-diols and m/z 226 for BaP-diones. The MRM transition of m/z 226 \rightarrow 198 was chosen for the quantification of the IS (1-OHPd9). The optimum mass spectrometric conditions along with mass transitions in MRM are presented in Table 12.

The use of internal standard allows a more reliable and rapid analysis when compared to external calibration. However for the analysis of PAH metabolites, the use of internal standard was commercially limited. The use of 1-OHPd9 as internal standard has led to choose the ESI negative mode analysis. But the majority of the metabolites of interest could only be analysed in the ESI positive mode. That is why a compromise was done. For each LC injection, the mass spectrometer was set to collect data in MRM mode using ESI, both in negative and positive ion modes.

Table 12 – MRM parameters for selected PAH metabolites

Compound	Mode	MRM	Cone Voltage / Collision energy (V / eV)	Dwell time (s)
2,3-DHD-Fluo	ESI+	219 -> 189	60/38	0.050
2,3-Dione-Fluo	ESI+	233 -> 176	60/40	0.050
4,5-DHD-BaP	ESI+	268 -> 239	60/40	0.050
7,8-DHD-BaP	ESI+	268 -> 239	60/40	0.050
1,6-Dione-BaP	ESI+	283 -> 226	60/42	0.050
3,6-Dione-BaP	ESI+	283 -> 226	60/42	0.050
3-OHFluo	ESI -	217 -> 189	60/30	0.050
9-OHBaP	ESI -	267 -> 239	60/40	0.050
1-OHP d9	ESI-	226 -> 198	60/32	0.050

3.2 Chromatography

In the literature, several HPLC methods described the use of methanol/water as mobile phase for the separation of OH-PAH and especially BaP metabolites [33-37]. Thus we tried methanol/water. However, even after optimization, we did not achieve accurate separation of the BaP diones and the overall pressure of the UPLC system did not support a methanol/water gradient. Overpressures ($> 15,000$ psi) at working flow rates (between 0.4 and $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) were too frequently reached leading to an unreliable method. When changing the organic phase to acetonitrile with the gradient described in Section 2.2, all the compounds were separated (Figure 22) and no more problem with the pressure in the system were encountered. Moreover when looking at the storage of stock solutions and samples, labile compounds such as diones and epoxides demonstrated better stability in acetonitrile than in methanol (data not shown).

Various combinations of acetonitrile and water and a number of acidic modifiers (trifluoroacetic acid, formic acid and glacial acetic acid) were investigated to identify the optimal mobile phase composition that produced the best sensitivity and peak shape for the analyte. It was found that the use of formic acid as an acidic modifier in the mobile phase gave excellent positive ESI response for metabolites analysed in the positive mode. An increase in the acetonitrile content could improve the peak shape whereas an increase in water content broadened the peak. However an increase in acetonitrile content could lead to an overpressure in the column that could only be avoided by a decrease in the mobile phase flow rate. So a compromise was done between all factors taking a mobile phase made of 40% acetonitrile in water containing 0.1% formic acid at $0.4 \text{ ml}/\text{min}$ (Pressure $\sim 10,000$ psi).

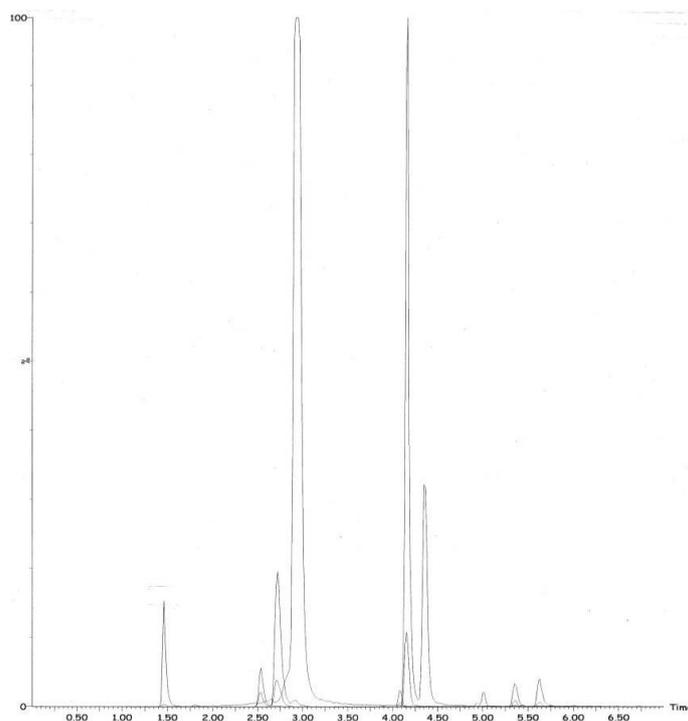


Figure 22 – UPLC™-MS/MS chromatogram of the PAH metabolites mixtures. Retention time in min.

The total run time was set at 10 min. Thus, this method increased the gain in time and decreased solvent consumption. Compared to traditional HPLC instrument, UPLC exhibited a higher peak capacity resulting in a reduction of ion suppression for MS detector, which gave an improvement in the detection sensitivity.

3.3 UPLC™-MS/MS method validation

Linearity was tested with standard mixtures in acetonitrile at different levels of concentrations (Table 13). Correlation coefficient ranged between 0.9971 (BaP-1,6-dione) and 0.9996 (3-OHFluo). Analytical limits of detection as well as methodological limits of detection (Table 13) were obtained for a signal-to-noise ratio of 3. The instrumental detection limits ranged between 1.1 and 2.4 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ for metabolites analyzed in the positive mode (10 μl injected). For mono-hydroxylated PAHs they were lower with values of 0.06 and 0.09 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ for 3-OHFluo and 9-OHBaP, respectively. When comparing these detection limits with those obtained by UPLC-MS [29], they were found to be more than 10 times lower for the same studied metabolites. This result showed the greater sensitivity of UPLC-MS/MS method compared to UPLC-MS. Methodological limits of detection (MDL) varied between 30 and 73 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of bile for diol and dione compounds. For 3-OHFluo and 9-OHBaP, MDL were 2 and 6 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of bile, respectively.

At all three concentrations, intra-day and inter-day precisions were below 9 % RSD (Table 14). The intra-day accuracy ranged between 64 % and 88 % for all compounds at the three concentrations (Table 15). The lower recoveries for diol and dione compounds (between 64 and 79%) compared to mono-hydroxylated metabolites (more than 76%) may be explained by the loss of these more hydrophilic compounds during sample preparation steps. Compared to

3-OHFluo or 9-OHBaP, diol and dione compounds would bind more weakly to the SPE-cartridge and would be partly removed during the purification step on SPE-cartridge. Moreover diols and diones are more reactive compounds than mono-hydroxylated ones. They can react easily with light and air which can result in degradation into more stable compounds. Despite lower recoveries for some compounds reproducibility was acceptable at all three concentrations. This allows us to present the usefulness of this method to quantify selected BaP and Fluo metabolites in biological samples.

Table 13 – Linearity and limits of detection of the UPLC-MS/MS method. IDL: instrumental limit of detection (10 µl injected). MDL: methodological limit of detection.

Compounds	Range of concentrations	Linearity	R ²	IDL (pg/µl of solvent)	MDL (pg/µl of bile)
4,5-DHDBaP	8 ng.g ⁻¹ – 34 µg.g ⁻¹	y = 712,9x + 33,9	0,9983	1.5	30.2
7,8-DHDBaP	8 ng.g ⁻¹ – 34 µg.g ⁻¹	y = 689,9x + 47,5	0,9976	1.7	39.1
1,6-dioneBaP	8 ng.g ⁻¹ – 33 µg.g ⁻¹	y = 262,9x + 12,6	0,9971	1.2	58.0
3,6-dioneBaP	8 ng.g ⁻¹ – 33 µg.g ⁻¹	y = 282,3x + 9,4	0,9975	1.7	60.1
9-OHBaP	8 ng.g ⁻¹ – 32 µg.g ⁻¹	y = 908,6x + 1,4	0,9995	0.09	5.6
2,3-DHDFluo	17 ng.g ⁻¹ – 70 µg.g ⁻¹	y = 1185,9x + 83,8	0,9980	1.1	51.8
2,3-dioneFluo	11 ng.g ⁻¹ – 44 µg.g ⁻¹	y = 297,6x + 19,9	0,9994	2.4	72.8
3-OHFluo	12 ng.g ⁻¹ – 48 µg.g ⁻¹	y = 1921,4x + 18,9	0,9996	0.06	2.2

Table 14 – Intra- and inter-precision data of PAH metabolites at three different concentrations

Compound	Intra-day precision (RSD %, n=3 injections)			Inter-day precision (RSD %, n=3 injections)		
	1 pg.µl ⁻¹	10 pg.µl ⁻¹	1 ng.µl ⁻¹	1 pg.µl ⁻¹	10 pg.µl ⁻¹	1 ng.µl ⁻¹
4,5-DHDBaP	4	5	3	8	8	9
7,8-DHDBaP	4	4	2	8	9	8
1,6-dioneBaP	5	4	5	7	7	7
3,6-dioneBaP	9	4	4	7	9	9
9-OHBaP	5	2	2	8	9	9
2,3-DHDFluo	4	5	4	8	8	8
2,3-dioneFluo	5	6	5	7	7	8
3-OHFluo	5	3	2	8	9	9

Table 15 – Accuracy data of PAH metabolites at three different concentrations (mean ± SD)

Compound	Accuracy (RSD %, n=3 injections)		
	10 pg.µl ⁻¹	100 pg.µl ⁻¹	1 ng.µl ⁻¹
4,5-DHDBaP	75 ± 10	78 ± 9	79 ± 8
7,8-DHDBaP	71 ± 11	70 ± 10	75 ± 8
1,6-dioneBaP	65 ± 10	64 ± 9	69 ± 9
3,6-dioneBaP	69 ± 11	70 ± 10	65 ± 10
9-OHBaP	77 ± 7	76 ± 6	77 ± 6
2,3-DHDFluo	71 ± 11	68 ± 9	75 ± 10
2,3-dioneFluo	64 ± 11	64 ± 9	70 ± 9
3-OHFluo	87 ± 9	84 ± 7	88 ± 6

3.4 Application to hepatic microsomes of flatfish: *In vitro* study

For all samples, no interfering peak was observed leading to accurate quantitation of the targeted compounds. Concerning BaP exposure, BaP-diols, BaP-dione and OH-BaP metabolites were identified and quantified. Results are presented in Table 16. BaP-diols and OH-BaP were produced at higher levels than BaP-diones. A few amount of 9-OHBaP was measured but one isomer was predominant (3-OHBaP). This preferred metabolism pathway for BaP is corroborated by previous studies [5, 9, 38-40]. Concerning fluoranthene exposure, the same trend was observed. Fluo-2,3-diol and 3-OHFluo were found to be major metabolites measured in the liver microsomes. Lower amount of Fluo-2,3-dione was quantified. There are very poor data concerning the metabolism pathways of fluoranthene. Having regards to these preliminary results, the metabolism of fluoranthene seems to follow the same patterns as those of BaP. To go further in our investigations, a complementary study using our UPLC-MS/MS analytical method for metabolite identification was conducted [32].

Table 16 – BaP and Fluo metabolites detected in sole liver microsome samples after exposure to parent compounds. Concentrations are expressed in ng.mg^{-1} microsomal proteins (mean \pm SD, n = 3).

Compound	PAH concentration (μM)	
	20	40
Sum of DHDBaP	119 \pm 12.4	616 \pm 64.0
Sum of dioneBaP	27 \pm 2.2	196 \pm 9.2
9-OHBaP	17 \pm 1.0	101 \pm 4.0
OHBaP isomer	126 \pm 13.0	739 \pm 64.0
2,3-DHDFluo	221 \pm 27.3	363 \pm 44.8
2,3-dioneFluo	8 \pm 0.8	22 \pm 5.2
3-OHFluo	555 \pm 88.3	559 \pm 120.3

4. Conclusions

This paper represents the first developments and validation of an UPLCTM-MS/MS method for the detection of PAH metabolites at low levels. Thanks to the UPLC technology coupled to the tandem mass spectrometry, this methodology allows to separate and analyze PAH metabolites with an increase in resolution, sensitivity, and specificity when compared to traditional HPLC methods. New developments could be considered to enhance the number of metabolites that can be separated and quantified.

Furthermore this method has been applied to *in vitro* metabolism studies and has proved its efficiency and performance. The sensitivity and the specificity of the method were sufficient to identify and quantify PAH metabolites in a complex biological sample.

Acknowledgements: The authors wish to thank the National Program for Ecotoxicology (PNETOX), the French Minister of Environment and the research team IMOPHYS (Integration of molecular and physiologic responses to organic contaminants in coastal area) for research fundings. They want also to acknowledge the “Region Aquitaine” and the French National Council for Scientific Research (CNRS) for providing the PhD grant of M. Le Dû-Lacoste.

References

1. IARC, *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human. Vol 32.* 1983, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France. p. 57-61.
2. Johnson, L. L., Ylitalo, G. M., Arkoosh, M. R., Kagley, A. N., Stafford, C., Bolton, J. L., Buzitis, J., Anulacion, B. F., and Collier, T. K. 2007. *Environmental Monitoring and Assessment* **124**(1-3): p. 167-194.
3. Rewitz, K. F., Styrihave, B., Løbner-Olesen, A., and Andersen, O. 2006. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* **143**(4): p. 363-381.
4. Patel, M. R., Scheffler, B. E., Wang, L., and Willett, K. L. 2006. *Aquatic Toxicology* **77**(3): p. 267-278.
5. Miranda, C. L., Chung, W. G., Wang-Buhler, J. L., Musafia-Jeknic, T., Baird, W. M., and Buhler, D. R. 2006. *Aquatic Toxicology* **80**(2): p. 101-108.
6. Aina, R., Palin, L., and Citterio, S. 2006. *Chemosphere* **65**(4): p. 666-673.
7. Platt, K. L. and Grupe, S. 2005. *Chemical Research in Toxicology* **18**(4): p. 700-710.
8. Pitot, H. 1995. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **333**(1-2): p. 3-14.
9. Harrigan, J. A., Vezina, C. M., McGarrigle, B. P., Ersing, N., Box, H. C., Maccubbin, A. E., and Olson, J. R. 2004. *Toxicological Sciences* **77**(2): p. 307-314.
10. Palmqvist, A., Rasmussen, L. J., and Forbes, V. E. 2006. *Aquatic Toxicology* **80**(3): p. 309-319.
11. Kammann, U. 2007. *Environmental Science and Pollution Research* **14**(2): p. 102-108.
12. Buratti, M., Campo, L., Fustinoni, S., Cirila, P. E., Martinotti, I., Cavallo, D., and Foa, V. 2007. *Biomarkers* **12**(3): p. 221-239.
13. Walker, S. A., Whitten, L. B., Seals, G. B., Lee, W. E., Archibong, A. E., and Ramesh, A. 2006. *Food and Chemical Toxicology* **44**(3): p. 380-387.

14. Vuorinen, P. J., Keinanen, M., Vuontisjarvi, H., Barsiene, J., Broeg, K., Forlin, L., Gercken, J., Kopecka, J., Kohler, A., Parkkonen, J., Pempkowiak, J., and Schiedek, D. 2006. *Marine Pollution Bulletin* **53**(8-9) : p. 479-487.
15. van den Hurk, P. 2006. *Marine Environmental Research* **62**(SUPPL. 1).
16. van den Hurk, P. 2006. *Aquatic Toxicology* **77**(2): p. 202-209.
17. Shailaja, M. S., Rajamanickam, R., and Wahidulla, S. 2006. *Environmental Pollution* **143**(1) : p. 174-177.
18. Pikkarainen, A. L. 2006. *Chemosphere* **65**(10) : p. 1888-1897.
19. Van de Wiele, T. R., Peru, K. M., Verstraete, W., Siciliano, S. D., and Headley, J. V. 2004. *Journal of Chromatography B* **806**(2): p. 245-253.
20. Galceran, M. T. and Moyano, E. 1994. *Journal of Chromatography A* **683**(1): p. 9-19.
21. Galceran, M. T. and Moyano, E. 1996. *Journal of Chromatography A* **731**(1-2): p. 75-84.
22. Letzel, T., Poschl, U., Wissiack, R., Rosenberg, E., Grasserbauer, M., and Niessner, R. 2001. *Analytical Chemistry* **73**(7): p. 1634-1645.
23. Letzel, T., Rosenberg, E., Wissiack, R., Grasserbauer, M., and Niessner, R. 1999. *Journal of Chromatography A* **855**(2): p. 501-514.
24. Fan, R., Dong, Y., Zhang, W., Wang, Y., Yu, Z., Sheng, G., and Fu, J. 2006. *Journal of Chromatography B* **836**(1-2): p. 92-97.
25. Jacob, P., Wilson, M., and Benowitz, N. L. 2007. *Analytical Chemistry* **79**(2): p. 587-598.
26. Pigni, D., Cialdella, A. M., Faranda, P., and Tranfo, G. 2006. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **20**: p. 1013-1018.
27. Xu, X., Zhang, J., Zhang, L., Liu, W., and Weisel, C. P. 2004. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **18**: p. 2299-2308.
28. Sherma, J. 2005. *J. AOAC Int* **88**(3): p. 63-67.
29. Zhu, S., Li, L., Thornton, C., Carvalho, P., Avery, B. A., and Willett, K. 2008. *Journal of chromatography B* **863**(1): p. 141-149.
30. Le Dû - Lacoste, M. and Budzinski, H. Submitted. *Anal Bioanal Chem.*
31. Waters. 2004. *Waters Application Note* **720000917EN**.
32. Wessel, N., Le Dû - Lacoste, M., Budzinski, H., Burgeot, T., and Akcha, F. Submitted.

33. James, M. O., Kleinow, K. M., Zhang, Y., Zheng, R., Wang, L., and Faux, L. R. 2004. *Marine Environmental Research* **58**(2-5): p. 343-346.
34. Ruddock, P. J., Bird, D. J., McEvoy, J., and Peters, L. D. 2003. *The Science of The Total Environment* **301**(1-3): p. 105-117.
35. Schanke, A. v., Holtz, F., der Meer, J. v., Boon, J. P., Ariese, F., Stroomberg, G., den Berg, M. v., and Everaarts, J. M. 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(8): p. 1641-1647.
36. Varanasi, U., Nishimoto, M., Reichert, W. L., and Le Eberhart, B. T. 1986. *Cancer Research* **46**(8): p. 3817-3824.
37. Willett, K. L., Gardinali, P. R., Lienesch, L. A., and Di Giulio, R. T. 2000. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **58**(1): p. 68-76.
38. Willett, K. L., Wassenberg, D., Lienesch, L., Reichert, W., and Di Giulio, R. T. 2001. *Toxicology and Applied Pharmacology* **177**(3): p. 264-271.
39. Padros, J. and Pelletier, E. 2000. *Marine Environmental Research* **50**(1-5): p. 347-351.
40. Stein, J. E., Hom, T., and Varanasi, U. 1984. *Marine Environmental Research* **13**(2) : p. 97-119.

3. Résultats et discussion

3.1. Résultats obtenus en Radio-HPLC chez la sole

3.1.1. Métabolisme du BaP

À la suite des expositions en tubes corex silanisés, avec arrêt de la réaction au méthanol et dosage en radio-HPLC, trois métabolites ont été détectés chez la sole grâce aux radiochromatogrammes obtenus (Figure 23). Les profils obtenus présentent une forte homologie avec ceux obtenus précédemment par l'UMR Xénobiotique chez le porc (Travaux de thèse de C. Jacques). Chez le porc, certains des métabolites du BaP produits ont pu être caractérisés par l'utilisation de la spectrométrie de masse (Jacques et al., 2009). Il est probable que les métabolites obtenus chez la sole soient similaires à ceux obtenus chez le porc. Compte tenu de la similitude des profils, le pic n°1 ayant le temps de rétention le plus faible (environ 27,50 min) représenterait les tétraols du BaP. Le pic n°2 (32,80 min) serait constitué par les dihydrodiols, et le pic n°3 (43,80 min) représenterait les métabolites monohydroxylés du BaP (phénols). La concentration d'exposition pour laquelle la production de métabolites est maximale a été déterminée à 40 μM . À cette concentration, le rendement de métabolisation du BaP est de 6,05 %. Les deux familles formées majoritairement sont les métabolites monohydroxylés (48 % en moyenne) et les dihydrodiols (34 % en moyenne). La cinétique de formation de ces métabolites peut être représentée graphiquement selon la méthode de Michaelis-Menten (Figure 24). Cette représentation graphique permet de déterminer les paramètres cinétiques V_m et K_m (Tableau 17). Ces paramètres correspondent respectivement à la vitesse maximale de formation du métabolite concerné, et à la constante d'affinité entre le substrat (BaP) et l'enzyme catalysant la production du métabolite étudié. La méthode de détermination de ces paramètres est détaillée en annexe 5. Les métabolites potentiellement identifiés comme les tétraols étant formés en plus faibles quantités (17 % en moyenne), il n'apparaît pas judicieux de calculer leurs paramètres cinétiques.

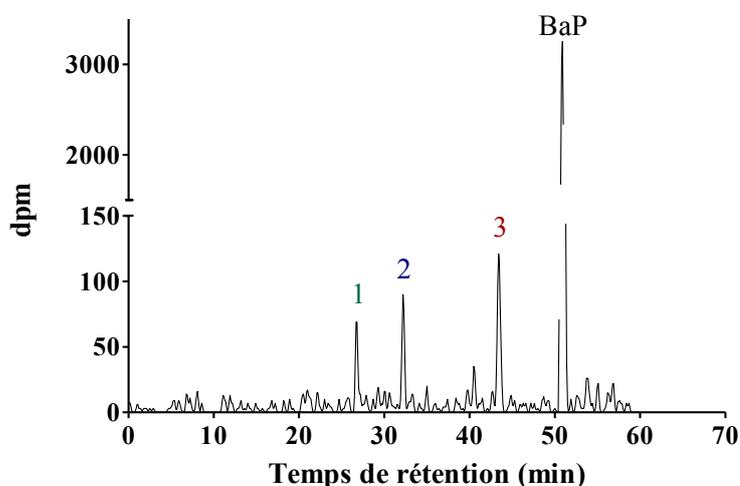


Figure 23 – Radio-chromatogramme obtenu après expositions de microsomes de foie de sole à 10 μM de BaP pendant 2 h.

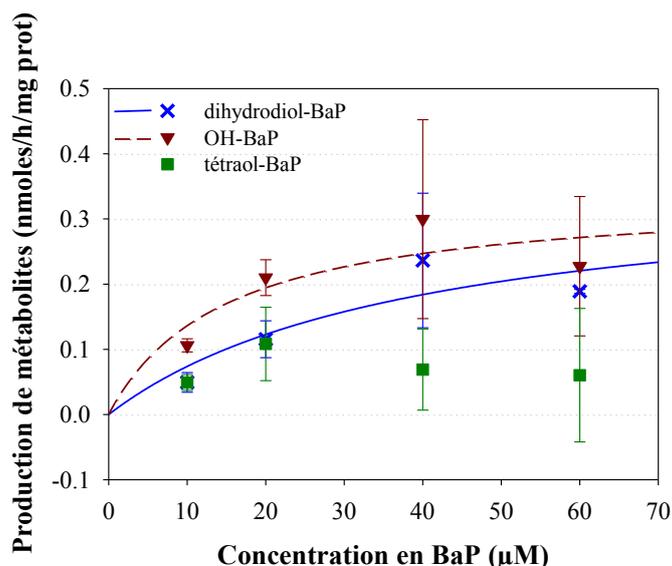


Figure 24 – Représentation graphique de la production des métabolites du BaP selon Michaelis-Menten

Tableau 17 – Paramètres cinétiques des métabolites du BaP chez la sole (V_m est exprimé en nmole de métabolite produit par heure et par mg de protéines microsomales ; K_m est exprimé en μM).

	Dihydrodiols	Monohydroxylés
V_m	0,366	0,339
K_m	39,63	14,89

Ces résultats démontrent la capacité des microsomes de foie de sole à métaboliser le BaP. Les profils métaboliques obtenus sont similaires à ceux observés chez les vertébrés supérieurs. En effet, la production majoritaire des dihydrodiols et des phénols, particulièrement le 3-OH-BaP a déjà été décrite chez les vertébrés (Jiang et al., 2007; Pandey et al., 2006), et chez certains poissons comme le flet (Lemaire et al., 1996). La caractérisation des différents dihydrodiols et des phénols n'a pas pu être réalisée ici. Le 7,8-dihydrodiol-BaP étant le précurseur de plusieurs métabolites génotoxiques, il aurait été intéressant de l'identifier. En effet, la transformation du 7,8-dihydrodiol-BaP peut mener d'une part au BPDE, et d'autre part à la 7,8-dione-BaP (Shimada et al., 2006). Bien qu'ils n'aient pas été détectés ici, ces métabolites sont parmi les plus électrophiles. Le BPDE étant très instable, il ne peut pas être détecté. Cependant, la détection de tétraols, générés à partir du BPDE, confirme sa production. Le BPDE comme la 7,8-dione-BaP peuvent notamment former des adduits à l'ADN. De plus, la formation de certains métabolites comme la 7,8-dione-BaP peut être accompagnée de la production d'ERO pouvant générer des dommages oxydatifs à l'ADN. La production majoritaire de dihydrodiols suggère la production subséquente du BPDE et de la 7,8-dione-BaP.

De même, la 3,6-dione-BaP, formée par auto-oxydation du 3-OH-BaP et considérée comme procarcinogène (Shimada, 2006) n'a pas été détectée sur les radiochromatogrammes. Comme chez les vertébrés supérieurs, la formation de quinones pourrait être minoritaire et difficilement détectable (Van Schanke et al., 2001). La formation de la 3,6-dione-BaP ne nécessitant pas de catalyse enzymatique, elle pourrait avoir lieu lors d'incubations plus longues. La formation importante de certains précurseurs des métabolites les plus

généotoxiques du BaP suggère une bioactivation du BaP par les protéines microsomales de foie de sole, selon des mécanismes similaires à ceux décrits chez les vertébrés supérieurs.

3.1.2. Métabolisme du Fluo

Dans le cas du Fluo, 6 métabolites ont pu être détectés en Radio-HPLC (Figure 25). Parmi eux, trois sont potentiellement identifiables d'après les précédents travaux réalisés à l'UMR Xénobiotiques. Chez la sole, certains métabolites conjugués ont pu être identifiés dans la bile d'individus exposés *in vivo* au Fluo par injection péritonéale (Hillenweck et al., 2008). Tous les métabolites caractérisés étaient conjugués à l'acide glucuronique. Le métabolite majoritaire détecté résultait de la conjugaison du *trans*-2,3-dihydrodiol-Fluo avec l'acide glucuronique, suggérant que le métabolite majoritairement produit était le 2,3-dihydrodiol-Fluo ; le second pic majoritairement détecté représentait un mélange des conjugués du 7-OH-Fluo et du 8-OH-Fluo ; le troisième pic représentait le conjugué du 3-OH-Fluo ; le quatrième pic majoritaire était le 2,3-di-*O*-glucuronide-Fluo résultant de la conjugaison du 2,3-dihydroxy-Fluo avec l'acide glucuronique (Hillenweck et al., 2008). Sur les radiochromatogrammes obtenus ici, le métabolite majoritaire étant le n°2 (25,80 min), il est possible que ce métabolite représente le 2,3-dihydrodiol-Fluo. Les pics 5 (36,7 min) et 6 (37,8 min) semblent représenter des métabolites monohydroxylés, probablement le 3-OH-Fluo et le 7-OH-Fluo. Le pic n°4 (34,70 min) pourrait quant à lui être caractéristique de la 2,3-dione-Fluo ou éventuellement d'un autre métabolite hydroxylé.

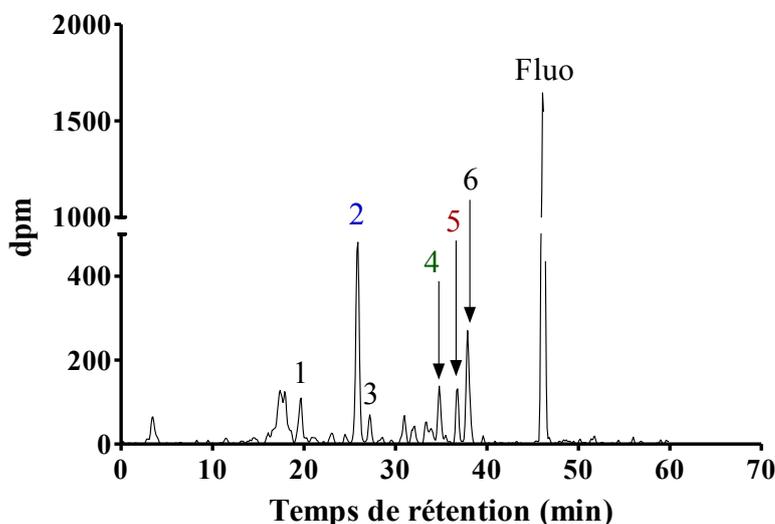


Figure 25 – Radio-chromatogramme obtenu après exposition de microsomes de foie de sole à 10 μ M Fluo pendant 2 h.

De même que pour le BaP, la formation des trois métabolites majoritaires (2, 5, 6) peut être représentée selon un graphique de Michealis-Menten (Figure 26), et leurs paramètres cinétiques peuvent être calculés (Tableau 18). Après exposition à 10 μ M de Fluo, les métabolites 1, 3, et 4 semblent être formés en quantités non négligeables. Ces métabolites n'ayant été détectés qu'aux faibles concentrations d'exposition n'ont pas fait l'objet d'un calcul des paramètres cinétiques.

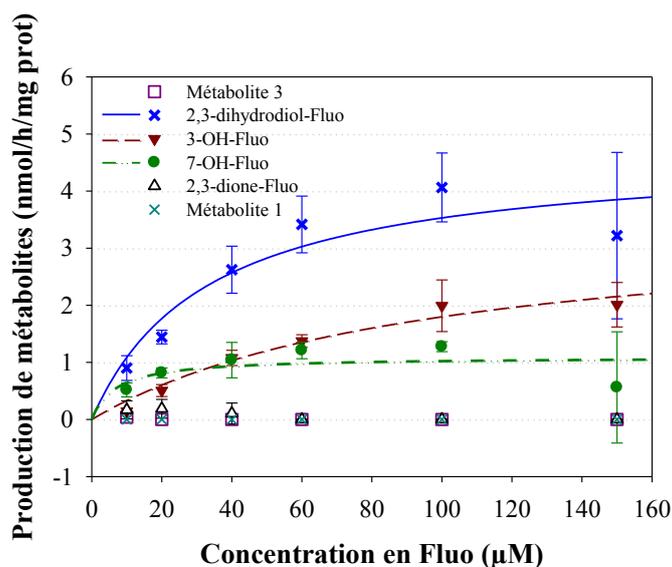


Figure 26 – Représentation de Michaelis-Menten de la production des métabolites majoritaires du Fluo.

Tableau 18 – Paramètres cinétiques des métabolites du Fluo (V_m est exprimé en nmole de métabolite produit par h et par mg de protéines microsomales ; K_m est exprimé en μM).

	2,3-dihydrodiol-Fluo	3-OH-Fluo	7-OH-Fluo
V_m	4,70	3,56	1,09
K_m	33,24	97,92	6,948

Ces résultats démontrent la capacité des microsomes de sole à métaboliser le Fluo en quantités importantes. La concentration d'exposition pour laquelle la quantité de métabolites formés est maximale a été déterminée à 100 μM . A cette concentration, le rendement de métabolisation du Fluo est de 29,32 % et est de ce fait très supérieur à celui du BaP (6 %). Les métabolites majoritairement formés pourraient être le 2,3-dihydrodiol-Fluo (54 % en moyenne) et les métabolites monohydroxylés 3-OH-Fluo et 7-OH-Fluo (22 % et 21% respectivement en moyenne), tandis que le métabolite représentant probablement la 2,3-dione-Fluo (3 % en moyenne) est détecté uniquement pour les plus faibles concentrations d'exposition. Ces résultats suggèrent que la métabolisation du Fluo se fait par des voies similaires à celles du BaP, et de la même façon que chez les vertébrés supérieurs. En effet, la production majoritaire du 2,3-dihydrodiol-Fluo et du 3-OH-Fluo a déjà été décrite chez le rat (Babson et al., 1986a) ou chez l'homme (Day et al., 1992). Parmi les métabolites détectés mais non identifiés, certains pourraient être des métabolites nucléophiles comme les 2,3-diol-1,10b-époxydes du Fluo. Chez les vertébrés supérieurs, ces métabolites provenant du 2,3-dihydrodiol-Fluo sont capables de générer des adduits à l'ADN (Babson et al., 1986b; Rastetter et al., 1982). De même que pour le BaP, la formation majoritaire du 2,3-dihydrodiol-Fluo pourrait entraîner la formation du diol-époxyde-Fluo. Des analyses en spectrométrie de masse seraient nécessaires afin de valider l'identification des métabolites présumés, et de caractériser les métabolites produits non identifiés.

3.2. Résultats obtenus en UPLC-MS/MS chez la sole et la limande

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont fait l'objet d'une publication (Article 2, pages 76-95) soumise dans le journal *Comparative Biochemistry and physiology*.

Résumé de l'article 2 (pages 76-95)

Le but de cette étude était de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes de biotransformation de deux HAP, le BaP et le Fluo, chez deux espèces de poissons plats, la sole et la limande. Bien que le Fluo soit un des HAP les plus abondants dans l'alimentation humaine et dans le milieu marin, ses mécanismes de bioactivation sont très peu connus chez les poissons. Des expositions de microsomes hépatiques de sole commune (*Solea solea*) et de limande (*Limanda limanda*) ont été réalisées. Après exposition au BaP ou au Fluo, certains des métabolites produits ont été quantifiés par l'utilisation d'une nouvelle méthode sensible, basée sur de la chromatographie liquide ultra-pression couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS). Grâce à cette méthode, les taux de biotransformation et la part relative de chaque famille de métabolites ont pu être déterminés chez la sole et chez la limande. Les profils métaboliques observés chez les deux espèces étaient très proches bien que les rendements de biotransformation soient différents. Quelque soit le HAP considéré, les dihydrodiols et les phénols sont formés majoritairement, tandis que les quinones sont formées en très faibles quantités.

Article 2 – Quantification of Benzo[a]pyrene and Fluoranthene metabolites produced in vitro by sole (*Solea solea*) and dab (*Limanda limanda*) microsomes: Application of a sensitive UPLC MS/MS method

Submitted in Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology Toxicology and Endocrinology, december 2009

N. Wessel ^a, M. Le Dû-Lacoste ^{b,c}, H. Budzinski ^{b,c}, T. Burgeot ^a, F. Akcha ^{a*}

^aIfremer, Department of Biogeochemistry and Ecotoxicology, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes Cedex 03, France

^bUniversité de Bordeaux 1, UMR 5255, ISM-LPTC, 351 cours de la Libération, Talence F-33405, France

^cCNRS, UMR 5255, ISM-LPTC, Talence F-33405, France

* Corresponding author :

Farida Akcha

Ifremer, Department of Biogeochemistry and Ecotoxicology, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes Cedex 03, France

Tel : 33 2 40 37 42 08

Fax : 33 2 40 37 42 41

Mail : fakcha@ifremer.fr

Abstract

The aim of this study was to contribute to a better understanding of the biotransformation pathways of two PAHs, benzo[a]pyrene (BaP), a model genotoxicant, and fluoranthene (Fluo), in two flatfish species. Despite fluoranthene being one of the most abundant PAHs in food and in the environment, its metabolic activation pathways are almost unknown in fish. Exposures were conducted *in vitro* by using microsomal fractions of the common sole *Solea solea*, and dab *Limanda limanda*. Following exposure to BaP or Fluo, the metabolites produced were quantified by applying a novel sensitive method based on Ultra Pressure Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry (UPLC MS/MS). Using this method, the biotransformation rates and the relative contribution of each detected metabolite were determined in sole and dab. The metabolic patterns observed in both species were much alike. Whatever the PAH, dihydrodiols and phenols were predominant, while quinones were produced in very small amounts. The BaP and Fluo profile showed similarities despite certain differences being observed in the biotransformation rates between the two species. These results suggest that the metabolic activation pathways of PAHs in flatfish are similar to those observed in higher vertebrates.

Key words: PAH, metabolites, sole, dab, UPLC MS/MS, biotransformation

Abbreviations

BaP	Benzo[a]pyrene
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
ESI	Electrospray Ionisation
Fluo	Fluoranthene
GC	Gas Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
JAMP	Joint Assessment Monitoring Programme
MS	Mass Spectrometry
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
SPE	Solid Phase Extraction
UPLC	Ultra Pressure Liquid Chromatography

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous hydrophobic contaminants of freshwater and marine compartments. Despite being among the most widely studied organic pollutants in environmental toxicology and chemistry, PAHs are still of great environmental concern given their toxicity and their remaining sources into the marine environment. Depending on their hydrophobicity, the bioavailability of PAHs can be attributed to passive diffusion from the aqueous dissolved phase and to the particulate matter where they can attain high concentrations (Cailleaud et al., 2009). Following absorption, PAHs are biotransformed by enzymatic processes in order to produce more water soluble compounds, facilitating biliary and urinary excretion (Meador et al., 2008; Van der Oost et al., 2003). Biotransformation leads to the production of different metabolites that in certain cases may be responsible for the toxic effects of the parent compound, such as in the case of genotoxicity (Akcha et al., 2003; Xue and Warshawsky, 2005).

With the aim of better assessing the risks associated with the presence of PAHs in the aquatic environment, it is necessary to study the fate of these PAHs within the organisms. The genotoxicity of PAHs has been well studied in marine organisms (Akcha et al., 2000; Willett et al., 2001), however there is still little data concerning their metabolic profiles in fish.

In the last 30 years, the identification and quantification of PAH metabolites have been meticulously investigated. Recently, Zhu et al. (2008) applied a new method using Ultra Pressure Liquid Chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC MS) in order to separately quantify BaP metabolites in fish bile. This method provides good resolution, rapid analysis and improved detection sensitivity.

In this paper, two PAH compounds, benzo[a]pyrene (BaP) and fluoranthene (Fluo) were selected for metabolism studies in sole (*Solea solea*) and dab (*Limanda limanda*). Due to their toxicity, both these PAHs feature on the list of the 33 priority pollutants of the European Water Framework Directive (2000/60/CE), and are two of the 16 priority monitored PAHs of the United States Environmental Protection Agency. BaP is a model genotoxicant for chemical carcinogenesis studies whose metabolic activation pathways have been widely investigated in higher vertebrates (Honey et al., 2000; Jiang et al., 2007), but to a lesser extent in fish. Despite Fluo being one of the most abundant PAHs in human food and in the environment, its bioactivation pathways are almost unknown and its genotoxicity has not been widely assessed. Fluo has a different chemical structure than BaP, and has no Bay region. The potential genotoxicity of Fluo could thus imply different bioactivation pathways to the most described diol-epoxide pathway (Kazunga et al., 2001).

Sole and dab are identified as sentinel species for the biomonitoring of the marine environment by the Joint Assessment Monitoring Programme (JAMP-OSPAR, 2009) in the North-East Atlantic. They are benthic species living in direct contact with sediments, known to be a sink for hydrophobic pollutants (Cachot et al., 2006). In the case of sole, the location of nurseries close to coastal area and estuaries, makes this species all the more sensitive to pollutants, due to the contribution of river discharge in sediment PAH contamination (Witt

and Trost, 1999). In this study, exposures were performed upon fish liver microsomes, which are subcellular fractions consisting of fragmented endoplasmic reticulum containing drug metabolizing enzymes, in order to generate BaP and Fluo metabolites. Some of the metabolites produced were identified by applying a novel sensitive method based on UPLC MS/MS recently developed by Le Dû-Lacoste (2008). The solid phase extraction of the PAH metabolites was adapted from Mazéas and Budzinski (2005), and the quantification of these metabolites by UPLC MS/MS was adapted from Zhu et al. (2008).

2. Materials and methods

2.1 Chemicals and materials

2.1.1 Microsomal incubations

Microsomal exposures were performed in Nalgene cryogenic vials. Benzo[a]pyrene (CAS No 50-32-8, purity 97%), Fluoranthene (CAS No 206-44-0, purity 99%), β -Nicotinamide adenine dinucleoside phosphate (NADP, CAS No 1184-16-3), D-glucose-6-phosphate disodium salt hydrate (G6P, CAS No 3671-99-6), glucose-6-phosphate dehydrogenase, type IX (G6P-DH, CAS No 9001-40-5), Magnesium Chloride ($MgCl_2$, CAS No 7786-30-3), Tris base (CAS No 77-86-1), and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma Aldrich Chemicals. The Bradford reagent was purchased from Bio-Rad.

2.1.2 Metabolite measurement

4,5-dihydrodiol-BaP, 7,8-dihydrodiol-BaP, 1,6-dione-BaP, 3,6-dione-BaP, 3-OH-BaP, 9-OH-BaP, 2,3-dihydrodiol-Fluo, 2,3-dione-Fluo and 3-OH-Fluo were purchased from the National Cancer Institute Chemical Carcinogen Reference Standard Repository (Kansas City, MO, USA). 1-hydroxy pyrene-d9 was obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Cluzeau Info Labo, Sainte Foy la Grande, France). All the standards were of analytical grade (> 98%).

All the solvents used were of analytical grade (purity > 98%). Ultra gradient HPLC grade acetonitrile was obtained from VWR International (Strasbourg, France). Methanol Supersolv was provided by Merck. Formic acid and acetic acid 100% Normapur (analytical reagent grade, Scharlau) were obtained from ICS (Belin-Beliet, France). Sodium acetate trihydrate 99% (purity > 99%) was purchased from Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Deionised water was obtained with a Milli-Q system from Millipore (Molsheim, France). Two solid-phase extraction (SPE) cartridges were used: Strata-X cartridge (3 cc, 200 mg) was from Phenomenex (Le Pecq, France) and HF Bond Elut-PSA cartridge (3 cc, 500 mg) from Varian (Atlantic Labo, Eysines, France).

2.2 Fish sampling

Wild fish were used for these experiments. The dabs (*Limanda limanda*) came from the Seine estuary, close to the North West French coast (Figure 27A). The soles (*Solea solea*) were trawled in the “Pertuis Charentais”, close to the South Western French coast (Figure 27B). In accordance with the trawling fish recommendation of the JAMP-OSPAR (2009), the fish were placed in tanks containing circulating seawater in order to keep them alive prior to liver dissection. Livers were stored in liquid nitrogen prior to microsomal preparation.

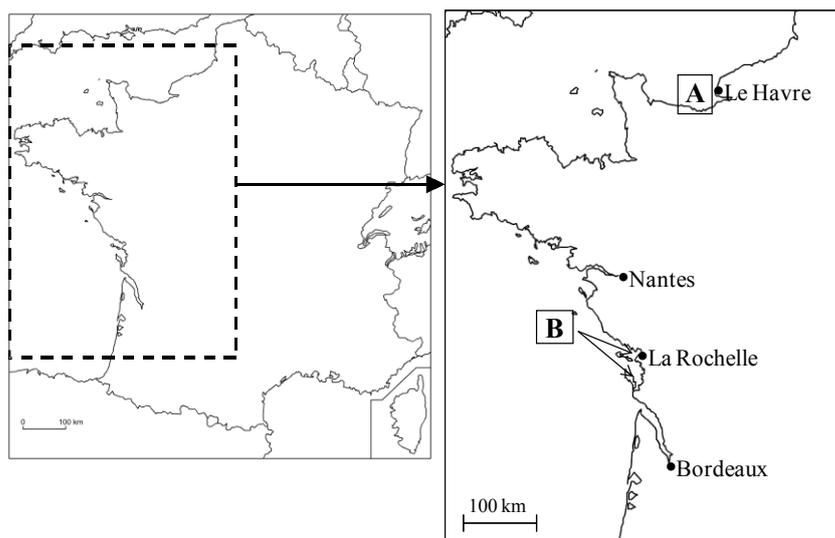


Figure 27 – France and French Atlantic coast maps. A: the Seine bay; B: the Pertuis Charentais.

2.3 Microsome preparation

Fish livers were thawed in ice and homogenized using a motor-driven glass potter homogenizer in a phosphate buffer (K_2HPO_4/KH_2PO_4 100 mM, pH 7.4, 4°C; w/v=1/5) according to the method described by Stagg and MacIntosh (1998). Homogenates were centrifuged for 15 min at 9,000 g at 4°C. The supernatants were recovered and ultracentrifuged at 105,000 g for 60 min at 4°C. Supernatants were discarded and microsomal pellets were resuspended in phosphate buffer solution with glycerol (K_2HPO_4/KH_2PO_4 100 mM, EDTA 1 mM, glycerol 20%). The protein concentration of each sample was measured by a colorimetric method (Bradford, 1976) using Bio-Rad protein assay reagent (absorbance at 595 nm), and samples were stored in liquid nitrogen prior to the experiments.

2.4 Microsomal incubation

Different samples were pooled to make up 3 pools of microsomes. The protein concentration of each pool was measured as described previously. Each pool was used as one exposure replicate. Incubations were performed in closed cryogenic vials. For each replicate, 1 mg of microsomes was exposed in a reactional medium made of 50 mM Tris-HCl, 5 mM $MgCl_2$ (pH 7.4) buffer solution, enriched with 1 mM of NADP, 5 mM of G6P, and 1 U of G6P-DH, and known amounts of BaP and Fluo were dissolved in DMSO so that the solvent concentration in the medium was 0.5%. The final volume of each sample was adjusted to 1 mL with incubation buffer.

In a first set of experiments, microsomal incubations were performed in order to check for a possible saturation in metabolite production. The microsomal fractions were exposed to both PAHs at a range of concentrations from 10 to 150 μM , according to the method described by Perdu et al., 1993. Microsomes were exposed for 1 hr at 29°C, with agitation by vortex every 10 min. At the end of the incubation period, the reaction was halted by plunging the samples in liquid nitrogen, where they were stored prior to analyses.

In a second set of experiments, the time-production of BaP and Fluo metabolites was studied by exposing the microsomes to the highest tested concentration previously determined as the concentration for which the metabolite production was maximum. These concentrations were respectively 40 and 100 μM for BaP and Fluo. Incubations were performed exactly as described previously. The reaction was halted at different times of exposure from 10 to 80 min for sole and from 10 to 60 min for dab by plunging the samples in liquid nitrogen where they were stored prior to analyses.

2.5 Metabolite identification and quantification

The metabolite analyses were performed using the method described by Le Dû-Lacoste (2008). The main steps of this method are briefly described hereafter.

2.5.1 Metabolite extraction: Solid Phase Extraction

Samples were rapidly defrosted by sonication. The weighted samples (100 μL of microsome solution) were homogenized in 2 mL of sodium acetate buffer, pH 5.0. Metabolites were extracted by solid phase extraction (SPE) according to a protocol adapted from Mazéas and Budzinski (2005) using strata X cartridges. Twenty microliters of 1-hydroxypyrene-d9 (0.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$) used as an internal standard was added to the sample. Extracts were reduced to dryness under nitrogen stream and redissolved in 1 ml methanol/methylene chloride mixture (20/80, v/v) before purification.

2.5.2 Metabolite purification

Solid-phase HF PSA Varian cartridges preconditioned with 2.5 ml methanol/methylene chloride (20/80, v/v) were used for the purification stage. Extracts were finally reduced to dryness under a nitrogen stream and re-dissolved in 100 μl acetonitrile. Finally the extracts were stored at -20°C until injection.

2.5.3 Metabolite quantification

The UPLC was performed on a Waters ACQUITY UPLC™ system (Milford, MA, USA) fitted with a binary solvent delivery manager, and a sample manager. The UPLC separation was performed on a Waters ACQUITY BEH™ C₁₈ column (1.7 μm , 2.1 mm x 150 mm) maintained at 30°C , and a 0.2 μm precolumn filter (ACQUITY UPLC™ stainless steel in-line filter). For each sample, 10 μl dissolved in acetonitrile was injected. The mobile phase used was a mixture of 0.1 % of formic acid in acetonitrile (A) and 0.1 % of formic acid in Milli-Q water (B) with the following multi-step gradient: 0-2 min: 40/60 (A/B, v/v); 2-6 min: 40/60 (A/B, v/v) to 80/20 (A/B, v/v); 6-8 min: 80/20 (A/B, v/v) to 40/60 (A/B, v/v); 8-10 min: 40/60 (A/B, v/v) at a flow rate of $0.40 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Total run time was 10 min per sample.

MS measurement was performed on a Waters Micromass® Quattro Premier™ tandem quadrupole mass spectrometer (Manchester, UK) fitted with an electrospray ionization (ESI) source.

Individual stock solutions of hydroxylated metabolites ($100 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) and internal standard ($50 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) were prepared in acetonitrile. The methodological detection limits of all the quantified metabolites were below $0.5 \text{ pmole per } \mu\text{g}$ of biological matrix.

3. Results and discussion

3.1 Benzo[a]pyrene metabolism

In this study, the applied UPLC MS/MS method made it possible to quantify several kind of BaP metabolites: the 7,8-dihydro-epoxide-BaP, the sum of OH-BaP, the sum of dihydrodiol-BaP and the sum of dione-BaP. For the last three types of metabolites, the UPLC MS/MS method was unable to discriminate the different metabolites.

Following a 1 hr incubation of microsomes to a range of BaP concentrations from 10 to $150 \mu\text{M}$, the metabolic profiles obtained for sole (Figure 28A) and dab (Figure 28B) showed certain similarities. For both species, the maximum level of metabolite production seemed to be obtained from a BaP concentration of $40 \mu\text{M}$. At this concentration, the dihydrodiols and the phenols were the major metabolites produced (35 and 30% for dihydrodiols, and 48 and 53% for OH-BaP respectively for sole and dab). For both species, the quinones were formed at a higher level (11 and 12% for sole and dab respectively) than the 7,8-dihydro-epoxide-BaP (6 and 5%).

These results are in accordance with the data concerning PAH metabolism in fish and in higher vertebrates. In most studies conducted in higher vertebrates, the major metabolites quantified following exposure to BaP are dihydrodiols and 3-OH-BaP (Jiang et al., 2007; Pandey et al., 2006).

In fish, some *in vitro* and *in vivo* studies have investigated the metabolism of BaP and most of them show similarity with the pathways previously described in rodents. Varanasi and Gmur (1980) first described the contribution of several metabolites produced *in vitro* by S9 fraction of starry flounder and coho salmon. The authors demonstrated a major production of dihydrodiols for both species. Phenols were also quantified at high levels, while quinones were produced at low levels. Very similar results were obtained following exposure of hepatic microsomes of flounder (Lemaire et al., 1996) and English sole (Nishimoto and Varanasi, 1985) to BaP. In the latter study, the major metabolite produced in the English sole was 3-OH-BaP, followed by 7,8-dihydrodiol-BaP, 9,10-dihydrodiol-BaP, 1-OH-BaP, and quinones. Contrary to this, following *in vitro* exposure of brown bullhead microsomes, quinones were quantified as the major metabolites being produced (Pangrekar et al., 1995). During *in vivo* studies, metabolic patterns are similar to those observed *in vitro*. In trout or dab, a major production of dihydrodiols and/or phenols was observed in the bile of fish following intraperitoneal injection of BaP (Barnhill et al., 2003 ; Van Schanke et al., 2001).

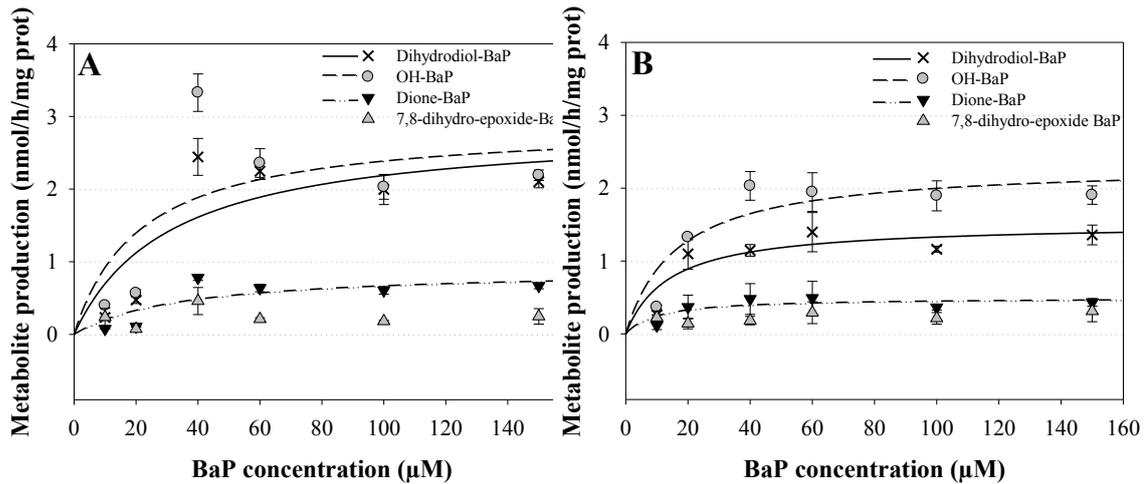


Figure 28 – Metabolite production by sole (A) and dab (B) microsomes exposed to BaP for 1 hr.

The relative part of each kind of metabolite is known to evolve during the time-course of exposure (Telli-Karakoç et al., 2002; Wang et al., 2008). During our study, the time-course production of BaP metabolites was monitored. Following respectively 80 and 60 min exposure of sole and dab microsomes to BaP at its apparent saturation concentration (40 µM), the relative time-course contribution of each detected metabolite followed the same pattern in sole (Figure 29A) as in dab (Figure 29B). In sole, metabolite production attained its maximum level following 60 min of incubation. In dab, exposures were performed for 60 min, and no plateau could be observed. The profile of total metabolite production followed the same trend for both species, which suggests that a plateau may be observed at 80 min in dab as in sole. The rate of OH-BaP was stable during the entire duration of exposure, whereas the rate of quinones decreased from 0 to 10 min of exposure, and then stabilized. For both species, the maximum contribution of dihydrodiols was about 50%.

The relative time-course production of BaP metabolites has already been investigated *in vivo* in different fish species. Dihydrodiols appear to be predominant in the first part of the exposure, while 3-OH-BaP appears later, and becomes the largest produced metabolite (Telli-Karakoç et al., 2002; Wang et al., 2008). The early high production of dihydrodiols has also been demonstrated in the early life stages of medaka (Hornung et al., 2007).

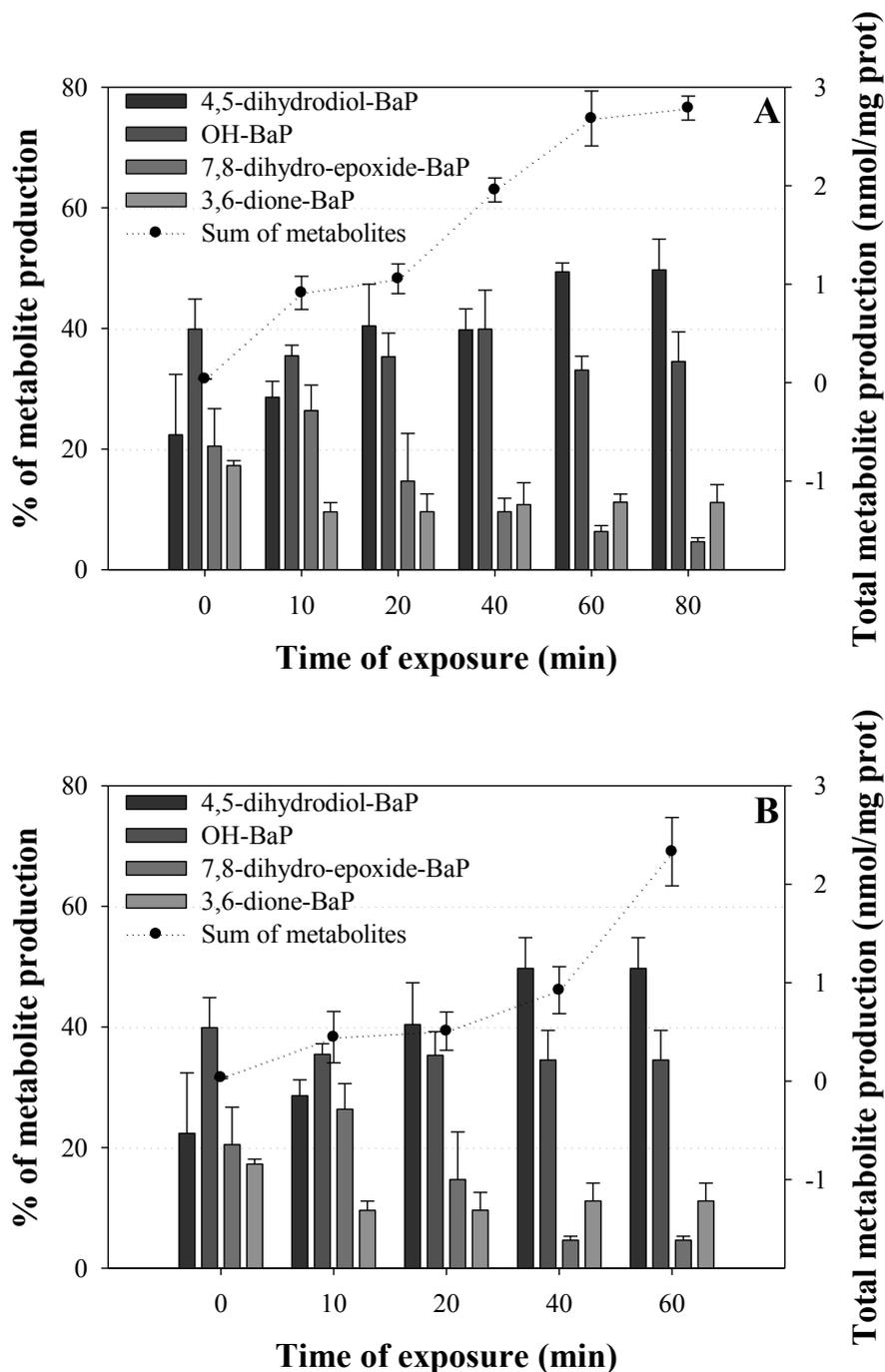


Figure 29 – Time-course production of BaP metabolites produced by sole (A) and dab (B) microsomes (Error bars denote standard deviation). Vertical bars denote the relative part of each metabolite quantified (left axis), and the scatter plot line (right axis) denotes the total metabolite production in nmol of metabolites produced per mg of microsomal proteins.

The metabolism of BaP is well established in higher vertebrates, for which three major activation pathways are described in rodents: the diol-epoxide, the *o*-quinones, and the radical cation pathways (Figure 30) (Akcha et al., 2003; Xue and Warshawsky, 2005). The diol-epoxide pathway, mediated by CYP450 enzymes leads to the production of some dihydro-epoxides (Jacob and Grimmer, 1996), which are hydrolysed by the epoxide hydrolase (EH) to dihydrodiols (Borgen et al., 1973) or auto-oxidized into phenols (Jiang et al., 2007). Phenols can be oxidized to form quinones. Among the produced dihydrodiols, 7,8-dihydrodiol can

undergo secondary CYP450 monooxygenation to yield an ultimate carcinogen, i.e., the 7,8-BaP-diol-epoxide (BPDE) (Park et al., 2005). During this latest step, the aldo-keto-reductase (AKR) enzymes can compete with the CYP450 enzymes to oxidize the 7,8-dihydrodiol into the corresponding active and redox-active *o*-quinone (Guengerich, 2000). The third BaP activation pathway involves the formation of BaP-radical cations, catalysed by CYP450 peroxidases (Penning et al., 1999), and leads to the production of several quinones (Burdick et al., 2003; Jiang et al., 2007). Despite the fact that certain metabolites produced will be conjugated and excreted, some of them are highly reactive and are able to bind to DNA (Xue and Warshawski, 2005). Moreover, the formation of several metabolites involves the production of reactive oxygen species (ROS) (Douki et al., 2008). In this study, the major formation of dihydrodiols and OH-BaP by sole and dab microsomes, suggests that the metabolic activation pathways of BaP in sole and dab are similar to higher vertebrates.

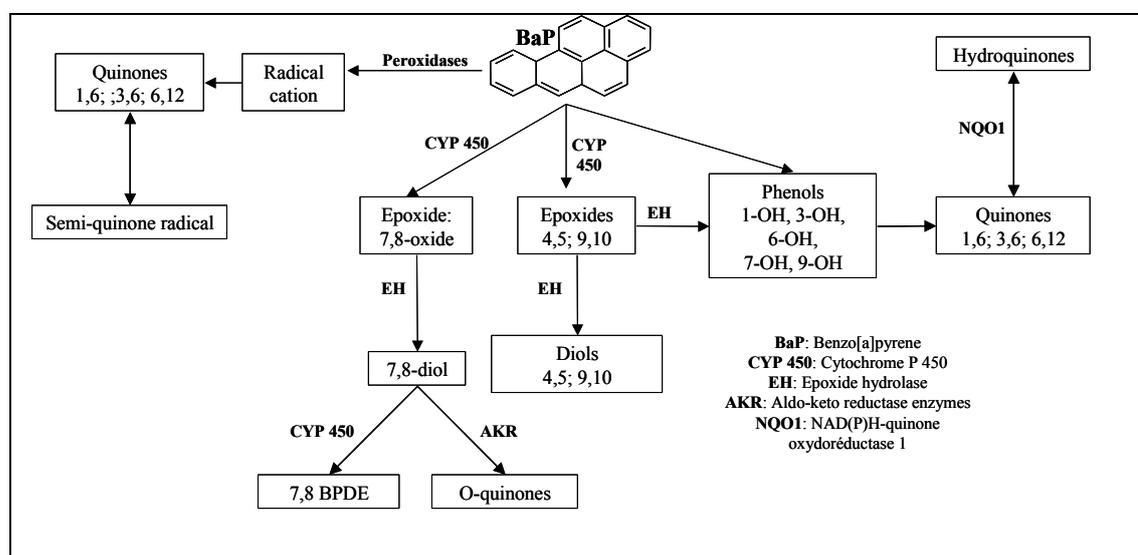


Figure 30 – Overview of the phase I biotransformation pathways of BaP in higher vertebrates and of enzymes involved in these reactions.

3.2 Fluoranthene metabolism

In the present study, the results obtained for fluoranthene metabolism are similar to those observed for BaP. Three kinds of Fluo metabolites were quantified: 2,3-dihydrodiol-Fluo, 2,3-dione-Fluo, and OH-Fluo. As for BaP, the metabolic profiles of Fluo obtained in sole (Figure 31A) and dab (Figure 31B) were very similar. They revealed similarities to those obtained for the BaP: 2,3-dihydrodiol-Fluo and OH-Fluo were formed at higher levels than 2,3-dione-Fluo. The maximum production was obtained for an exposure concentration of 100 μ M in sole and 60 μ M in dab. At these concentrations, the relative part of dihydrodiols reached 58% and 57%, and the relative part of phenols reached 40% and 26% in sole and dab microsomes respectively. In sole, the level of Fluo metabolites continued to increase during the 80 min of incubation, whereas in dab, a saturation in Fluo metabolite production was observed from 40 min of incubation. In sole (Figure 32A), OH-Fluo was the most produced metabolite; however its rate decreased slowly with time, whereas dihydrodiol production increased. In dab microsomes (Figure 32B) dihydrodiols were predominantly formed from the outset of the

experiment until the moment of 20 min exposure when they started to decrease. At the end of the exposure, the final rates of dihydrodiols and OH-Fluo were equivalent in both species.

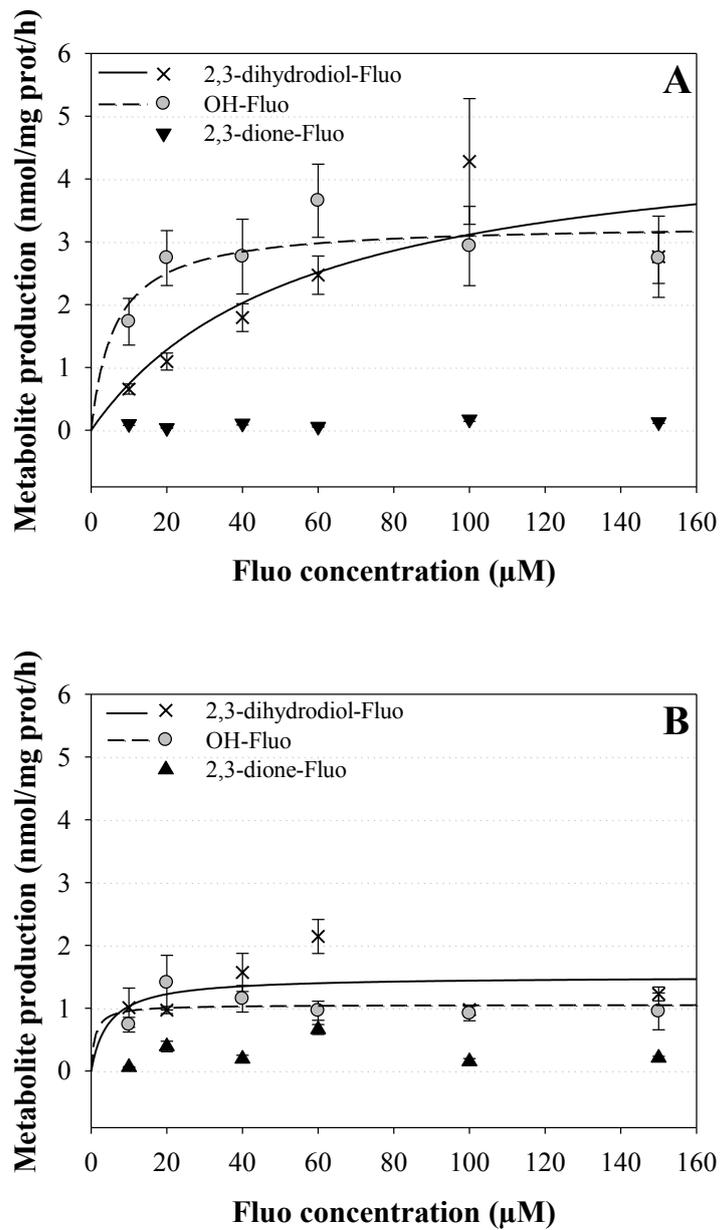


Figure 31 – Metabolite production by sole (A) and dab (B) microsomes exposed to Fluo for 1 hr.

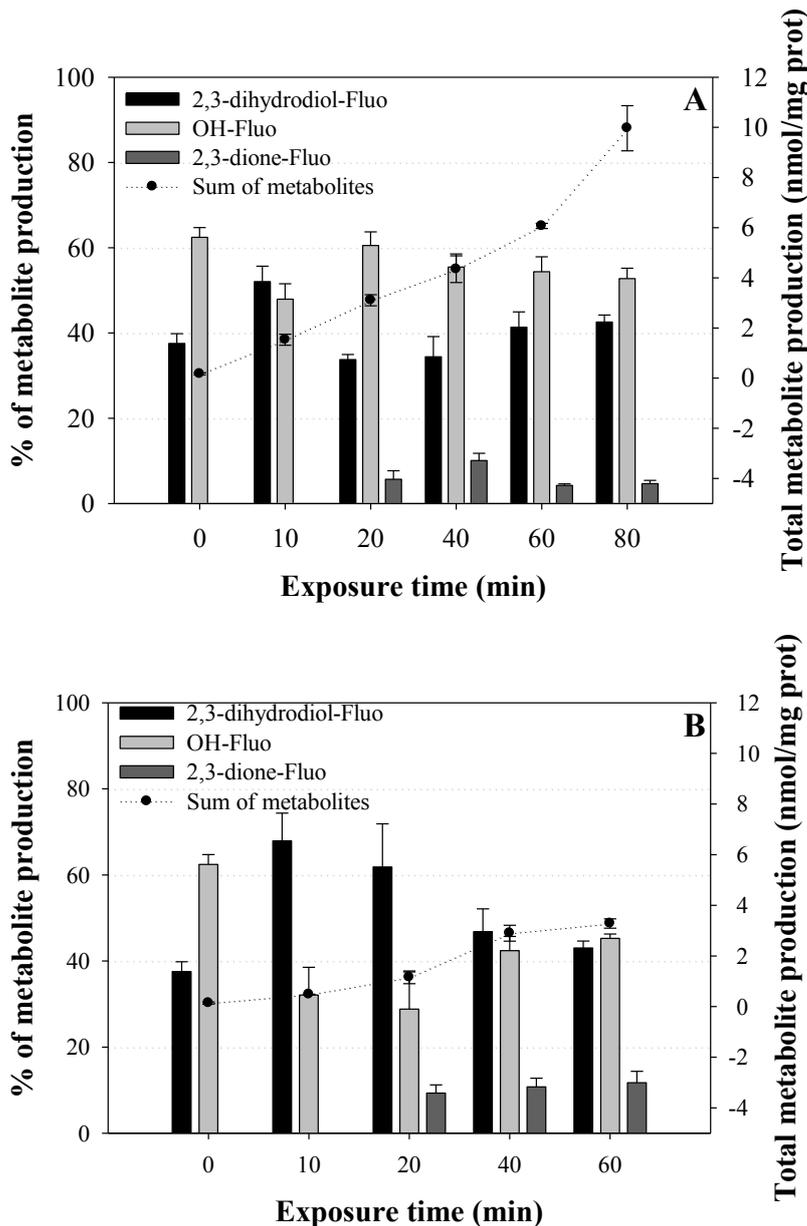


Figure 32 – Time-course production of Fluo metabolites produced by sole (A) and dab (B) microsomes (Error bars denote standard deviation). Vertical bars denote the relative part of each metabolite quantified (left axis), and the scatter plot line (right axis) denotes the total metabolite production in nmol of metabolites produced per mg of microsomal proteins.

Fluoranthene metabolism has not been as well investigated as for BaP. In higher vertebrates, the Fluo biotransformation pathways seem to occur in a similar pattern to BaP. In rodent liver microsomes, Fluo is oxidised predominantly at the 2,3-position by epoxide hydrolase activity, leading to 2,3-dihydrodiol-Fluo. In humans and rodents, 2,3-dihydrodiol-Fluo is considered as one of the major metabolites, contributing to 70-90% of the total metabolites produced in humans (Day et al., 1992) and 29-43% in rodents (Babson et al., 1986a). This latter metabolite is oxidised to the corresponding *syn* and *anti* 2,3-diol-1,10b-epoxides (Walker et al., 2006), a direct acting mutagen that reacts with DNA to form adducts (Babson et al., 1986b; Rastetter et al., 1982). In rodent liver microsomes, this production is accompanied by high amounts of the trans-2,3-dihydroxy-1,10-epoxy-1,2,3,10b-tetrahydrofluoranthene (2,3-DFLA) (Walker et al., 2006). Other metabolites are produced in high amounts in rats such as the mutagenic 2,3-

dione-Fluo, and the non-mutagenic 3-OH-Fluo (Babson et al., 1986a). 1-OH-Fluo and 8-OH-Fluo metabolites have also been identified, demonstrating the possibility that Fluo is oxidized at other positions than the 2,3-position. Two corresponding dihydrodiols have been identified: 1,10b-dihydrodiolFluo and 7,8-dihydrodiol-Fluo (Babson et al., 1986a).

In fish, there is a paucity of data concerning the metabolism of Fluo. In sole, four major glucuronide conjugate metabolites, contributing to 75% of biliary radioactivity, have been identified following intraperitoneal injection to radiolabeled Fluo (Hillenweck et al., 2008). These conjugate metabolites are 7-O-glucuronide-Fluo, 8-O-glucuronide-Fluo, trans-2,3-dihydro-3-hydroxy-2-O-glucuronide-Fluo, and cis-2,3-dihydro-2-hydroxy-3-O-glucuronide-Fluo. They have been identified as resulting to the conjugation of some dihydrodiols, phenols and dihydroxy-metabolites of Fluo to the glucuronic acid. These results demonstrated the major production of 2,3-dihydrodiols and phenols.

Despite the differences in conformation between BaP and Fluo, the results obtained in this paper suggest an activation of fluoranthene in flatfish species by similar pathways to those of BaP.

3.3 Inter-species comparison

Differences were observed between the metabolic activation rates in the two species, as shown by the differences of the kinetic parameters values between both species (Table 19). Dab seems to produce half the metabolites that sole produce, whatever the studied PAHs. *In vitro*, it has already been demonstrated in higher vertebrates that the total microsomal production of BaP and Fluo metabolites is species-dependent (Smith et al., 2007; Walker et al., 2006). Moreover, in fish species, for similar total metabolic production, the relative contribution of each type of metabolite produced can appear as species-dependent. Differences have been observed in BaP metabolic profiles between brown bullhead and mirror carp (Sikka et al., 1990; Steward et al., 1989). Differences have also been observed between species in the contents of biliary PAH metabolites. In the Baltic Sea, it appears that the biliary PAH metabolites contents in perch and in eelpout are at similar level, whereas in flounder the levels are lower (Vuorinen et al., 2006).

Table 19 – Kinetic parameters for sole and dab microsomes exposed to BaP and Fluo for 1 hr to a range of concentrations from 10 to 150 μM . The V_m and K_m parameters are respectively expressed in nmol/h/mg prot and in μM .

	BaP			
	Sole		Dab	
	V_m	K_m	V_m	K_m
Dihydrodiol-BaP	2.87	31.21	1.51	14.01
OH-BaP	2.90	21.55	2.32	16.32
Dione-BaP	0.90	34.23	0.50	10.11

	Fluo			
	Sole		Dab	
	V_m	K_m	V_m	K_m
2,3-Dihydrodiol-Fluo	4.86	55.87	1.51	4.60
OH-Fluo	3.29	6.324	1.06	1.03

These differences can be explained by the existence of inter-species variations in enzyme activities such as for ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) (Förlin et al., 1995). Such differences could also be explained by variations in the constitutive levels of metabolizing enzymes as a result of physiological factors (age, sex), environment and diet (Guengerich, 1997, Lange et al., 1998, Solé et al., 2009). As an example, in individuals living in polluted areas, enzymes involved in biotransformation can be induced and thus display higher activity levels (Honey et al., 2000; Wills et al., 2009).

It could be useful to perform new experiments on microsomes from sole and dab from each site, and trawled at the same period in order to determine whether the observed differences in metabolism are due to the site, the species, the physiological state of the fish or a combination of many factors.

4. Conclusions

In summary, the UPLC MS/MS method applied made it possible to sensitively quantify four types of BaP metabolites and three Fluo metabolites. The results obtained in this study demonstrated the ability of sole and dab liver microsomes to biotransform BaP and Fluo through pathways similar to those observed in higher vertebrates, and made it possible to determine some saturation concentrations and kinetic parameters. Regardless of the PAH under study, dihydrodiols and phenols were the most produced kinds of metabolite. Although the biotransformation rates of sole were twice as high as those of dab, the metabolic patterns observed were similar between each species. Some of the most produced metabolites are the precursors of genotoxic metabolites. It could be useful to quantify the genotoxic metabolites. Moreover, the use of *in vitro* cell exposures to PAH metabolites could enable the main

bioactivation pathways of PAH to be determined by the measurement of the genotoxic potential of each metabolite.

Acknowledgements

The authors acknowledge the French Research Institute for Sea Exploitation (Ifremer), the Région Pays de la Loire, and the Région Aquitaine (ORQUE program) for the financial support of this work.

References

- Akcha, F., Burgeot, T., Narbonne, J. F., Garrigues, P. 2003. Metabolic Activation of PAHs: Role of DNA Adduct Formation in Induced Carcinogenesis, in: Douben, P.E.T. (Eds.), PAHs: An ecotoxicological perspective. Wiley, Chichester, West Sussex, UK, pp. 65-79.
- Akcha, F., Burgeot, T., Budzinski, H., Pfohl-Leszkowicz, A., Narbonne, J. F. 2000. Induction and elimination of bulky benzo[a]pyrene-related DNA adducts and 8 oxodGuo in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed in vivo to B[a]P contaminated feed. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 205, 195-206, 10.3354/meps205195.
- Babson, J. R., Russo-Rodriguez, S. E., Wattley, R. V. 1986a. Microsomal activation of fluoranthene to mutagenic metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85, 355-366.
- Babson, J. R., Russo-Rodriguez, S. E., Rastetter, W. H., Wogan, G. N. 1986b. In vitro DNA-binding of microsomally-activated fluoranthene: evidence that the major product is a fluoranthene N2-deoxyguanosine adduct. *Carcinogenesis* 7, 859-865.
- Barnhill, M. L., Rosemond, M. V. M., Curtis, L. R. 2003. Dieldrin stimulates biliary excretion of 14C-benzo[a]pyrene polar metabolites but does not change the biliary metabolite profile in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Toxicol. Sci.* 75, 249-259.
- Borgen, A., Darvey, H., Castagnoli, N., Crocker, T. T., Rasmussen, R. E., Wang, I. Y. 1973. Metabolic conversion of benzo[a]pyrene by Syrian hamster liver microsomes and binding of metabolites to deoxyribonucleic acid. *J. Med. Chem.* 16, 502-506.
- Bradford, M. 1976. A rapid method quantification of protein utilising the principle dried binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-264.
- Burdick, A. D., Davis Ii, J. W., Liu, K. J., Hudson, L. G., Shi, H., Monske, M. L., Burchiel, S. W. 2003. Benzo[a]pyrene Quinones Increase Cell Proliferation, Generate Reactive Oxygen Species, and Transactivate the Epidermal Growth Factor Receptor in Breast Epithelial Cells. *Cancer Res.* 63, 7825-7833.
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M. H., Pottier, D., Budzinski, H. 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary Normandy, France. *Aquat. Toxicol.* 79, 257-267.

- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Peluhet, L., LeMenach, K., Souissi, S., Budzinski, H. 2009. Tidal influence on the distribution of hydrophobic organic contaminants in the Seine Estuary and biomarker responses on the copepod *Eurytemora affinis*. *Environ. Pollut.* 157, 64-71.
- Day, B. W., Sahali, Y., Hutchins, D. A., Wildschutte, M., Pastorelli, R., Nguyen, T. T., Naylor, S., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R. 1992. Fluoranthene metabolism: Human and rat liver microsomes display different stereoselective formation of the trans-2,3-dihydrodiol. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 779-786.
- Douki, T., Ksoury, Z., Marie, C., Favier, A., Ravanat, J. L., Maitre, A. 2008. Genotoxicity of combined exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and UVA - A mechanistic study. *Photochem. Photobiol.* 84, 1133-1140.
- Förlin, L., Lemaire, P., Livingstone, D. R. 1995. Comparative studies of hepatic xenobiotic metabolizing and antioxidant enzymes in different fish species. *Mar. Environ. Res.* 39, 201-204.
- Guengerich, F. P. 1997. Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chem. Biol. Intract.* 106, 161-182.
- Guengerich, F. P. 2000. Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 21, 345-351.
- Hillenweck, A., Canlet, C., Mauffret, A., Debrauwer, L., Claireaux, G., Cravedi, J. P. 2008. Characterization of biliary metabolites of fluoranthene in the common sole *Solea Solea*. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 2575-2581.
- Honey, S., O'Keefe, P., Drahushuk, A. T., Olson, J. R., Kumar, S., Sikka, H. C. 2000. Metabolism of benzo(a)pyrene by duck liver microsomes. *Comp. Biochem. and Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 126, 285-292.
- Hornung, M. W., Cook, P. M., Fitzsimmons, P. N., Kuehl, D. W., Nichols, J. W. 2007. Tissue distribution and metabolism of benzo[a]pyrene in embryonic and larval medaka *Oryzias latipes*. *Toxicol. Sci.* 100, 393-405.
- Jacob, J., Grimmer, G. 1996. Metabolism and excretion of polycyclic aromatic hydrocarbons in rat and in human. *Cent. Eur. J. Publ. Health* 4 Suppl, 33-39.
- JAMP Guidelines for contaminant-specific biological effects, 2009. OSPAR convention for the protection of the marine environment of the North-East Atlantic. 48 pp.
- Jiang, H., Gelhaus, S. L., Mangal, D., Harvey, R. G., Blair, I. A., Penning, T. M. 2007. Metabolism of benzo[a]pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography-mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1331-1341.
- Kazunga, C., Aitken, M. D., Gold, A., Sangaiah, R. 2001. Fluoranthene-2,3- and -1,5-diones are novel products from the bacterial transformation of fluoranthene. *Environ. Sci. Technol.* 35, 917-922.

- Lange, U., Saborowski, R., Siebers, D., Buchholz, F., Karbe, L. 1998. Temperature as a key factor determining the regional variability of the xenobiotic-inducible ethoxyresorufin-O-deethylase activity in the liver of dab *Limanda limanda*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55, 328–338.
- Le Dû-Lacoste, M., 2008. Etude des phénomènes de biotransformation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par les organismes aquatiques (poissons). Relation exposition-génotoxicité. Thesis ; University of Bordeaux 1, ISM-LPTC.
- Lemaire, P., Sturve, J., Förlin, L., Livingstone, D. R. 1996. Studies on aromatic hydrocarbon quinone metabolism and DT-Diaphorase function in liver of fish species. *Mar. Environ. Res.* 42, 317-321.
- Mazéas, O., Budzinski, H. 2005. Solid-phase extraction and purification for the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in fish bile. *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 985-990.
- Meador, J. P., Buzitis, J., Bravo, C. F. 2008. Using fluorescent Aromatic Compounds in bile from juvenile salmonids to predict exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 845-853.
- Nishimoto, M., Varanasi, U. 1985. Benzo[a]pyrene metabolism and DNA adduct formation mediated by English sole liver enzymes. *Biochem. Pharmacol.* 34, 263-268.
- Pandey, M. K., Yadav, S., Parmar, D., Das, M. 2006. Induction of hepatic cytochrome P450 isozymes, benzo[a]pyrene metabolism and DNA binding following exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon residues generated during repeated fish fried oil in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 213, 126-134.
- Pangrekar, J., Kandaswami, C., Kole, P., Kumar, S., Sikka, H. C. 1995. Comparative metabolism of benzo[a]pyrene, chrysene and phenanthrene by brown bullhead liver microsomes. *Mar. Environ. Res.* 39, 51-55.
- Park, J. H., Gopishetty, S., Szewczuk, L. M., Troxel, A. B., Harvey, R. G., Penning, T. M. 2005. Formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 8-oxo-dGuo by PAH o-quinones: Involvement of reactive oxygen species and copperII/copperI redox cycling. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1026-1037.
- Penning, T.M., Burczynski, M.E., Hung, C.F., McCoull, K.D., Palackal, N.T., Tsuruda, L.S. 1999. Dihydrodiol dehydrogenase and polycyclic aromatic hydrocarbons activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chem. Res. Toxicol.* 12 (1), 1-18.
- Perdu, E., Gasc, N., Cravedi, J.P., Tulliez, J. 1993. Comparative biotransformation of benzo(a)pyrene in TCDD induced chondrostei and teleost fish, in: Garrigues, P., Lamotte, M. (Eds.), Polycyclic aromatic compounds : synthesis, properties, analytical measurements, occurrence and biological effects: Proceedings of the Thirteenth Int., 3, Gordon and Breach science publishers, Yverdon, Switzerland, pp. 1111-1117.

- Rastetter, W. H., Nachbar Jr, R. B., Russo-Rodriguez, S., Wattlely, R. V., Thilly, W. G., Andon, B. M., Jorgensen, W. L., Ibrahim, M. 1982. Fluoranthene: Synthesis and mutagenicity of four diol epoxides. *J. Org. Chem.* 47, 4873-4878.
- Smith, T. L., Merry, S. T., Harris, D. L., Joe Ford, J., Ike, J., Archibong, A. E., Ramesh, A. 2007. Species-specific testicular and hepatic microsomal metabolism of benzo(a)pyrene, an ubiquitous toxicant and endocrine disruptor. *Toxicol. In vitro* 21, 753-758.
- Solé, M., Kopecka-Pilarczyk, J., Blasco, J. 2009. Pollution biomarkers in two estuarine invertebrates, *Nereis diversicolor* and *Scrobicularia plana*, from a Marsh ecosystem in SW Spain. *Environ. Int.* 35, 523-531.
- Stagg, R., McIntosh, A. 1998. Biological effects of contaminants: determination of CYP1A-dependent mono-oxygenase activity in dab by fluorimetric measurement of EROD activity. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences* 23, 16 pp.
- Steward, A. R., Zaleski, J., Gupta, R. C., Sikka, H. C. 1989. Comparative metabolism of benzo[a]pyrene and -Benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by hepatocytes isolated from two species of bottom-dwelling fish. *Mar. Environ. Res.* 28, 137-140.
- Telli-Karakoç, F., Ruddock, P. J., Bird, D. J., Hewer, A., Van Schanke, A., Phillips, D. H., Peters, L. D. 2002. Correlative changes in metabolism and DNA damage in turbot *Scophthalmus maximus* exposed to benzo[a]pyrene. *Mar. Environ. Res.* 54, 511-515.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.
- Van Schanke, A., Holtz, F., Van der Meer, J., Boon, J. P., Ariese, F., Stroomberg, G., Van den Berg, M., Everaarts, J. M. 2001. Dose- and time-dependent formation of biliary benzo[a]pyrene metabolites in the marine flatfish *Dab Limanda limanda*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1641-1647.
- Varanasi, U., Gmur, D.J. 1980. Metabolic activation and covalent binding of Benzo[a]pyrene to deoxyribonucleic acid catalysed by liver enzymes of marine fish. *Biochem. Pharmacol.* 29, 753-761.
- Vuorinen, P. J., Keinänen, M., Vuontisjärvi, H., Bar?iene, J., Broeg, K., Förlin, L., Gercken, J., Kopecka, J., Köhler, A., Parkkonen, J., Pempkowiak, J., Schiedek, D. 2006. Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. *Marine Poll. Bull.* 53, 479-487.
- Walker, S. A., Whitten, L. B., Seals, G. B., Lee, W. E., Archibong, A. E., Ramesh, A. 2006. Inter-species comparison of liver and small intestinal microsomal metabolism of fluoranthene. *Food Chem. Toxicol.* 44, 380-387.
- Wang, X. H., Hong, H. S., Mu, J. L., Lin, J. Q., Wang, S. H. 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolites in marine fishes as a specific biomarker to indicate PAH pollution in the marine coastal environment. *J. Environ. Sci. Health, Part A: Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* 43, 219-226.

- Willett, K. L., Wassenberg, D., Lienesch, L., Reichert, W., Di Giulio, R. T. 2001. In Vivo and in Vitro Inhibition of CYP1A-Dependent Activity in *Fundulus heteroclitus* by the Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Fluoranthene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 177, 264-271.
- Wills, L.P., Zhu, S., Willett, K.L., Di Giulio, R.T., 2009. Effect of CYP1A inhibition on the biotransformation of benzo[a]pyrene in two populations of *Fundulus heteroclitus* with different exposure histories. *Aquat. Toxicol.* 92, 195-201.
- Witt, G., Trost, E. 1999. Distribution and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons PAHs in sediments and fluffy layer material from the Odra river estuary. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 27, 308-315.
- Xue, W., Warshawsky, D. 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206, 73-93.
- Zhu, S., Li, L., Thornton, C., Carvalho, P., Avery, B. A., Willett, K. L. 2008. Simultaneous determination of benzo[a]pyrene and eight of its metabolites in *Fundulus heteroclitus* bile using ultra-performance liquid chromatography with mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 863, 141-149.

3.3. Comparaison des méthodes analytiques

La quantification des métabolites de HAP formés a été réalisée suivant deux approches complémentaires. En effet, si l'analyse par UPLC-MS/MS permet une quantification très sensible des métabolites formés, l'utilisation de standards reste indispensable. La détection par Radio-HPLC permet de visualiser le profil métabolique complet des HAP, sans donner d'information sur la nature des métabolites détectés. Le couplage avec la spectrométrie de masse reste nécessaire. Au cours des différentes expérimentations, les protocoles d'exposition et d'analyse utilisés présentaient certaines différences (Tableau 20).

Tableau 20 – Différences des protocoles utilisés

Méthode d'analyse	Radio-HPLC	UPLC-MS/MS
Tubes utilisés pour les incubations	Tubes corex silanisés	Cryotubes plastiques
Concentration protéines microsomaux (mg/mL)	2	1
Nature des HAP utilisés	HAP radiomarqués	HAP non radiomarqués
Durée de l'incubation (h)	2	1
Arrêt de la réaction	Méthanol et centrifugation	Congélation dans l'azote liquide
Méthode d'analyse	Radio-HPLC	UPLC-MS/MS

D'un point de vue qualitatif et semi-quantitatif, les résultats obtenus au cours des différentes expérimentations sont assez proches (Tableau 21 et Tableau 22). En effet, les concentrations en BaP et en Fluo pour lesquelles la production de métabolites est maximale sont identiques (40 μ M et 100 μ M respectivement) quelle que soit la méthode analytique. Si on considère que les métabolites détectés en Radio-HPLC sont bien les métabolites présumés, on observe dans les deux cas une production majoritaire des dihydrodiols et des phénols, par rapport à la production de quinones.

Dans le cas du Fluo, les proportions relatives des familles de métabolites calculées pour les deux méthodes sont proches. À noter cependant que la somme des métabolites n'est pas calculée de la même façon suivant la technique. En UPLC-MS/MS, elle correspond à la somme des OH-Fluo, du 2,3-dihydrodiol-Fluo et de la 2,3-dione-Fluo, tandis qu'elle correspond à la somme des 6 métabolites détectés en Radio-HPLC.

Concernant le BaP, les parts relatives des dihydrodiols et des phénols sont très proches suivant la technique analytique, bien que leur calcul ne soit pas effectué exactement de la même façon. Pour les métabolites quantifiés en UPLC-MS/MS, la part relative de chaque type de métabolite est calculée par rapport à la somme (dihydrodiols + OH-BaP + quinones + 4,5-

dihydro-époxyde-BaP). Pour les métabolites quantifiés en Radio-HPLC, elle est calculée par rapport à la somme (dihydrodiols + phénols + tétraols).

Tableau 21 – Comparaison des résultats obtenus sur différents lots de microsomes pour le Fluo.

	Radio-HPLC	UPLC-MS/MS
Concentration maximale de métabolisation (μM)	100	100
Quantité de métabolites formés (nmol/h/mg prot)	7,33	7,39
Rendement (%)	29,32	7,39
% de 2,3-dihydrodiol-Fluo	55	58
% OH-Fluo	44	40
% de 2,3-dione-Fluo	0	2

Tableau 22 – Comparaison des résultats obtenus sur différents lots de microsomes pour le BaP

	Radio-HPLC	UPLC-MS/MS
Concentration maximale de métabolisation (μM)	40	40
Quantité de métabolites formés (nmol/h/mg prot)	0,60	7,01
Rendement (%)	6,05	17,52
% de dihydrodiols	39	35
% de phénols	50	48
% de diones	?	11
% de tétraols	11	?

D'un point de vue quantitatif, les résultats concernant les quantités totales de métabolites produits et les taux de biotransformation diffèrent suivant la technique analytique.

Concernant le Fluo, bien que les profils de métabolisation et les quantités totales de métabolites soient très proches suivant la technique analytique, les taux de biotransformation sont quant à eux plus élevés en radio-HPLC (29,32%) qu'en UPLC-MS/MS (7,39%). Ceci peut être expliqué par des différences des temps d'exposition et des concentrations en microsomes apportées qui étaient deux fois plus élevés en Radio-HPLC. On observe donc un rendement quatre fois plus important en Radio-HPLC qu'en UPLC-MS/MS.

À l'opposé, dans le cas du BaP, les quantités totales de métabolites produits ainsi que les taux de biotransformation sont beaucoup plus élevés en UPLC-MS/MS qu'en Radio-HPLC. (Tableau 21). De manière à essayer de comprendre ces différences, nous avons étudié dans le cas du BaP l'influence que pouvait avoir la méthode d'arrêt de la réaction sur les niveaux de métabolites mesurés par les deux techniques.

L'hypothèse majeure retenue ciblait le mode d'arrêt de la réaction. Il est probable que l'utilisation de méthanol en Radio-HPLC précipite une partie des métabolites du BaP. Lors des injections en Radio-HPLC, la quasi-totalité de la radioactivité est détectée. La part des métabolites étant relativement faible, la légère perte de radioactivité pourrait être attribuée à une éventuelle précipitation des métabolites. Afin de tester cette hypothèse, il est apparu nécessaire de comparer pour chacune des techniques analytiques les différentes méthodes d'arrêt de la réaction.

Ces expositions ont été réalisées à l'UMR xénobiotiques de l'INRA. Pour cela, 3 pools de microsomes ont été utilisés, constituants des réplicats d'exposition (Figure 33). Chaque pool a subi d'une part une exposition au BaP froid pour analyse en UPLC-MS/MS, et d'autre part une exposition au BaP radiomarqué pour analyse en Radio-HPLC. Lors des expositions au BaP froid, deux incubations ont été réalisées par pool de microsomes. Une des incubations a été bloquée par l'utilisation de méthanol et centrifugation, tandis que la seconde a été congelée dans l'azote liquide sans méthanol ni centrifugation. Les expositions au BaP radiomarqué ont été uniquement bloquées au méthanol et centrifugation. Pour chaque série d'incubations, un témoin négatif ne contenant pas de microsomes a été réalisé.

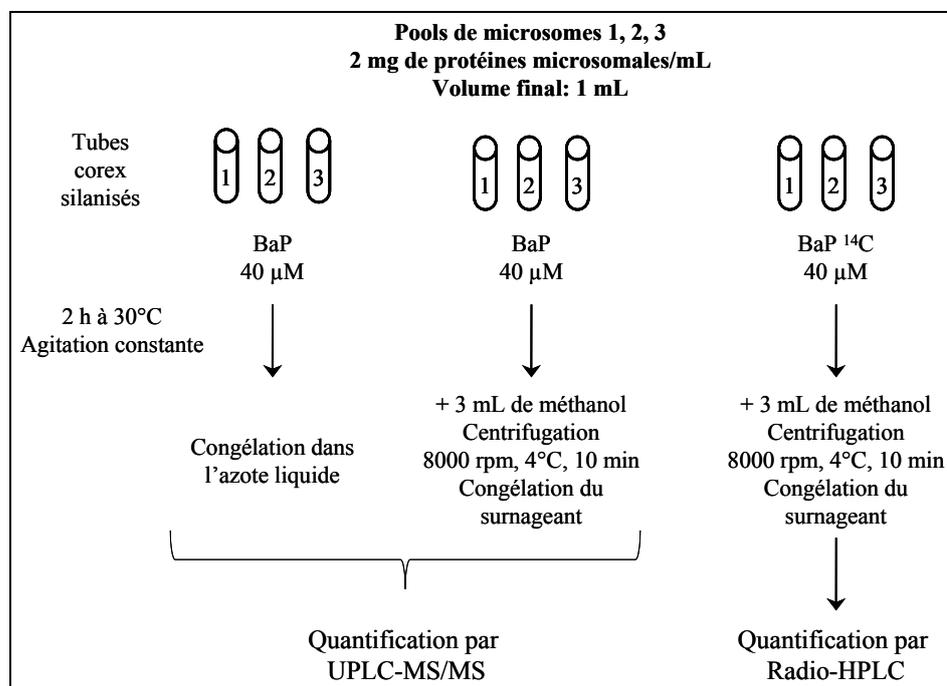


Figure 33 – Synoptique des incubations microsomiales réalisées pour l'étude de l'influence des méthodes d'arrêt de la réaction sur les niveaux de métabolites mesurés.

Pour ces incubations, seul le dosage des phénols du BaP a pu être réalisé en UPLC-MS/MS. Les résultats présentés suivant les deux techniques ne concernent donc que les métabolites

monohydroxylés du BaP (Tableau 23). Une ANOVA (Figure 34) a démontré qu'après arrêt de la réaction au méthanol, les niveaux de métabolites mesurés par les deux techniques sont similaires ($p > 0,05$). En revanche, après arrêt par congélation, les niveaux mesurés sont statistiquement différents de ceux obtenus après arrêt au méthanol, quelle que soit la technique de quantification ($p < 0,01$). La méthode d'arrêt de la réaction a donc une influence sur les niveaux de métabolites mesurés.

Après blocage par congélation, le rendement mesuré à partir des analyses en UPLC-MS/MS est très élevé. Lors de ces analyses, les échantillons n'ont pas subi de centrifugation comme c'était le cas précédemment. Par la suite, il a été possible d'évaluer la perte de métabolites due à la centrifugation pour un des pools précédemment dosé en UPLC-MS/MS. Une perte de 73 % des métabolites a été observée dans le cas de l'arrêt de la réaction par congélation, ce qui suggère le fait qu'une quantité importante de métabolites semble être restée liée aux microsomes. La somme des métabolites monohydroxylés formés et le rendement pour ce pool sont alors respectivement de 1,02 nmoles/h/mg prot et 10,2 %, ce qui reste plus élevé que les valeurs obtenues en Radio-HPLC. Ces différences ne sont pas statistiquement significatives (Figure 34), mais cette nouvelle quantification ayant été réalisée sur un seul pool de microsomes, ces résultats sont à prendre avec précaution.

Il est donc possible de confirmer que les différences observées semblent provenir en majorité de la technique d'exposition et d'arrêt de la réaction en particulier, plutôt que de la technique analytique.

Tableau 23 – Résultats obtenus concernant le dosage des phénols suivant les méthodes sur des mêmes lots de microsomes.

Exposition	BaP (40 μ M)		
	Blocage MetOH		Blocage Congélation
Arrêt de la réaction			
Technique analytique	UPLC-MS/MS	Radio-HPLC	UPLC-MS/MS
Somme métabolites (nmoles/mg/h)	0,70 \pm 0,48	0,21 \pm 0,06	4,43 \pm 0,28
Rendements	6,98	2,13	44,3

L'effet du méthanol semble nettement moins marqué pour les métabolites du Fluo. En effet, les quantités individuelles des métabolites dosés par chaque technique sont similaires. Afin de vérifier cette hypothèse, de nouvelles incubations au BaP et au Fluo suivant les différents modes d'arrêt de la réaction seraient nécessaires. De nouvelles analyses suivant les deux techniques analytiques pour chaque incubation permettraient d'étudier l'effet combiné du mode d'arrêt de la réaction et de la technique utilisée sur les niveaux de métabolites mesurés.

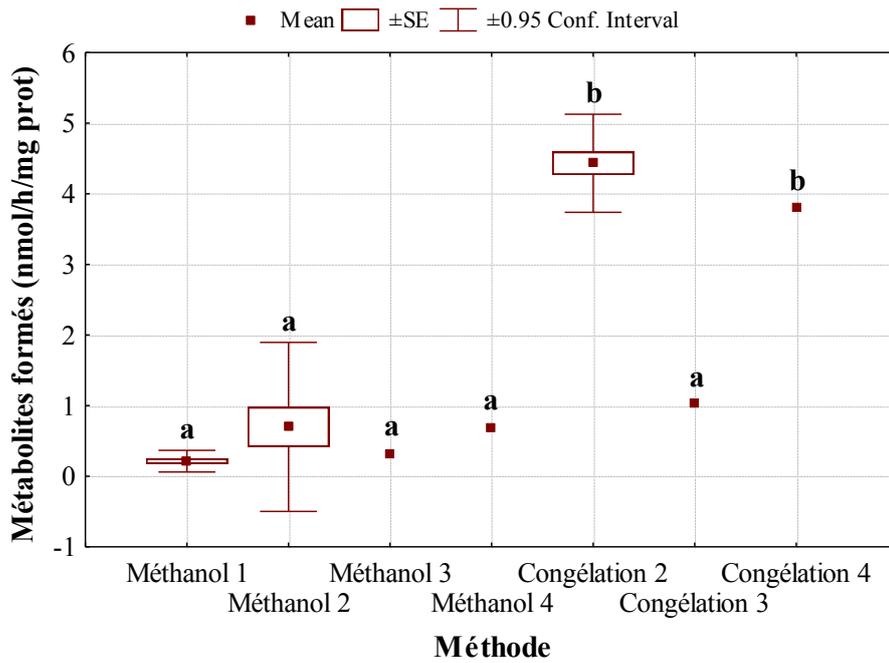


Figure 34 – Résultats obtenus suivant les différents protocoles d'exposition des microsomes et de quantification des métabolites. Les lettres rassemblent les groupes homogènes (Tukey, $p < 0.05$). (Méthanol 1 : méthanol + Radio-HPLC ; Méthanol 2 : méthanol + UPLC-MS/MS ; Méthanol 3 : méthanol + centrifugation + UPLC-MS/MS pool2 ; Méthanol 4 : méthanol + UPLC-MS/MS pool2 ; Congélation 2 : congélation + UPLC-MS/MS ; Congélation 3 : congélation + centrifugation + UPLC-MS/MS pool2 ; Congélation 4 : congélation + UPLC-MS/MS pool2)

4. Conclusion

Les deux méthodes utilisées ont permis l'acquisition de connaissances sur la métabolisation du BaP et du Fluo chez la sole. Ces résultats ont notamment démontré la capacité des enzymes microsomales de foies de soles et de limandes à métaboliser le BaP et le Fluo, de façon semblable à celle des vertébrés supérieurs. En effet, les dihydrodiols et les phénols sont formés majoritairement pour le BaP comme pour le Fluo, quelle que soit l'espèce et la technique analytique utilisée. Pour les métabolites majoritairement détectés selon les deux techniques, des paramètres cinétiques ont pu être calculés. L'utilisation des deux techniques analytiques complémentaire permet de suggérer que les métabolites majoritaires du Fluo détectés en Radio-HPLC, et pour lesquels aucune caractérisation par spectrométrie de masse n'a été réalisée, pourraient être le 2,3-dihydrodiol-Fluo, le 3-OH-Fluo et le 7-OH-Fluo. La métabolisation du Fluo semble donc se faire par des voies similaires à celles du BaP. Comme dans le cas du BaP, des métabolites génotoxiques pourraient être formés à partir du Fluo. Parmi les métabolites détectés mais non identifiés pourraient se trouver notamment des métabolites issus de la transformation du 2,3-dihydrodiol-Fluo, comme l'*anti*-2,3-diol-époxyde-Fluo, capable de former des adduits à l'ADN chez les vertébrés supérieurs (Babson et al., 1986b ; Walker et al., 2007).

Une étude méthodologique a permis de démontrer que dans le cas du BaP, l'analyse par UPLC-MS/MS avait pu conduire à une surestimation des niveaux de métabolites détectés. Les résultats obtenus en Radio HPLC chez la sole montrent que le Fluo semble être métabolisé plus efficacement que le BaP. Cette différence de métabolisation pourrait être due aux différences de conformation structurale qui existent entre le BaP et le Fluo. Le Fluo étant composé de 4 cycles aromatiques pourrait être transformé plus rapidement que le BaP qui compte 5 cycles. De plus, les enzymes du CYP1A1 connues pour être impliquées dans la biotransformation du BaP sont contrôlées par le récepteur Ah. Les différences de conformation entre les deux composés pourraient entraîner des différences d'affinité pour le récepteur Ah (Pushparajah et al., 2008b). Il n'est pas exclu que d'autres isoformes du CYP450 n'étant pas contrôlées par le récepteur Ah puissent être impliquées dans la métabolisation du Fluo. Enfin, les résultats obtenus en UPLC-MS/MS ont également permis de comparer la métabolisation des HAP chez la sole et chez la limande. Les microsomes de sole semblent métaboliser en moyenne deux fois plus le BaP et le Fluo que les microsomes de limande, bien que les profils métaboliques soient similaires. Comme discuté dans l'article 2, ces différences peuvent résulter de l'influence de certains facteurs biotiques comme l'âge et le sexe des poissons, et de facteurs abiotiques. Parmi les facteurs abiotiques, le régime alimentaire, et le niveau de pollution de la zone de capture des poissons peuvent avoir un impact sur l'activité des enzymes de détoxification. Les différences des niveaux d'activité de base des enzymes des poissons utilisés peuvent avoir un impact sur leur efficacité de métabolisation des HAP *in vitro* (Honey et al., 2000).

En perspective, la caractérisation complète des métabolites du Fluo, et la production de standards permettrait leur quantification en UPLC-MS/MS. Pour cela, la collecte des métabolites détectés en Radio-HPLC suivie d'une analyse par spectrométrie de masse pourrait

être réalisée. La production de standards de ces métabolites permettrait leur quantification en UPLC-MS/MS. Les différences de métabolisation du BaP et du Fluo observées chez la sole en Radio-HPLC pourraient alors être vérifiées en UPLC-MS/MS. De plus, certains des métabolites non identifiés pourraient se révéler génotoxiques. La part relative de ses métabolites ayant pu être calculée, leur caractérisation permettrait d'apporter des éléments de réponse quant aux voies de bioactivation du Fluo chez la sole. Par la suite, l'étude individuelle du potentiel génotoxique des métabolites du BaP et du Fluo majoritairement formés permettrait une meilleure compréhension des mécanismes de bioactivation des HAP.

Concernant les différences entre les espèces, de nouvelles incubations seraient nécessaires, afin de déterminer si les différences observées sont dues à des paramètres biotiques, abiotiques, ou une combinaison des deux.

Chapitre 3 – Génotoxicité des HAP

1. Objectifs

Ce chapitre avait pour but d'étudier les effets génotoxiques induits par le BaP et le Fluo, suivant différentes approches *in vitro* et *in vivo*.

D'une part, l'utilisation de modèles *in vitro* devait permettre d'étudier la capacité du BaP et du Fluo à induire des effets génotoxiques chez la sole. La capacité du BaP et du Fluo à former des adduits à l'ADN chez la sole a été étudiée sur de l'ADN standard de thymus de veau exposé au BaP et au Fluo en présence de microsomes hépatiques de sole. La détection du niveau d'adduits à l'ADN a été réalisée par postmarquage au ^{32}P (Sous-traitance laboratoire GRECAN). Des essais de caractérisation des adduits formés ont été réalisés par HPLC-MS/MS en collaboration avec Thierry Douki du Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques (LAN) du CEA de Grenoble. Parallèlement à ces travaux, des hépatocytes primaires de sole ont été exposés au BaP et au Fluo. La génotoxicité de ces HAP a été évaluée par la mesure des niveaux de cassures de brins de l'ADN et de formation d'adduits à l'ADN. Le niveau d'activité d'une enzyme impliquée dans les mécanismes de biotransformation des HAP, l'EROD, a également été mesuré. Dans le but d'identifier les métabolites responsables de la génotoxicité associée aux composés parents, de nouvelles expositions d'hépatocytes de sole à certains métabolites du BaP et du Fluo étaient indispensables. Afin de réaliser ces expérimentations, il a été nécessaire de miniaturiser notre système d'exposition. Les métabolites ne sont en effet disponibles qu'en faibles quantités pour un coût élevé. Cette miniaturisation a rendu possible l'exposition d'hépatocytes de soles au BaP ainsi qu'à certains de ses métabolites (BPDE, 7,8-dihydrodiol-BaP, 7,8-dione-BaP, 6,12-dione-BaP, 3-OH-BaP). De la même façon des expositions d'hépatocytes au Fluo et à certains de ses métabolites (2,3-dihydrodiol-Fluo, 2,3-dione-Fluo et 3-OH-Fluo) ont été réalisées.

Les études *in vitro* devaient donc permettre un screening des effets génotoxiques des composés parents et de certains de leurs métabolites. Néanmoins, la validation *in vivo* des effets observés *in vitro* reste indispensable. Des expositions *in vivo* ont donc été réalisées dans le cadre du projet Sole BEMol. Dans le but d'étudier la relation entre la métabolisation des HAP et leur génotoxicité, des soles ont été exposées à un mélange équimolaire de BaP, Fluo et Pyr. Au cours de ces expérimentations, des marqueurs d'exposition et d'effet ont été mesurés. Le niveau de métabolites biliaires de HAP a été mesuré par UPLC-MS/MS par le LPTC de l'Université de Bordeaux 1. Le niveau de l'activité de l'EROD a également été mesuré. Ces deux mesures permettent de caractériser le niveau d'exposition et de métabolisation des HAP. La génotoxicité a été caractérisée par la mesure des niveaux de cassures de brins de l'ADN et d'une base oxydée de l'ADN, la 8-oxodGuo. Les résultats obtenus pourront être utilisés pour l'élaboration d'un modèle de type bilan énergétique-dynamique, incluant un volet écotoxicologie (DEB-Tox), dans le but de prédire le potentiel des réponses des poissons à la contamination chimique du milieu.

2. Méthodes de mesure de la génotoxicité des HAP

2.1. Mesure du niveau de cassures de brins de l'ADN : le test des comètes

Le niveau de cassures de brins de l'ADN des différents types cellulaires (hépatocytes, érythrocytes...) est déterminé grâce à l'application d'un test des comètes. Ce test, également appelé électrophorèse sur micro gel d'agarose, a été développé par Singh et al. (1988). Cette méthode rapide, sensible et relativement simple permet de détecter des dommages à l'ADN au niveau cellulaire. Elle permet la détection des cassures simple-brins de l'ADN et des sites labiles alcalins. Le principe de cette méthode est basé sur la migration de l'ADN nucléaire en conditions alcalines après la lyse de la membrane cellulaire et la dénaturation de l'ADN. La migration de l'ADN nucléaire est ensuite observée puis caractérisée à l'aide d'un microscope à fluorescence couplé à une caméra CDD ultrasensible et à un logiciel d'analyse d'images (Komet 4.0). Après migration, l'ADN est visible sous forme de comètes, la queue de la comète étant formée par les fragments d'ADN plus courts dont la migration est plus rapide (Figure 35). De par sa sensibilité et sa facilité, le test des comètes est couramment utilisé en écotoxicologie, tant au laboratoire que lors d'études de terrain (Dixon et al., 2002 ; Jha, 2004). Le protocole complet est décrit en annexe 6.

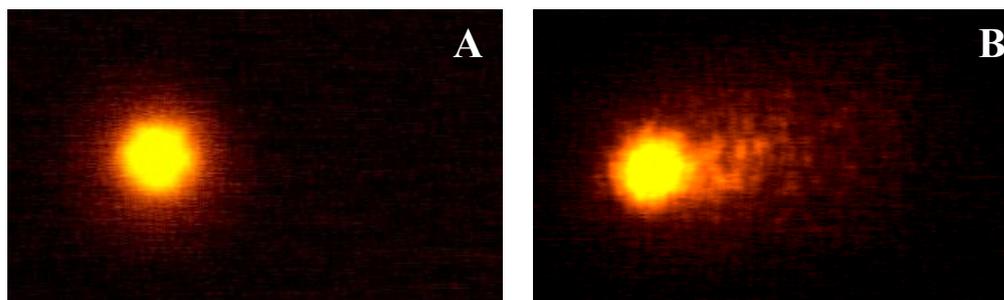


Figure 35 – Cellules dont l'ADN nucléaire est peu endommagé (A) ou fortement endommagé (B).

2.2. Mesure de la base oxydée de l'ADN 8-oxodGuo

La mesure de la base oxydée de l'ADN, 8-oxodGuo, est effectuée par une méthode utilisant la chromatographie liquide haute performance (HPLC), couplée à une détection électrochimique (ED). Le protocole utilisé est basé sur la méthode développée par Helbock et al. (1998). Cette méthode nécessite une première étape d'extraction d'ADN par la méthode chaotrope. Les extraits d'ADN sont ensuite digérés en 2'-désoxyribonucléosides par l'action de la nucléase P1 et de la phosphatase alcaline. L'analyse par HPLC permet la séparation des 2'-désoxyribonucléosides non oxydés des 2'-désoxyribonucléosides oxydés. Ils sont quantifiés respectivement par l'utilisation de détecteurs UV et électrochimique, à l'aide de standards externes. Cette méthode de détection des dommages oxydatifs est recommandée par l'ESCOOD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). De plus, la mesure de la 8-oxodGuo est couramment utilisée en tant que biomarqueur de stress oxydatif lors d'études de génotoxicité (Ravanat et al., 2005) ou de surveillance de la pollution environnementale (Rodriguez-Ariza et al., 1999). Néanmoins, certaines étapes de mise au

point ont été nécessaires, particulièrement concernant les paramètres de chromatographie. Le protocole complet retenu est décrit en annexe 7 et le principe est décrit ci-après.

2.2.1. Protocole d'extraction d'ADN

Le protocole utilisé pour extraire l'ADN en vue de quantifier la 8-oxodGuo se fait par la méthode dite chaotropique. Cette méthode n'utilise pas de phénol, capable d'induire des oxydations artéfactuelles de l'ADN, et de conduire ainsi à une surestimation du niveau de la base oxydée 8-oxodGuo. De plus, la précipitation de l'ADN par l'utilisation d'iodure de sodium (NaI) permet d'obtenir les valeurs les plus faibles et les moins variables de la mesure de la 8-oxodGuo (Helbock et al., 1998). Enfin, l'utilisation de déferoxamine mésylate à une concentration appropriée dans chaque solution utilisée permet de chélater les métaux éventuellement présents. Ces métaux, en particulier le fer, peuvent être impliqués dans des cycles d'oxydo-réduction et ainsi faciliter la formation artéfactuelle de 8-oxodGuo au cours de l'extraction. Le déferoxamine mésylate a donc une action protectrice vis à vis de l'ADN.

2.2.2. Digestion et injection de l'ADN

2.2.2.1. Digestion de l'ADN

Les extraits d'ADN sont digérés par les actions successives de la nucléase P1 permettant l'hydrolyse de l'ADN, puis de la phosphatase alcaline entraînant la déphosphorylation de l'ADN. Les désoxyribonucléosides obtenus sont ensuite récupérés pour l'injection.

2.2.2.2. Injection en HPLC-UV/ECD

Les échantillons ont été injectés sur un système HPLC Agilent® Série 1200, couplé à un détecteur UV Agilent® Série 1200 et à un détecteur électrochimique Coulochem III, ESA Inc. (Figure 36). L'ensemble du système est piloté par le logiciel Agilent® ChemStation (version B.02.01-SR2).



Figure 36 – Système HPLC couplé à un détecteur UV et un détecteur électrochimique.

La séparation des désoxyribonucléosides est effectuée sur une pré-colonne Ultrasphere (5C18, Interchim) et une colonne Uptisphere (5ODB, Interchim). La phase mobile utilisée est composée d'un tampon acétate de sodium 100 mM, méthanol 10%, pH 5,2.

La longueur d'onde du détecteur UV a été fixée à 254 nm, permettant la détection des bases non oxydées de l'ADN ; la température de la colonne a été fixée à 30°C ; le temps de chaque analyse a été fixé à 20 min, avec un débit de 1 mL.min⁻¹.

2.2.2.3. Électrovoltammogramme

La base oxydée 8-oxodGuo est détectée et quantifiée par électrochimie. Le détecteur électrochimique comporte deux électrodes d'oxydation, E1 et E2. L'électrode E2 est choisie comme électrode de mesure, tandis que l'électrode E1 sert ici à oxyder d'éventuels débris pouvant se trouver dans les échantillons et perturber la détection de la base oxydée. De plus, une cellule de garde placée entre la pompe et la colonne de l'HPLC permet l'oxydation de la phase mobile. Afin de déterminer le potentiel d'oxydation optimal de l'électrode de mesure, un électrovoltammogramme a été réalisé à l'aide de standards de 8-oxodGuo.

Pour cela, des aliquotes contenant chacun 5 pmoles de 8-oxodGuo pure dans 50 µL d'eau MilliQ passée aux UV ont été préparés, et injectés. Les potentiels de l'électrode E1 et de la cellule de garde ont été respectivement fixés à 150 mV et 460 mV. Le potentiel de l'électrode E2 a été modifié pour chaque injection. Des mesures ont été réalisées pour des potentiels d'oxydation compris entre 240 et 420 mV. Le pas du potentiel était de 20 mV entre 240 et 360 mV, puis de 10 mV entre 360 et 420 mV. L'électrovoltammogramme obtenu est présenté sur la Figure 37. Le potentiel d'oxydation optimal a été déterminé dans la phase de plateau et a été fixé à 380 mV.

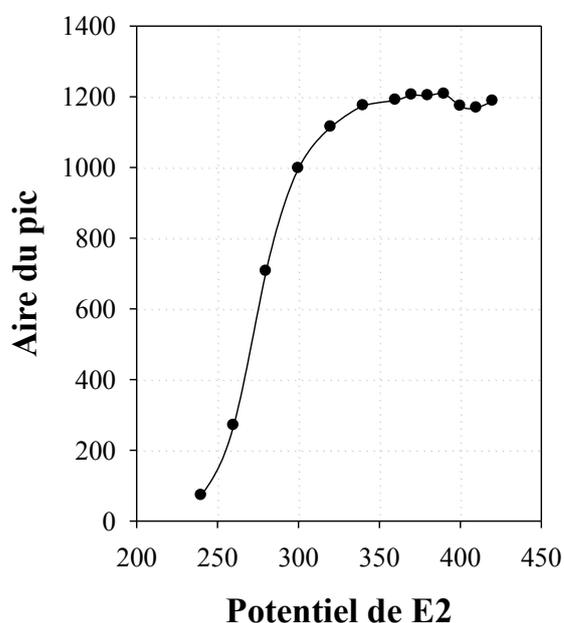


Figure 37 – Electrovoltammogramme de la 8-oxodGuo

2.2.2.4. Utilisation de standards externes de dGuo et de 8-oxodGuo

Une fois les paramètres d'injection et de détection déterminés, des gammes de standards de dGuo (Figure 38) et de 8-oxodGuo (Figure 40) ont été injectées, afin de vérifier la linéarité de la mesure. Les quantités de dGuo injectées étaient comprises entre 0.2 et 8.75 nmoles. La 8-

oxodGuo étant dosée à l'état de traces dans les échantillons, la gamme était comprise entre 0.2 et 7 pmoles de 8-oxodGuo.

Les résultats (Figure 39 et Figure 41) montrent une très bonne linéarité de la mesure des standards pour chacune des deux gammes injectées.

Lors des analyses, les aires des pics de dGuo et de 8-oxodGuo sont mesurées. Grâce aux gammes réalisées, les quantités de dGuo et de 8-oxodGuo peuvent être calculées de la manière suivante :

– quantité de dGuo : $n(\text{dGuo}) = (\text{Aire du pic} \times 10^{-9}) / 846.19 \text{ moles}$;

– quantité de 8-oxodGuo : $n(\text{8oxodGuo}) = (\text{Aire du pic} \times 10^{-12}) / 242.6 \text{ moles}$.

Les nombres de résidus de dGuo et de 8-oxodGuo sont ensuite calculés par l'utilisation du nombre d'Avogadro \mathcal{N} :

– nombre de résidus dGuo : $\text{Nb}(\text{dGuo}) = n \times \mathcal{N}$;

– nombre de résidus 8-oxodGuo : $\text{Nb}(\text{8-oxodGuo}) = n \times \mathcal{N}$.

La mesure de la base oxydée 8-oxodGuo est donc exprimée en nombre de résidus 8-oxodGuo par millions de résidus dGuo, par le calcul suivant :

Mesure de la 8-oxodGuo = $(\text{Nb}(\text{8-oxodGuo}) \times 10^6) / \text{Nb}(\text{dGuo})$

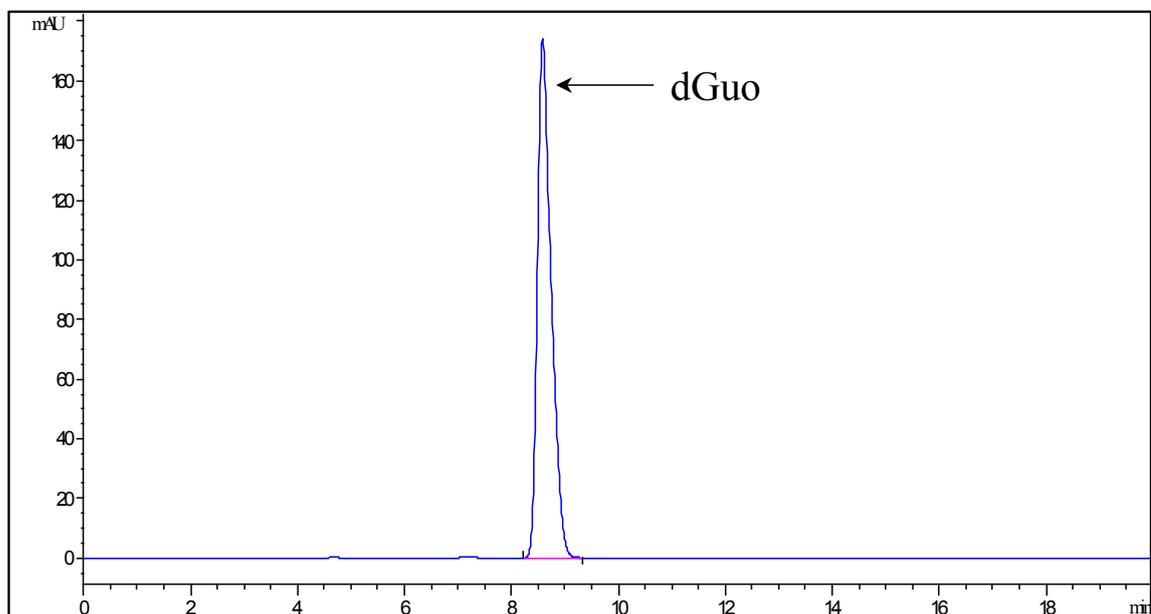


Figure 38 – Chromatogramme UV d'un standard contenant 4 nmoles de dGuo. Les axes des abscisses et des ordonnées sont respectivement exprimés en min et en mUnités d'Absorbance.

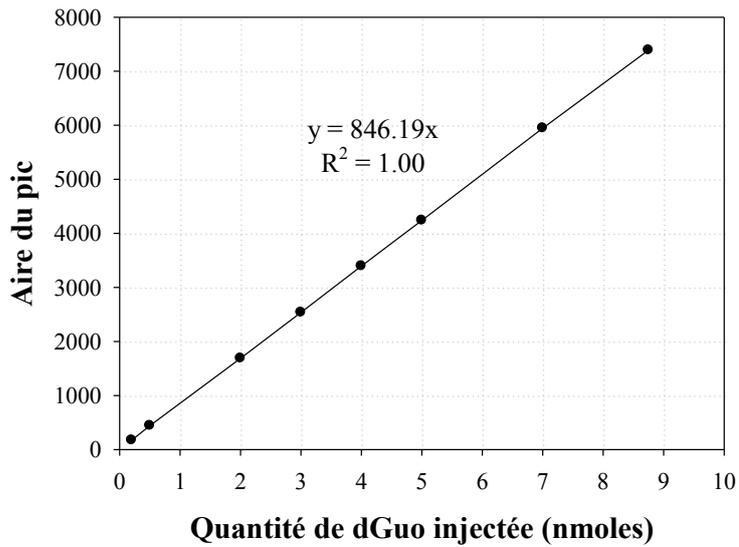


Figure 39 – Gamme de dGuo illustrant la linéarité de la mesure de la dGuo.

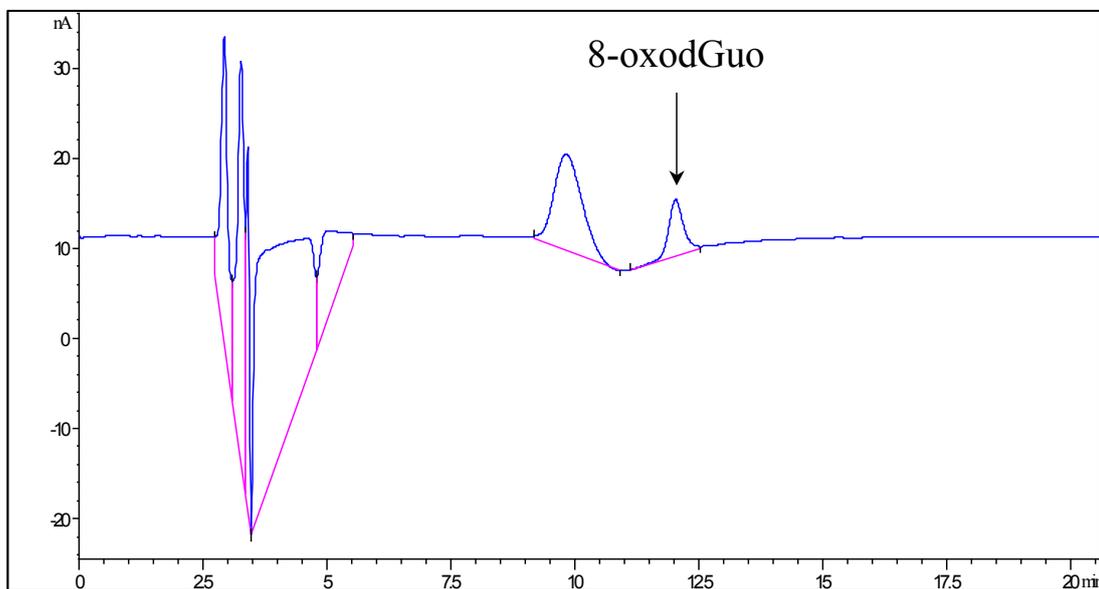


Figure 40 – Chromatogramme électrochimique obtenu après injection d'un standard contenant 0.5 pmoles de 8-oxodGuo. Les axes des abscisses et des ordonnées sont respectivement exprimés en min et en nA.

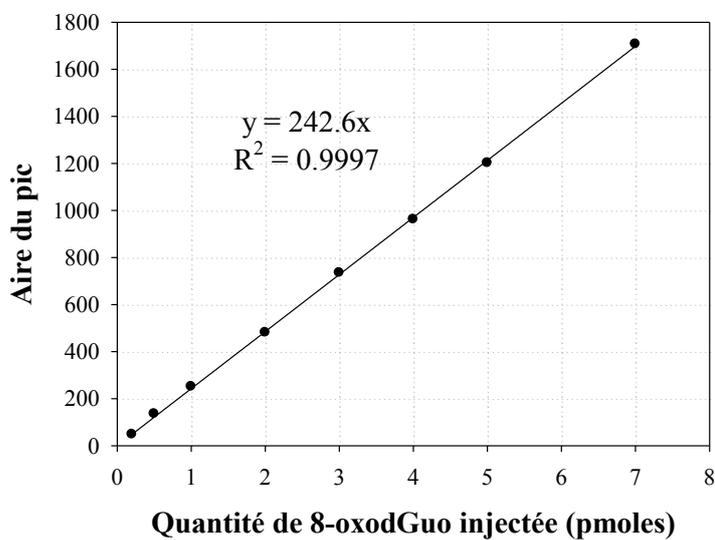


Figure 41 – Gamme de 8-oxodGuo illustrant la linéarité de la mesure de la 8-oxodGuo.

2.2.2.5. Détermination de la quantité minimale d'ADN à injecter

Étant donné que la base oxydée 8-oxodGuo est quantifiée à l'état de traces dans les échantillons, il est possible que la quantité d'ADN digéré ait un impact sur le résultat obtenu. Des extraits d'ADN de foies de soles d'élevage ont donc été poolés, puis dispatchés en aliquotes de 5 à 35 μg d'ADN dans 50 μL de solution de déferoxamine mésylate 0.1 mM. Pour chaque échantillon, la 8-oxodGuo a été mesurée selon la méthodologie précédemment décrite. Les résultats (Figure 42) démontrent que la quantité d'ADN digéré et injecté a un effet significatif sur le résultat exprimé en nombre de résidus 8-oxodGuo par million de résidus dGuo (ANOVA, $p < 0.05$). Lorsque la quantité d'ADN digéré est faible (5 μg), la variabilité analytique est très importante, et le niveau de 8-oxodGuo semble surestimé. A partir d'une quantité d'ADN digéré de 15 μg , le niveau de 8-oxodGuo mesuré et la variabilité analytique se stabilisent. La quantité minimale d'ADN à digérer a donc été fixée à 15 μg .

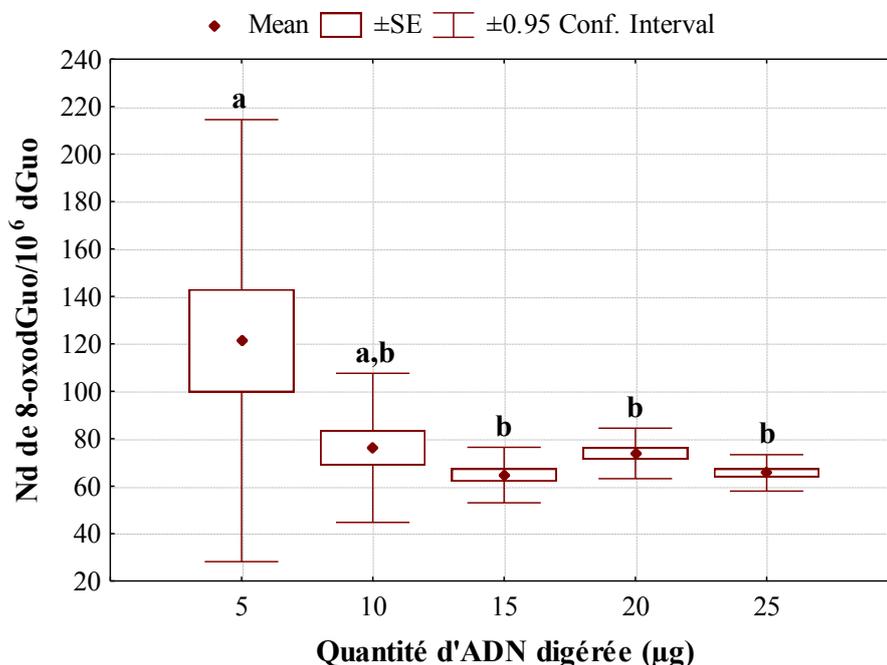


Figure 42 – Nombre de résidus de 8-oxodGuo par million de résidus dGuo mesurés en fonction de la quantité d'ADN digéré et injecté. Les lettres dénotent les groupes homogènes (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$).

2.2.2.6. Chromatogrammes types obtenus chez la sole

Après digestion de 15 μg d'ADN et injection selon les paramètres déterminés précédemment, le chromatogramme obtenu en UV (Figure 43) permet de détecter les quatre bases de l'ADN, et le chromatogramme obtenu en électrochimie (Figure 44) permet de détecter la base oxydée 8-oxodGuo.

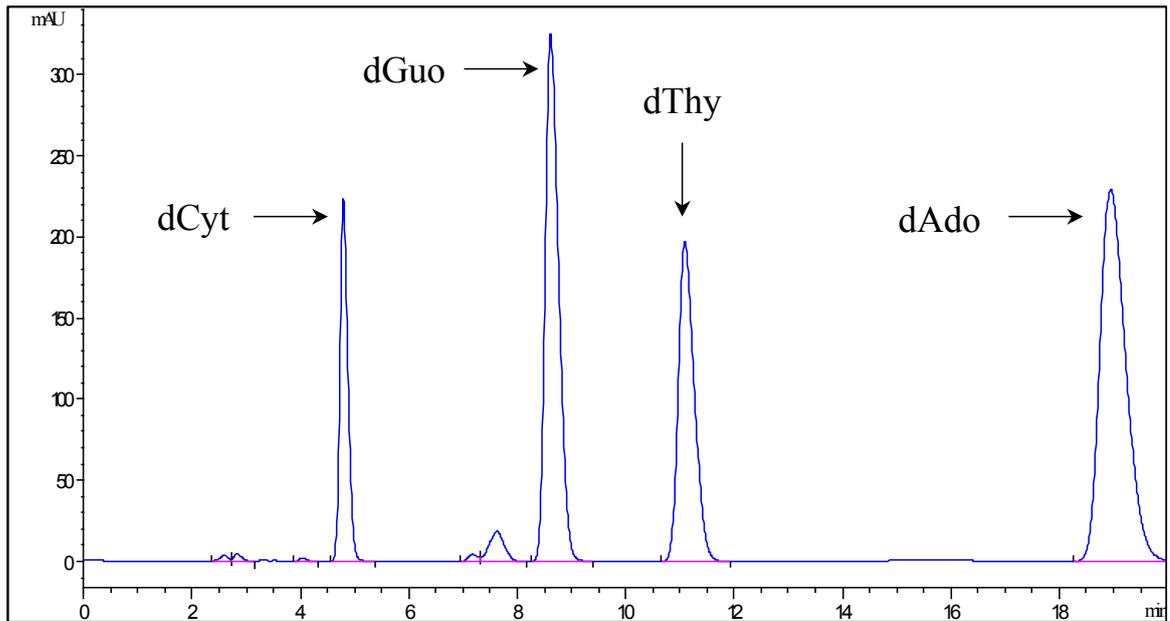


Figure 43 – Chromatogramme obtenu en UV après injection d'ADN de sole.

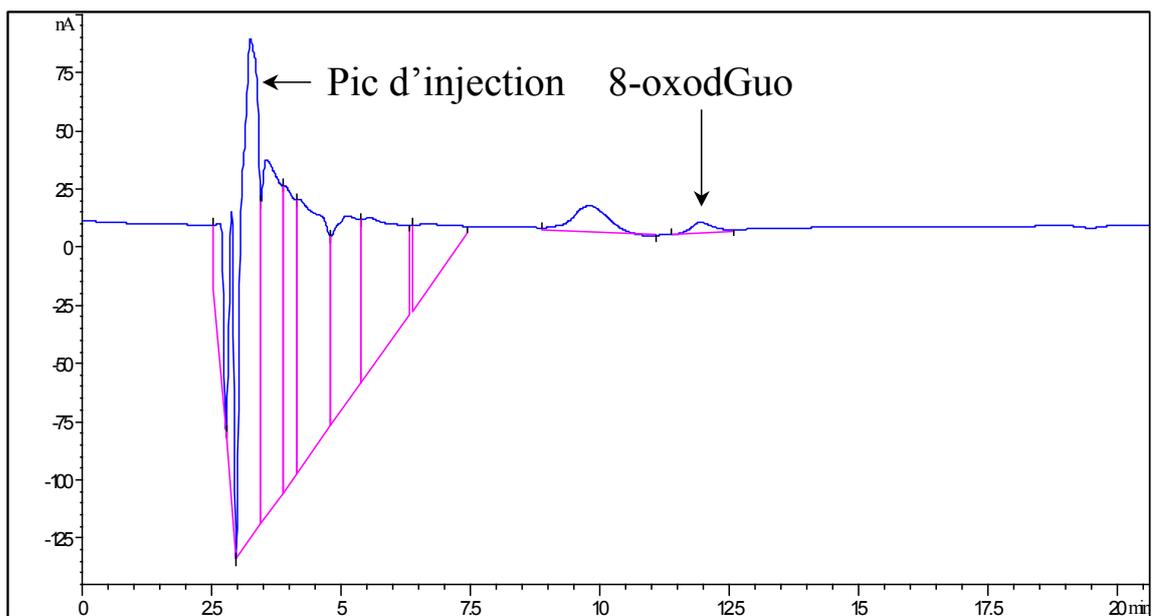


Figure 44 – Chromatogramme obtenu par détection électrochimique après injection d'ADN de sole.

3. Modèles d'expositions *in vitro*

3.1. Exposition d'hépatocytes primaires de sole

3.1.1. Méthode d'isolement et d'exposition d'hépatocytes primaires de sole

Cette technique n'étant initialement pas maîtrisée au laboratoire, nous l'avons transférée, après avoir été formés par le Docteur Karine Pichavant-Rafini et le Docteur Hélène Ollivier, du Laboratoire Optimisation des Régulations Physiologiques de l'Université de Bretagne Occidentale à Brest.

Le protocole complet d'isolement et de mise en culture d'hépatocytes est décrit en annexe 8. Il est adapté de la méthode d'Ollivier et al. (2006), basée sur la perfusion de foies de soles par une solution de collagénase.

3.1.2. Validation de la méthode

3.1.2.1. Isolement et contamination des hépatocytes au BaP

Afin de valider cette méthode, une première expérimentation a été réalisée au cours de laquelle des hépatocytes de soles sauvages provenant de la Baie de Vilaine ont été exposés pendant 24 h au BaP à une gamme de concentrations de 5 à 75 μM . Les cellules ont été mises en culture dans des flasques de culture cellulaire de 75 cm^2 à une concentration de $1,78 \cdot 10^6$ cellules/mL dans un volume total de 15 mL. Les flasques ont été incubés une nuit à 19°C et 1% CO_2 avant contamination au BaP.

Les cellules ont ensuite été exposées au BaP à des concentrations de 5, 25, 50 et 75 μM . Un témoin a été réalisé en exposant des cellules uniquement au solvant DMSO (0,1%) utilisé pour dissoudre le BaP. Les flasques ont ensuite été placées sur table d'agitation pendant 2 h afin de permettre une bonne dispersion des cellules et du BaP, puis replacées à 19°C et 1% CO_2 pendant 20 h. En fin d'exposition, les flasques ont été de nouveau agitées pendant 2 h afin de diminuer l'adhérence des cellules. Les cellules ont ensuite été totalement décollées par l'utilisation douce d'un cell-scraper. La totalité du milieu contenant les cellules a été récupérée, et centrifugée à 400 g pendant 10 min à 4°C, puis le culot a été repris dans 700 μL de milieu de congélation (RPMI 55%, DMSO 20%, SVF 25%). Après un test de viabilité au bleu trypan, les échantillons ont été stockés dans l'azote liquide jusqu'aux analyses. Une mesure de la base oxydée 8-oxodGuo a ensuite été réalisée sur chaque échantillon.

3.1.2.2. Résultats et discussion

Dès la plus faible concentration d'exposition de 5 μM , le niveau de la base oxydée 8-oxodGuo est significativement plus élevé chez les cellules exposées au BaP que chez les cellules témoins (ANOVA, $p < 0,05$) (Figure 45). Cet effet n'est pas dépendant de la concentration d'exposition. Ces résultats démontrent une génotoxicité du BaP due à un stress oxydant dès

5 μM . Le BaP étant connu pour induire un stress oxydant aussi bien *in vitro* que *in vivo*, ces résultats permettent de valider la technique d'exposition d'hépatocytes primaires de sole. Une saturation du niveau de dommages à l'ADN est observée dès la plus faible concentration d'exposition. Afin de déterminer le seuil de génotoxicité du BaP, de nouvelles expérimentations ont été réalisées par la suite.

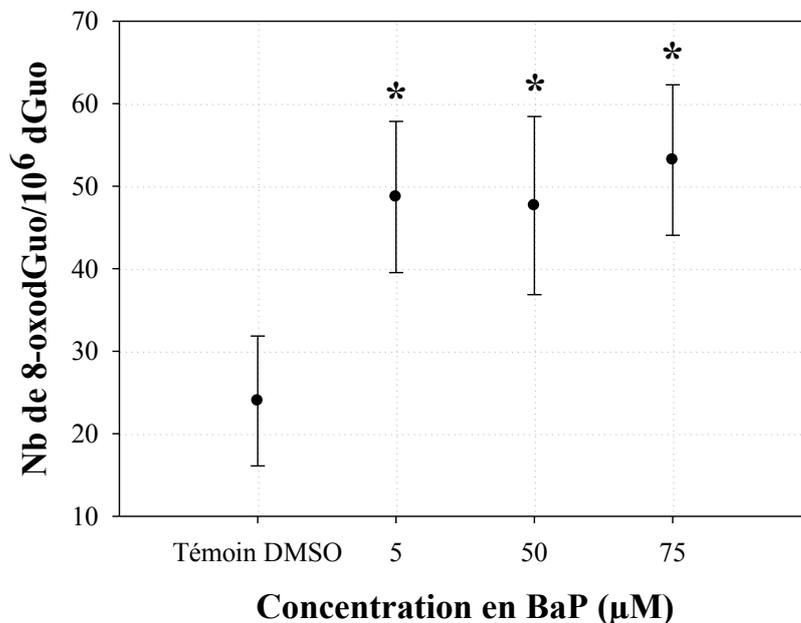


Figure 45 – Niveau de la base oxydée 8-oxodGuo mesuré sur des hépatocytes de sole après exposition au BaP pendant 24 h.

3.1.3. Optimisation du système d'exposition en primo-cultures

Afin de permettre la réalisation d'un test des comètes sur des hépatocytes de sole en cultures primaires, certaines modifications ont été nécessaires. Après exposition, les étapes de récupération des cellules et de congélation sont des étapes très délicates, et peuvent conduire à une fragmentation artéfactuelle de l'ADN. Des essais ont donc été réalisés afin de réduire l'impact de ces étapes. Pour cela, des hépatocytes ont été isolés et mis en culture dans les mêmes conditions que précédemment, mais sans contamination.

Deux techniques de récupération des cellules ont été testées : la récupération mécanique à l'aide d'un cell-scraper, ou la récupération enzymatique par l'utilisation d'une enzyme couramment utilisée pour dissocier les cellules, la trypsine. Pour chaque technique, deux modes de congélations ont également été étudiés : la congélation directe dans l'azote liquide, ou la congélation par paliers successifs : 1 h à -20°C , 1 nuit à -80°C , puis stockage dans l'azote liquide. Après chaque technique un test des comètes a été réalisé.

Les cellules provenant des flasques trypsinées et dont la congélation a été effectuée par paliers successifs présentent le niveau de cassures de brins de l'ADN le plus faible. Au cours des expositions suivantes, la trypsination a donc été choisie comme mode de dissociation des cellules en primo-culture, et les échantillons ont été congelés par paliers successifs.

3.1.4. Miniaturisation du système d'exposition

Une des perspectives de ce travail était d'étudier individuellement le potentiel génotoxique de certains métabolites du BaP et du Fluo. Ces métabolites ne sont commercialisés qu'en faibles quantités pour un coût élevé. De plus, l'exposition d'hépatocytes à des gammes de concentrations de ces métabolites nécessiterait une quantité importante d'hépatocytes. Pour cela, il est apparu nécessaire de miniaturiser le système de culture. Des hépatocytes de soles ont été exposés au BaP et au Fluo suivant deux modes d'exposition : un système classique d'exposition en flasques, et un système miniaturisé d'exposition en puits de microplaques 96 puits. Les résultats de ces expositions ont été valorisés par la rédaction de deux publications scientifiques.

Les résultats obtenus après exposition au BaP ont fait l'objet d'une publication acceptée dans le journal *Polycyclic Aromatic Compounds*, à la suite de leur présentation au 22th symposium de l'International Society for Polycyclic Aromatic Compounds (ISPAC) en septembre 2009, à Charleston, SC, USA. Cette publication constitue l'article 3 (pages 120-129).

Les résultats obtenus après exposition au Fluo ont été valorisés par la rédaction d'une publication (Article 4, pages 130-149) soumise dans le journal *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* (N° de soumission : MUTGEN-D-10-00219).

Résumé de l'article 3 (pages 120-129)

Le BaP, connu pour son potentiel cancérigène, mutagène et génotoxique chez les vertébrés supérieurs, est couramment mesuré à des concentrations importantes dans l'environnement marin, particulièrement en milieu côtier. L'étude de ses effets génotoxiques constitue donc une problématique environnementale et sanitaire. Le but de cette étude était d'évaluer les effets enzymatiques et génotoxiques du BaP sur des modèles d'exposition *in vitro*, chez une espèce de poisson benthique, la sole commune *Solea solea*. Des hépatocytes de sole ont été exposés suivant deux modes de culture cellulaire : en flasques, ou en puits de microplaques. Ces expositions ont été réalisées dans le but de i) mesurer la modulation de l'activité EROD et le niveau de cassures de brins de l'ADN induits par le BaP, ii) vérifier la possibilité de miniaturiser le système d'exposition. De plus, des microsomes hépatiques de sole ont été exposés au BaP en présence d'ADN standard de thymus de veau afin d'étudier les capacités des enzymes hépatiques de la sole à métaboliser le BaP en espèces électrophiles responsables de la formation d'adduits à l'ADN. Les résultats obtenus ont démontré la capacité des enzymes hépatiques de sole à métaboliser le BaP en métabolites réactifs, responsables de la formation d'adduits à l'ADN et de dommages oxydatifs à l'ADN, pour chacune des concentrations testées et quel que soit le mode d'exposition choisi.

Résumé de l'article 4 (pages 130-149)

Bien que le Fluo soit un des HAP les plus abondants dans le milieu marin et dans l'alimentation humaine, très peu de données sont disponibles concernant ses effets génotoxiques, en particulier chez les organismes marins. De plus, les données disponibles quant à la génotoxicité du Fluo sont controversées. Dans ce contexte, le but de cette étude était de mesurer *in vitro* les effets génotoxiques potentiels du Fluo et ses effets sur la modulation du

CYP450 chez la sole. Dans l'optique de réaliser de futures expositions à certains métabolites du Fluo disponibles en faibles quantités, la possibilité de miniaturiser le système d'exposition d'hépatocytes de soles a également été étudiée.

Des hépatocytes primaires de sole ont été exposés pendant 24 h à une gamme de concentrations de Fluo de 0,5 à 50 μM suivant deux modes d'exposition : en flasques ou en puits de microplaques. L'activité d'une enzyme, l'éthoxyresorufine-O-dééthylase (EROD) a été mesurée en tant qu'indicateur de l'activité du CYP1A1, qui est impliqué dans la phase I de la détoxification des xénobiotiques. Les effets génotoxiques du Fluo ont été évalués par la mesure des niveaux de cassures de brins de l'ADN (test des comètes) et de la formation d'adduits à l'ADN (post marquage ^{32}P). Des extraits d'ADN standard de thymus de veau ont également été exposés au Fluo en présence d'enzymes microsomaux hépatiques de sole afin d'étudier la formation d'adduits à l'ADN du Fluo.

Concernant les expositions d'hépatocytes de sole, le Fluo a été démontré comme inhibant l'activité de l'EROD de façon dépendante de la concentration. Un effet génotoxique significatif a été observé en termes de cassures de brins de l'ADN à partir d'une concentration d'exposition de 5 μM : cet effet n'est pas dépendant de la concentration d'exposition, et est similaire quel que soit le mode d'exposition, en flasques ou en puits.

Après exposition de microsomes hépatiques de sole à 100 μM de Fluo en présence d'ADN standard de thymus de veau, deux adduits ont été détectés de manière reproductible. L'un d'eux a également été détecté de manière reproductible après exposition à 200 μM de Fluo, tandis qu'un autre adduit n'a été détecté que ponctuellement. Après exposition d'hépatocytes de soles aux plus fortes concentrations de Fluo, un adduit a été détecté de manière reproductible. La structure chimique de ces adduits n'a pas été caractérisée.

Ces résultats démontrent la capacité des hépatocytes de sole à métaboliser le Fluo en 24 h en métabolites réactifs, capables d'induire des effets génotoxiques, par un stress oxydatif ainsi que par la formation d'adduits à l'ADN. De plus, la miniaturisation du système d'exposition a pu être validée, permettant de futures expositions à certains métabolites du Fluo.

3.1.5. Exposition aux métabolites de HAP

Après validation du système d'exposition en puits, une nouvelle série d'expositions a été réalisée, durant laquelle des hépatocytes primaires ont été exposés à différents métabolites du BaP et du Fluo. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication en cours de préparation. L'acquisition des données étant toujours en cours, cette publication (Article 5, pages 150-169) est présentée sous sa forme provisoire.

Résumé de l'article 5 (pages 150-169)

Les HAP sont des contaminants hydrophobes qui sont biotransformés par les organismes en composés plus solubles afin de pouvoir être excrétés. Ces mécanismes de biotransformation impliquent l'action des enzymes du CYP450 1A1. Parmi les métabolites formés, certains sont génotoxiques. Cette étude visait à mesurer le potentiel de certains métabolites du BaP et du Fluo à moduler l'activité du CYP450 1A1 et à induire des effets génotoxiques chez la sole.

Des hépatocytes de sole ont été exposés pendant 24 h au BaP ainsi qu'à certains de ses métabolites : BPDE, 3-OH-BaP, 6,12-dione-BaP, 7,8-dione-BaP, et 7,8-dihydrodiol-BaP à une gamme de concentrations de 0,05 à 1 μM . Des expositions ont également été réalisées au Fluo et à certains de ses métabolites : 3-OH-Fluo, 2,3-dione-Fluo et 2,3-dihydrodiol-Fluo à une gamme de concentrations de 0,25 à 5 μM . L'activité d'une enzyme représentative du CYP450 1A1, l'EROD, ainsi que le niveau de cassures de brins de l'ADN ont été mesurés. Dans le cas du BaP, seules les expositions au BaP et à la 6,12-dione-BaP ont entraîné une augmentation de l'activité EROD. Le BaP a induit un effet génotoxique à partir d'une concentration d'exposition de 0,25 μM tandis que ses métabolites ont induit un niveau significatif de cassures de brins dès la plus faible concentration d'exposition de 0,05 μM . Le métabolite qui est apparu comme le plus génotoxique est le BPDE, considéré comme étant le carcinogène ultime du BaP chez les vertébrés supérieurs.

En ce qui concerne le Fluo, aucun effet n'a été observé sur l'activité EROD, que ce soit pour le Fluo ou ses métabolites. Tous les métabolites testés du Fluo, ainsi que le composé parent induisent un niveau significatif de cassures de brins de l'ADN. Du à un niveau de cassures de brins relativement élevé dans le groupe témoin solvant, seul le 3-OH-Fluo à 5 μM induit un effet génotoxique significatif par rapport au témoin solvant. En parallèle, des hépatocytes de sole ont été exposés au BaP et à ses métabolites à une concentration plus faible de 0,01 μM , et au Fluo et à ses métabolites à une concentration plus importante de 25 μM . Les analyses de ces échantillons sont nécessaires pour compléter cette étude.

Article 3 – The toxicity of benzo[a]pyrene on sole (*Solea solea*) hepatocytes: assessment of genotoxic and enzymatic effects

Accepted in Polycyclic Aromatic Compounds.

N. Wessel¹, D. Ménard¹, K. Pichavant-Rafini², H. Ollivier², J. Le Goff³, T. Burgeot¹, F. Akcha^{1*}

¹Ifremer, Département de Biogéochimie et Ecotoxicologie, Rue de l'Île d'Yeu, 44311 Nantes Cedex 03, France.

²Laboratoire Optimisation des Régulations Physiologiques, Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, 6 Avenue Le Gorgeu, CS 93837, 29238 Brest cedex, France.

³ADn'tox et Groupe Régional d'Etudes sur le CANcer, EA 1772 Université de Caen Basse Normandie, Centre François Baclesse, Avenue du Général Harris, 14076 Caen cedex 05, France.

*Corresponding author: Farida Akcha

Ifremer, Department of Biogeochemistry and Ecotoxicology, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes 03, France

Tel : 33 2 40 37 42 08

Fax : 33 2 40 37 42 41

Mail : fakcha@ifremer.fr

ABSTRACT

The benzo[a]pyrene is a polycyclic aromatic hydrocarbon known to be genotoxic, mutagenic and carcinogenic in higher vertebrates. The aim of this study was to evaluate in vitro the enzymatic and genotoxic effects of BaP in a benthic fish species, *Solea solea*. Sole hepatocytes were exposed to BaP in order to measure the modulation of ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) activity and the DNA strand breaks induced by BaP metabolism. Exposures were performed in both culture flasks and microplate wells in order to check for the possible miniaturization of the exposure system. Moreover, sole liver microsomes were exposed to BaP in the presence of standard DNA in order to assess the potential formation of DNA adducts in sole.

The results demonstrated the ability of sole hepatic enzymes to metabolize BaP into reactive species responsible for bulky DNA adducts and DNA strand breakage, whatever the tested exposure concentration and the mode of exposure.

Keywords : Genotoxicity ; Sole ; BaP ; DNA strand breaks ; EROD, DNA adducts.

INTRODUCTION

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous environmental pollutants. Their inputs in the marine environment are mainly from pyrolytic origins, with supplementary inputs near the harbors and oil refineries (1). PAHs can reach high concentrations in the particulate phase, and in sediments (2). Due to their toxicity, many of them are listed as priority pollutants by the US Environmental Protection Agency (US EPA), and as dangerous priority substances by the European Water Framework Directive (Directive 2000/60/EC). Due to their hydrophobicity, biotransformation mechanisms are involved in their transformation into more hydrophilic and excretable compounds. Some metabolites produced are responsible for the genotoxic effects associated to the parent compound. The benzo[a]pyrene (BaP) is the PAH the most widely studied. It is a model genotoxicant whose metabolic activation pathways are well known in higher vertebrates (3). In fish, species-related differences were observed in the metabolism of PAHs (4, 5) and PAH genotoxicity was already demonstrated (6). The common sole (*Solea solea*) is a commercial benthic species. Its nursery are located in coastal and estuarine areas, that receive major pollutant inputs. The sole is so particularly exposed to marine pollution.

The aim of this study was to assess *in vitro* (i) the potential modulation of EROD activity in BaP-exposed sole hepatocytes, (ii) the genotoxic effects in terms of DNA strand breaks induced by BaP in sole hepatocytes, and (iii) the potential production of BaP adducts on calf thymus DNA following activation of BaP by sole microsomal fractions. Moreover, hepatocyte exposures were conducted in two different ways (75 cm²-cell culture flasks and 96-well microplates) in order to check for a possible miniaturization of the exposure system that could allow the forthcoming genotoxicity study of different PAH metabolites.

MATERIAL AND METHODS

Sole hepatocyte isolation

Soles used for these experiments came from the Loire estuary in the French West coast. Individuals from 16 to 27 cm were used. The hepatocytes were isolated by a collagenase digestion technique adapted from Ollivier et al. (7). Livers from freshly sacrificed soles were perfused using (i) 5 mL of a standard iso-osmotic solution (IOS) at a flow rate of 0.4 mL.min⁻¹, (ii) 5 mL of an IOS enriched with 0.6 mM EDTA at a flow rate of 0.4 mL.min⁻¹, and (iii) 5 mL of a collagenase solution (C5138, type IV from Sigma-Aldrich Chemicals, 1 mg.mL⁻¹ in IOS) at a flow rate of 0.2 mL.min⁻¹. Following perfusion, cells were recovered by filtrations (200, 85 and 48 µm), centrifuged and resuspended in 5 mL of an IOS enriched with 5 mM glucose and 1.5 mM CaCl₂. Cells were seeded in 75 cm²-tissue culture flasks (24.5 x 10⁶ cells in a final volume of 15 mL) or in 96-well culture plates (0.65 x 10⁶ cells in a final volume of 200 µL) in a medium containing 90% DMEM, 10% fetal bovine serum (FBS), and supplemented with 2% penicillin-streptomycin as antibiotics and 2% fungizone-amphotericin B as antifungics.

BaP exposure

One night after seeding, cells were exposed to 0.1, 0.5, 1, 5, and 25 μM of BaP (Sigma Aldrich Chemicals) dissolved in DMSO so that the solvent concentration in the medium equaled 0.5%. Exposure were conducted for 24 hrs in the dark at 17°C. A solvent control using DMSO was performed (0.5%). For each tested concentration, at least 2 replicates of flasks and 2 replicates of wells were performed. Following 24 hrs exposure, cells were recovered by using trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen) and were withdrawn in a freezing medium before storage in liquid nitrogen until analyses.

EROD activity measurement

For the samples exposed in flasks, the Ethoxyresorufine-O-Deethylase (EROD) activity was determined as an indicator of phase I biotransformation activities. EROD activity was measured directly on the hepatocyte suspensions by a method adapted from Burke and Mayer (8) slightly modified for microplate readers (9).

DNA strand breaks measurement

For genotoxicity assessment, the alkaline comet assay was applied in hepatocytes as previously described for fish erythrocytes by Akcha et al. (10). A trypan blue viability test was performed on each defrosted sample prior to the comet assay. For each sample, two slides were prepared. For each slide, the DNA of 75 nuclei was analyzed by the measurement of the percentage of DNA present in the comet tail (Kinetic Imaging Software 4.0).

Preparation of the microsomal fractions

The sole used for the microsomal exposure were 1 year old individuals coming from the Seine estuary (French West coast), which is a high-contaminated area. Sole liver microsomes were extracted by potter homogenization, centrifugation (9 000 g, 15 min, 4°C), and ultracentrifugation of the supernatant (105 000 g, 60 min, 4°C). Supernatants were further discarded and pellets were resuspended into 100 μM phosphate buffer enriched with 1 mM EDTA and 20% glycerol. Microsomes were then stored into liquid nitrogen until the experiments.

Microsomal exposure to BaP

Just before use, microsomal proteins were quantified using the Bradford assay. Standard calf thymus DNA (600 μg) and sole liver microsomes (1 mg) were exposed to 20 and 40 μM BaP in a final volume of 1 mL in an incubation buffer containing nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (1 mM), glucose-6-phosphate (5 mM), and glucose-6-phosphate dehydrogenase (1U/mL). Following 1 hr of incubation, reaction was stopped by plugging the samples into liquid nitrogen, and the production of bulky DNA adducts was measured by applying the ^{32}P post-labeling assay, as described by Le Goff et al. (11).

Statistical analysis

The data concerning the EROD activity and the DNA strand break levels were respectively analyzed by an ANOVA and a nested design ANOVA following mathematical normalization of the data when necessary.

RESULTS AND DISCUSSION

EROD activity following hepatocyte exposure

Following 24 hrs of hepatocyte exposure, no cytotoxic effect was observed as measured by the trypan blue assay (data not shown). The EROD activity (Figure 46), normalized by the square root transformation of the activity measured in pmol of resorufin formed per min and per 10^6 cells, followed a standard “bell shape” curve. In fact, the activity was significantly higher than that of the control group following exposure to BaP concentrations of 0.1, 0.5 and 1 μM . For this range of concentrations, increase was not concentration-dependent. Following exposure to the highest tested concentrations of 5 and 25 μM , the activity decreased and reached a level similar to that of the control group. Similar results were obtained following rat hepatocyte exposure to a range of BaP concentrations from 1 nM to 100 μM for 48 hrs: a bell shape curve was obtained with a maximum EROD activity measured at approximately 20 μM , followed by a decrease in activity (12). In fish, the CYP1A response to contaminants is known to be species-specific (13). Nevertheless, BaP is currently known to induce the EROD activity in fish, as in higher vertebrates (14, 15, 16). The bell shape curve observed for EROD activity could be due to a toxic effect. The BaP at the highest concentrations should become cytotoxic (12), and reaches a maximal threshold for inducing a response.

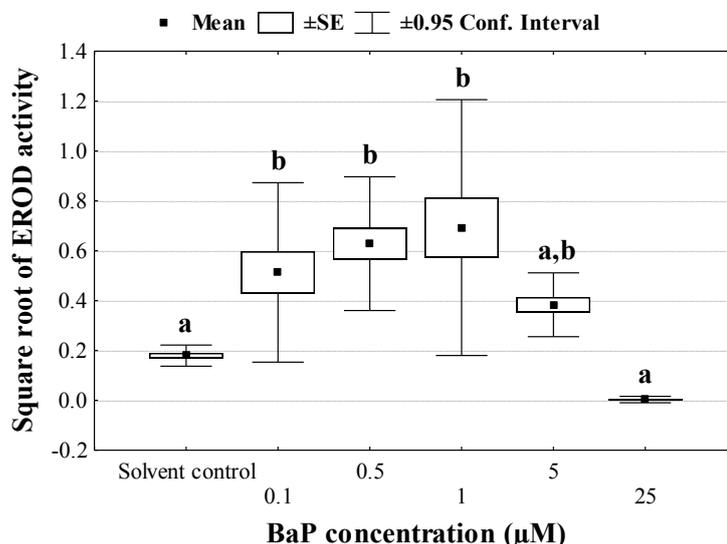


Figure 46 – Normalized EROD activity: square root of the EROD activity in pmol of resorufin formed per min and per 10^6 cells. Boxes denote standard errors and vertical bars denote 0.95 confidence intervals. Letters are grouping homogeneous groups (ANOVA, Tukey $p < 0.05$).

DNA strand break level following hepatocyte exposure

The levels of DNA strand breaks measured in hepatocytes exposed in flasks or in wells were not significantly different (ANOVA, $p > 0.05$). Whatever the mode of exposure, in flasks

(figure 47A) or in wells (figure 47B), the level of DNA strand breaks, expressed as the square root of the percentage of DNA in the comet tail, was significantly increased from the lowest exposure concentration of 0.1 μM . This genotoxic effect was not concentration-dependent: the level of DNA strand breaks was similar whatever the exposure concentration. The genotoxicity of BaP was already demonstrated in trout hepatocytes exposed *in vitro* to similar concentrations of BaP for one hour (17). In these conditions, a concentration-dependent increase in the DNA strand break levels was observed from an exposure concentration of 50 μM of BaP. In the present study, the lack of a concentration-dependent effect indicated that genotoxicity reached its higher level from the lowest exposure concentration. At this level, the antioxidant and DNA repair enzymes might be saturated. No correlation was found between the comet parameter and the EROD activity in hepatocytes exposed in flasks ($R=0.21$, $N=12$, $p>0.5$).

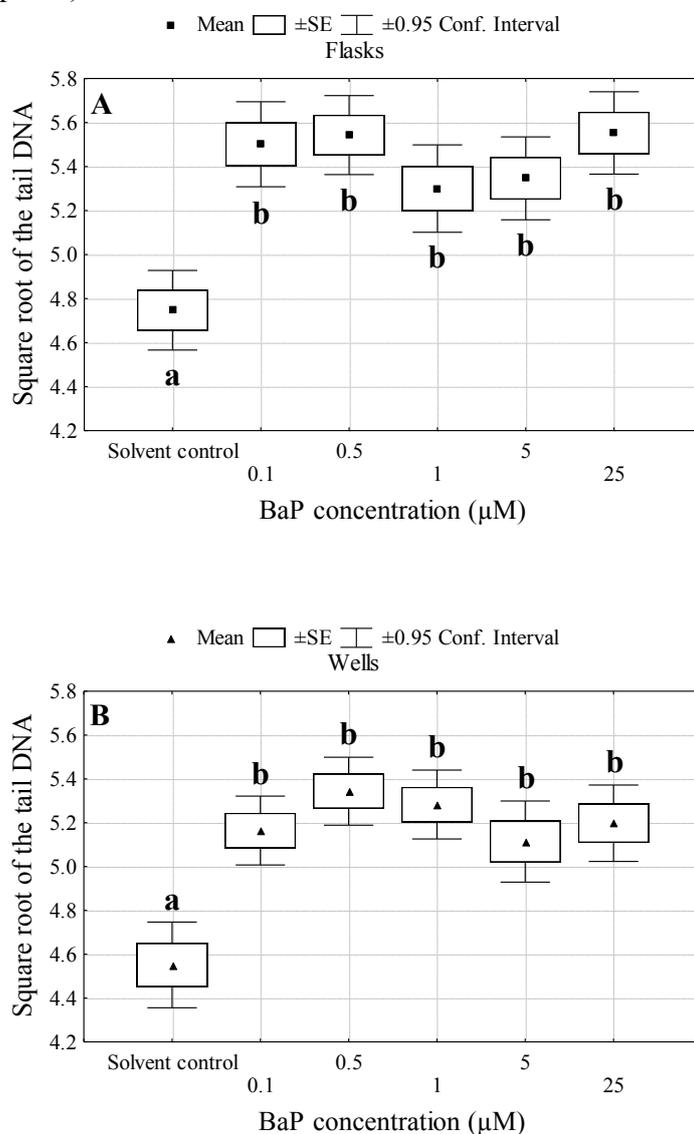


Figure 47 – Normalized comet parameter: square root of the percentage of DNA in the tail of the comet. A: Exposure in flasks; B: Exposure in wells. Boxes denote standard errors (SE) and vertical bars denote 0.95 confidence intervals. Letters are grouping homogeneous groups (Nested design ANOVA, Tukey $p<0.05$).

DNA adduct production following microsomal exposure

Whatever the exposure concentration (20 or 40 μM), the exposure of calf thymus DNA to BaP in the presence of sole liver microsomes lead to the formation of four bulky DNA adducts following 1 hr of incubation (Figure 48). In the English sole, the formation of DNA adducts was already demonstrated *in vivo* following a single exposure to BaP-contaminated food ($88 \mu\text{g BaP.kg}^{-1}$) (18). In higher vertebrates, the major adduct produced results from the addition of the BaP-diol-epoxide (BPDE) to the dGuo at the N2 position (19, 20). The autoradiograms obtained by exposing calf thymus DNA to BaP activated by sole microsomes showed similarity with the autoradiogram from the positive control obtained following exposure of calf thymus DNA to BaP-diol-epoxide. The comparison with calf thymus DNA containing BAP induced adducts allows to hypothesize that one of the four adducts produced in this study could be the BPDE-N2-dGuo adduct. The others may result from the adduction of BPDE to the other DNA bases, or could be isomers of the BPDE-dGuo adduct. These hypothesis will be verified by new experiments using mass spectrometry for determining the chemical structure of these adducts.

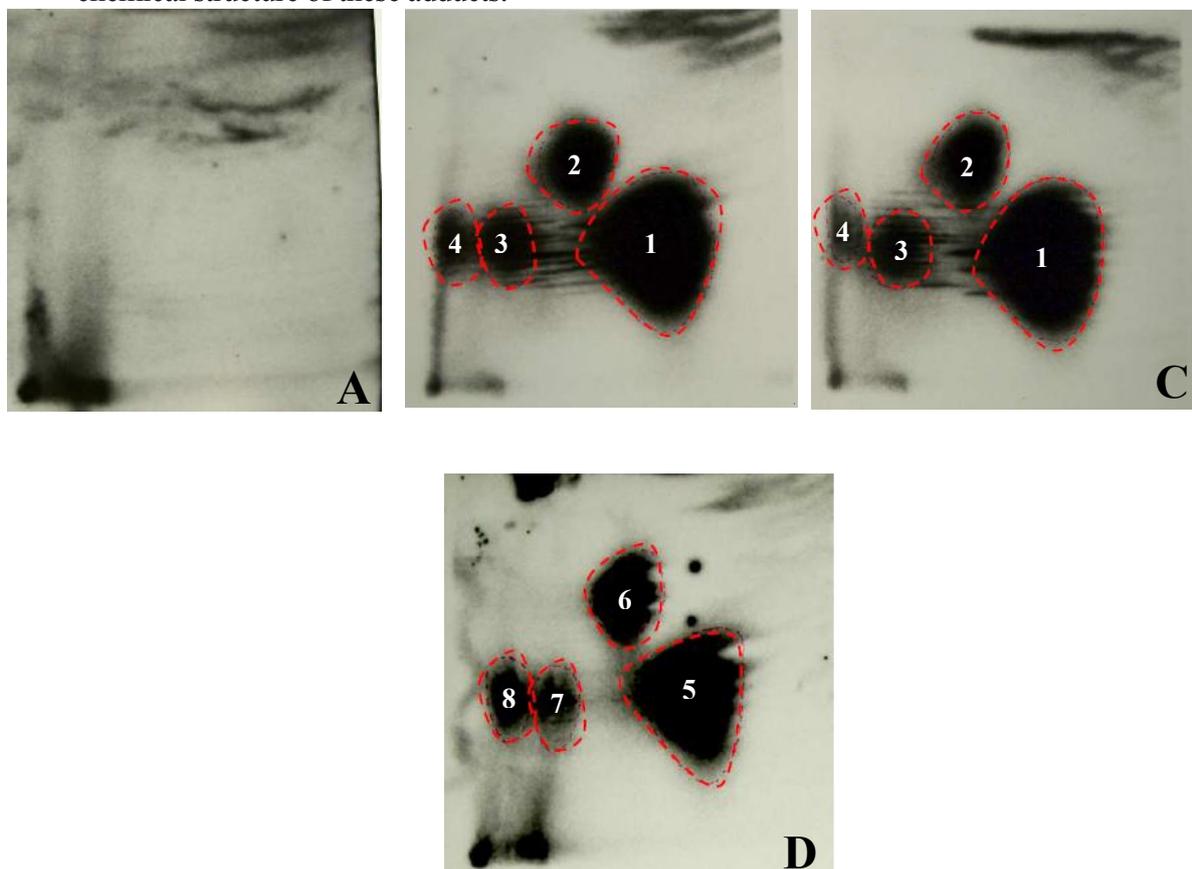


Figure 48 – Autoradiograms of ^{32}P -postlabeled DNA from BaP-exposed microsomes. A: Solvent control; B: Microsomes exposed to the 20 μM of BaP; C: Microsomes exposed to 40 μM of BaP; D: Calf thymus DNA exposed to BaP diol-epoxide used as a positive control.

CONCLUSION

This study demonstrates the ability of sole liver enzymes to metabolize BaP into reactive chemical species leading to DNA damage, such as bulky DNA adducts and DNA strand breaks. The enzymatic modulation and the genotoxicity induced by BaP seem to occur

through similar pathways as in higher vertebrates. The DNA adduct production seems to occur at least by the BPDE biotransformation pathway. Further experiments using mass spectrometry will be helpful for the chemical characterization of the produced adducts. The DNA strand breaks measured could result from DNA adduct repair mechanisms or from the production of reactive oxygen species (ROS). The level of DNA strand breaks measured in hepatocytes exposed in flasks or in wells are not significantly different, allowing the validation of a miniaturized exposure system in microplate wells. Because exposure in wells requires a smaller number of hepatocytes and a lower quantity of high value tested compounds, this exposure system will be used for the forthcoming study of the genotoxicity of some PAH metabolites.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the “Région Pays de la Loire” and the French Research Institute for Sea Exploitation (Ifremer) for the financial support of this work.

REFERENCES

1. Skarphéinsdóttir, H., G. Ericson, J. Svavarsson, and K. Næs. 2007. DNA adducts and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) tissue levels in blue mussels (*Mytilus* spp.) from Nordic coastal sites. *Marine Environmental Research* 64:479-491.
2. Cailleaud, K., J. Forget-Leray, L. Peluhet, K. LeMenach, S. Souissi, S. and H. Budzinski. 2009. Tidal influence on the distribution of hydrophobic organic contaminants in the Seine Estuary and biomarker responses on the copepod *Eurytemora affinis*. *Environmental Pollution* 157:64-71.
3. Xue, W. and D. Warshawsky. 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206:73-93.
4. Varanasi, U., and D. J. Gmur. 1980. Metabolic activation and covalent binding of Benzo[a]pyrene to deoxyribonucleic acid catalysed by liver enzymes of marine fish. *Biochemical Pharmacology* 29:753-761.
5. Sikka, H.C., J.P. Rutkowski, and C. Kandaswami. 1990. Comparative metabolism of benzo[a]pyrene by liver microsomes from brown bullhead and carp. *Aquatic Toxicology* 16 (2):101-111.
6. Steward, A. R., J. Zaleski, R.C. Gupta, and H.C. Sikka. 1989. Comparative metabolism of benzo[a]pyrene and -Benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by hepatocytes isolated from two species of bottom-dwelling fish. *Marine Environmental Research* 28, 137-140.
7. Ollivier, H., K. Pichavant-Rafini, E. Puill-Stephan, P. Calvès, L. Nonnotte, and G. Nonnotte. 2006. Effects of hyposmotic stress on exocytosis in isolated turbot, *Scophthalmus maximus*, hepatocytes. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 176:643-652.
8. Burke, M. D. and R.T. Mayer. 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal o-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos* 2:583-588.
9. Burgeot T. and D. Ménard. 2004. Mesure de l'activité enzymatique éthoxyrésorufine-O-dééthylase (ÉROD) chez les poissons marins. *Collection Méthodes d'analyse en milieu marin, Quae (Ed), Paris*, 28p.
10. Akcha, F., F. Vincent Hubert, and A. Pfol-Leszkowicz. 2003. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 534:21-32.
11. Le Goff, J., J. Gallois, L. Pelhuet, M.H. Devier, H. Budzinski, D. Pottier, V. André, and J. Cachot. 2006. DNA adduct measurements in zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, Pallas: Potential use for genotoxicant biomonitoring of fresh water ecosystems. *Aquatic Toxicology* 79:55-64.
12. Till, M., D. Riebinger, H.J. Schmitz, and D. Schrenk. 1999. Potency of various polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of CYP1A1 in rat hepatocyte cultures. *Chemico-Biological Interactions* 117:135-150.
13. Malmström, C. M., K. Koponen, P. Lindström-Seppä, and G. Bylund. 2004. Induction and localization of hepatic CYP4501A in flounder and rainbow trout exposed to benzo[a]pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58:365-372.
14. Bols, N. C., K. Schirmer, E. M. Joyce, D. G. Dixon, B. M. Greenberg, and J. J. Whyte. 1999. Ability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Induce 7-Ethoxyresorufin-o-deethylase Activity in a Trout Liver Cell Line. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44 (1):118-128.

15. Bosveld, A.T.C., P.A.F.de Bie, N.W. van den Brink, H. Jongepier, H., and A. V. Klomp. 2002. In vitro EROD induction equivalency factors for the 10 PAHs generally monitored in risk assessment studies in The Netherlands. *Chemosphere* 49 (1):75-83.
16. Fent, K., and R. Bätcher. 2000. Cytochrome P4501A induction potencies of polycyclic aromatic hydrocarbons in a fish hepatoma cell line: demonstration of additive interactions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (8):2047-2058.
17. Mitchelmore, C. L. and J. K. Chipman. 1998. Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Aquatic Toxicology* 41:161-182.
18. Varanasi, U., J.E. Stein, and T. Hom. 1981. Covalent binding of benzo[a]pyrene to DNA in fish liver. *Biochemical and biophysical research communications* 103:780-787.
19. Boysen, G. and S. S. Hecht. 2003. Analysis of DNA and protein adducts of benzo[a]pyrene in human tissues using structure-specific methods. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 543:17-30.
20. Chen, L., P.D. Devanesan, S. Higginbotham, F. Ariese, R. Jankowiak, G.J. Small, E.G. Rogan, and E.L. Cavalieri. 1996. Expanded Analysis of Benzo[a]pyrene DNA Adducts Formed in Vitro and in Mouse Skin; Their Significance in Tumor Initiation. *Chemical Research in Toxicology* 9 (5):897-903.

Article 4 – Genotoxic and enzymatic effects of fluoranthene in microsomes and freshly isolated hepatocytes from sole (*Solea solea*)

Submitted in Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis (MUTGEN-D-10-00219)

N. Wessel¹, D. Ménard¹, K. Pichavant-Rafini², H. Ollivier², J. Le Goff³, T. Burgeot¹, F. Akcha^{1*}

¹Ifremer, Département de Biogéochimie et Ecotoxicologie, Rue de l'Île d'Yeu, 44311 Nantes Cedex 03, France.

²Laboratoire Optimisation des Régulations Physiologiques, Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, 6 Avenue Le Gorgeu, CS 93837, 29238 Brest cedex, France.

³ADn'tox et Groupe Régional d'Etudes sur le CANcer, EA 1772 Université de Caen Basse Normandie, Centre François Baclesse, Avenue du Général Harris, 14076 Caen cedex 05, France.

*Corresponding author:

Farida Akcha

Ifremer, Department of Biogeochemistry and Ecotoxicology, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes 03, France

Tel : 33 2 40 37 42 08

Fax : 33 2 40 37 42 41

Mail : fakcha@ifremer.fr

Abstract

The Fluoranthene (Fluo) is one of the most abundant Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) in human food and in marine compartments. However, the existing data on its genotoxicity is poor and controversial. The aim of this study was to assess in vitro the potential genotoxicity of Fluo in sole and its possible effect on CYP450 modulation.

Freshly isolated hepatocytes were exposed for 24 hrs to a range of Fluo concentrations from 0.5 to 50 μM in both culture flasks and microplate wells. The ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity was measured as an indicator of the activity of the cytochrome P450 1A1 (CYP1A1). The genotoxic effects were evaluated by measuring both DNA strand breaks and DNA adducts by the alkaline comet assay and the postlabeling technique respectively. Calf thymus DNA was also exposed to Fluo in the presence of sole liver microsomes in order to check for Fluo DNA adduct formation.

In sole hepatocytes, Fluo was shown to induce a decrease of the EROD activity in a concentration-dependent manner. A significant genotoxic effect was observed in terms of DNA strand breakage from 5 μM exposure: genotoxicity was not concentration-dependent and was similar in flasks or in wells. One reproducible adduct was detected in the hepatocytes exposed to the highest concentrations of Fluo. Two reproducible adducts were detected in vitro following exposure of calf thymus DNA to 100 μM Fluo in the presence of sole microsomes. One of these adducts was detected when exposed to a higher concentration of 200 μM .

These results demonstrate the potential of sole hepatocytes to metabolize Fluo in 24 hrs into reactive species, able to induce genotoxicity by DNA strand breakage and DNA adduct formation. Moreover, a miniaturized cell exposure system was validated for further experiments using fewer amounts of hepatocytes and contaminants, and allowing exposure to PAH metabolites.

Key words: Fish ; genotoxicity ; fluoranthene ; EROD ; DNA adducts ; DNA strand breaks.

Abbreviations

ADL	Aldehydic DNA Lesions
AhR	Aryl hydrocarbon Receptor
AhRR	Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor
BaP	Benzo[a]pyrene
BET	Ethyidium Bromide
CYP1A1	Cytochrome P450 1A1
CYP450	Cytochrome P450
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EROD	Ethoxyresorufin-o-deethylase
FADE	Fluoranthene Diol Epoxide
FBS	Fetal Bovine Serum
Fluo	Fluoranthene
G6P	D-Glucose-6-Phosphate
G6P-DH	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase
ICES	International Council for the Exploration of the Sea
NADP	β -Nicotinamide adenine dinucleoside phosphate
OTM	Olive Tail Moment
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PBS	Phosphate Buffered Saline
RAL	Relative Adduct Level
TLC	Thin Layer Chromatography

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are widespread hydrophobic contaminants of freshwater and marine compartments and feature among the most widely studied organic pollutants in environmental toxicology and chemistry. Due to the wide range of toxic effects displayed by PAHs, they continue to be of great environmental concern. The input of PAHs in the marine environment is mainly of pyrolytic origin, with supplementary petrogenic inputs near harbors and oil refineries [1]. Moreover, acute exposure occurs during accidental oil spillage. Due to their hydrophobicity, PAHs are adsorbed on particulate matter, which is available for marine organisms [2], and can attain high concentrations near industrial sites in river estuaries [3]. Following absorption, PAHs are biotransformed by enzymatic processes in order to produce more water soluble compounds, facilitating biliary and urinary excretion [4,5]. Several activation pathways involving CYP450 enzymes are described for PAHs [6]. During biotransformation, certain metabolites are produced, which are known to be responsible for the toxicity associated with PAHs, such as genotoxicity [7,8]. In a laboratory experiment, the level of PAH metabolites in the bile was recently shown to correlate with the level of DNA damage as measured by DNA strand breaks in sole liver [9]. The most studied PAH is the benzo[a]pyrene (BaP), which is known to be highly genotoxic in marine organisms [7,10]. However, Fluo is more abundant than BaP in human food and environmental compartments. In the River Seine and the Seine Estuary, particulate Fluo concentrations appear to be approximately 1.3 times as high as BaP concentrations [11,3]. Due to its structure and to its presumed lower affinity with the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) compared to BaP [12], Fluo is mainly considered to be less genotoxic than BaP. In addition, its biotransformation pathways could be different. In fact, there is a paucity of literature concerning Fluo biotransformation pathways and its genotoxic effects upon marine organisms. Moreover, the existing data on Fluo genotoxicity is matter of some controversy which calls for an urgent need for data. Fluo features on the list of the 33 priority pollutants of the European Water Framework Directive (2000/60/CE), and is one of the 16 priority monitored PAHs of the United States Environmental Protection Agency.

Within this context, the aim of this study was to assess (i) the genotoxic effects (DNA strand breakage, DNA adduct formation) caused by Fluo following in vitro exposure of sole hepatocytes and microsomal incubations and (ii) its potential modulation of cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) by measuring the Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity. Two types of exposure (culture flasks and microplate wells) were conducted to check for the possible miniaturization of the cell culture exposure system.

The common sole (*Solea solea*) was selected for different reasons. Sole is a commercial fish species that presents an interest for consumers. Due to its benthic habitat and its nurseries located close to coastal and estuarine areas [13, 14], it could thus be used as a sentinel species for biomonitoring the marine environment [15].

Because of the predominant role of the liver in the biotransformation of PAHs [16], primoculture of fish hepatocytes are commonly used as a tool to detect multi-endpoint toxicity including DNA damage and CYP450 modulation [17]. Considered as a fast enzymatic

reactor, the hepatic microsomal fraction of sole was also exposed to Fluo in the presence of calf thymus DNA, in order to complete the data on the potential ability of Fluo to induce the formation of DNA adducts.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and materials

NaCl, KCl, MgSO₄, Na₂HPO₄, NaHCO₃, Hepes, EDTA, D-(+)-Glucose, CaCl₂, RPMI 1640 medium, dimethyl sulphoxide (DMSO), 0.4% trypan-blue solution, ethidium bromide (BET), normal and low melting point agarose, collagenase type IV (CAS No 9001-12-1), resorufin sodium salt, ethoxyresorufin, NADPH, fluoranthene, deoxyribonucleic acid (DNA) type XV from calf thymus, β-Nicotinamide adenine dinucleoside phosphate (NADP), D-glucose-6-phosphate disodium salt hydrate (G6P), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6P-DH) type IX, MgCl₂, and Tris base were purchased from Sigma Aldrich Chemicals. KH₂PO₄ was purchased from Fisher Scientific. DMEM/F-12, Fetal Bovine Serum (FBS), antibiotics (penicillin-streptomycin), antifungics (fungizone-ampotericin B) and Trypsin-EDTA were purchased from Gibco, Invitrogen. 75 cm²-tissue culture flasks were from Sarstedt, Inc. and 96 well-cell culture plates from Bibby sterilin LTD. The Bradford reagent (Bio-Rad protein assay) was purchased from Bio-Rad.

2.2 Hepatocyte exposure

2.2.1 Fish sampling

Wild fish were used for this study. Soles were trawled in a relatively low-polluted area of the Loire estuary in France. Fish were kept for 10 days in a 500 L tank in filtered sea-water at 18°C before starting the experiment.

2.2.2 Hepatocyte isolation

For this study, cells from 12 fish were used. Cells were isolated by collagenase digestion as adapted from Ollivier et al. [18]. Soles were sacrificed and the liver from each fish was immediately recovered and perfused via a cannula inserted into the hepatic portal vein with 10 mL of a 320 mosm.kg⁻¹ standard iso-osmotic solution (152 mM NaCl, 3.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 7H₂O, 0.33 mM Na₂HPO₄, 2H₂O, 0.44 mM KH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 10 mM Hepes; pH 7.63) at a flow rate of 0.5 mL.min⁻¹. The liver was then perfused with the same volume of iso-osmotic solution enriched with 0.6 mM EDTA at 0.5 mL.min⁻¹, and then with 15 mL of a collagenase solution (Type IV, 1 mg.mL⁻¹ in iso-osmotic solution) at 0.34 mL.min⁻¹. Following perfusion, the liver was minced using scalpel blades and filtered through 200, 85 and 48 μm nylon mesh screens. Cells were centrifuged for 4 min at 500 rpm at 4°C, and resuspended in 5 mL of iso-osmotic solution enriched with 5 mM glucose and 1.5 mM CaCl₂. Cells were maintained at least for 1 hr at 17°C in order to restore ionic concentrations on either side of the cell membrane.

2.2.3 Cell cultures and exposure

Cells from the all fish were pooled and their viability was assessed by a trypan blue exclusion test. Cells were further seeded in a tissue culture flask or in 96-well culture plates in a medium containing 90% DMEM, 10% foetal bovine serum (FBS) and supplemented with 2% penicillin-streptomycin as antibiotics and 2% fungizone-ampotericin B as antifungics. Each flask contained 24.5×10^6 cells in a final volume of 15 mL (concentration: 1.63×10^6 cells/mL), and each well contained 0.65×10^6 cells in a final volume of 200 μ L (concentration: 3.24×10^6 cells/mL). Cells were placed at 17°C for one night before starting the exposure. For the control and each tested Fluo concentrations, 3 replicates of flasks and wells were seeded. Cells were further exposed to 0.5, 1, 5, 25, and 50 μ M of Fluo dissolved in DMSO so that the solvent concentration in the medium was 0.5%. A microscopic observation checked for the absence of Fluo precipitation, both in flasks and in wells. Control incubations were performed using DMSO (0.5%). Flasks and 96-well plates were then slowly shaken for 40 min and kept at 17°C and for 24 hrs in the dark.

Following exposure, cell adhesion mainly occurred in flask, requiring a digestion step with trypsin. For each flask, the culture medium was recovered into a 50 mL Falcon[®] tube. The flask was then rinsed twice with 1X Phosphate Buffered Saline (PBS) and the PBS was recovered into the tube. Cell trypsination was then performed by adding 4 mL trypsin-EDTA (1X) into the flask. Following 15 min of gentle shaking, the trypsin action was stopped by adding 12 mL of culture medium and the total volume was recovered into the tube. Following tube centrifugation (15 min, 400 g, 4°C), the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 1 mL of freezing medium (55% RPMI 1640, 25% SVF, 20% DMSO). Further to a cell viability test, samples were divided into different sub-samples for EROD activity measurement, comet assay, and postlabeling technique.

For the exposure in wells, the same method was used by adjusting volumes and the incubation period. The trypsin action was performed with 50 μ L trypsin-EDTA (1X) during 8 min. The reaction was stopped by adding 150 μ L of culture medium, and the pellet obtained following centrifugation was resuspended in 100 μ L of freezing medium.

The samples were frozen in steps: 30 min at -20°C, one night at -80°C, and liquid nitrogen storage prior to analyses. Once defrosted, cell viability was determined for each sample by a trypan-blue exclusion test. In both cases, cell viability was at least equal to 75%, allowing the conduction of the comet assay.

2.2.4 Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity measurement

The EROD activity was measured using spectrophotometry directly on the cell suspension. Fluorometric measurement was performed with a microplate reader according to the modified method of Burke and Mayer [19], with excitation at 535 nm and emission at 580 nm. An external resorufin standard was used so as to calibrate the apparatus to convert the fluorescence units into picomolar quantities. Samples were defrosted on ice. For each sample, the measurement was performed on four replicates. Reaction was performed by adding NADPH as a cofactor in the reactional medium composed of 10 μ L of cell suspension in

phosphate buffer and 0.46 pmol of 7-ethoxyresorufin. The formation of resorufin was measured during 8 min of reaction. Specific activity is expressed in pmol of resorufin produced per min and per 10^6 cells.

2.2.5 Comet assay

The comet assay was performed on isolated cells as described by Akcha et al. [20]. Cell samples were gently defrosted at ambient temperature. Following centrifugation (300 g, 4 min, 4°C), supernatant was discarded and pellet resuspended in 55 μ L of PBS. For each sample, 30 μ L of the cell suspension was added to 225 μ L of a low melting-point agarose solution and used for the preparation of two slides. For each slide, 80 μ L of re-suspended solution was spread out on a slide with a cover glass, and then treated as previously described [20]. In order to obtain permanent preparations, the slides were immersed in absolute ethanol for dehydrating, and allowed to dry at room temperature. Just before analysis, 75 μ L of BET at 20 μ g.mL⁻¹ were deposited onto the slide and spread out using a cover glass. Slides were placed for at least 30 min at 4°C for coloration.

Slides were analyzed using an optical fluorescence microscope (Olympus BX60, x 40) coupled to a CDD camera (Olympus) and an image analysis system (Komet 4, Kinetic Imaging Ltd). Several parameters were calculated for each observed nucleus (75 nuclei/slide), including the percentage of DNA present in the comet tail and the Olive tail moment (OTM).

2.2.6 DNA adduct measurement

The postlabeling protocol used in this study was adapted from the protocol used by Le Goff et al. [21]. DNA from samples containing 11.6 to 17.8 x 10^6 hepatocytes was extracted by using a "Nucleospin Tissue" kit from Macherey-Nagel® and RNases A and T1. Due to the low amounts of DNA recovered, certain samples were mixed to make up 3 pools: DMSO incubation constitute the control, samples from exposures to 0.5 and 1 μ M were pooled to constitute the lower exposed pool, and samples exposed to 5, 25 and 50 μ M were pooled to form the higher exposed pool.

The DNA adduct analysis was conducted by ³²P postlabeling technique. A negative control (plasmidic DNA exempt of adduct) and a positive control (calf thymus DNA exposed to BaP-diol-epoxide) were conducted in parallel and whenever possible, the postlabeling was performed in duplicate. For each measurement, 5 μ g of DNA were used. DNA was hydrolyzed (3.5 hrs at 37°C) with micrococcal nuclease (0.7 μ g / 5 μ g DNA) and spleen phosphodiesterase (41.8 μ g / 5 μ g DNA) and pre-treated with nuclease P1 (5 μ g/5 μ g DNA) for 30 min at 37°C. The postlabeling was further enzymatically performed using ³²P-ATP (30 μ Ci/5 μ g DNA) and 10 U polynucleotide kinase (30 min, 37°C). Samples were separated by two-dimensional PEI-cellulose thin layer chromatography (TLC). Four solvents were used successively: D1: 1M sodium phosphate, pH 6.8; D2: 4.5 M lithium formate, 8.5 M urea, pH 3.5; D3: 1.6 M lithium chloride, 0.5 M Tris, 8.5 M urea, pH 8.0; D4: 1 M sodium phosphate, pH 6.8.

Autoradiograms were obtained after exposure of Kodak X-OMAT®/BIOMAX® films to the TLC-plates for 12 to 72 hrs.

2.3 Microsomal exposure

2.3.1 Fish sampling

Wild fish were used for this study. Soles were trawled in the Seine estuary in September 2007. Fish livers were sampled on freshly sacrificed fish and were stored in liquid nitrogen prior to microsome preparation.

2.3.2 Microsome preparation

Fish livers were thawed in ice and homogenized using a motor-driven glass potter homogenizer in phosphate buffer (K_2HPO_4/KH_2PO_4 100 mM, pH 7.4, 4°C; w/v=1/5) in accordance with the method described by Stagg and MacIntosh [22]. Homogenates were centrifuged at 4°C for 15 min at 9,000 g. The supernatants were recovered and ultracentrifuged at 105,000 g for 60 min at 4°C. Supernatants were discarded and microsomal pellets were resuspended in phosphate buffer solution with glycerol (K_2HPO_4/KH_2PO_4 100 mM, EDTA 1 mM, glycerol 20%). The protein concentration of each sample was measured by a colorimetric method [23] using bio-Rad protein assay reagent (absorbance at 595 nm) and samples were stored into liquid nitrogen prior to experiments.

2.3.3 Microsomal exposure

For each replicate, 1 mg of microsomal protein was exposed in the presence of 600 µg of calf thymus DNA, in a reactional medium made of 50 mM Tris-HCl, 5 mM $MgCl_2$ (pH 7.4) buffer solution, enriched with 1 mM of NADP, 5 mM of G6P, and 1 U of G6P-DH. The final volume of each sample was adjusted to 1 mL. After 2 min of pre-incubation at 29°C, known amounts of Fluo dissolved in DMSO were added so that the solvent concentration in the medium equaled 0.5%. Microsomes were exposed to Fluo at its previously determinate saturation concentration of 100 µM (unpublished results), and to a concentration (200 µM) twice as high. Control exposure was performed with DMSO (0.5%). Microsomes were exposed for 1 hr at 29°C, with agitation by vortex every 10 min. At the end of exposure, samples were transferred into a microtube containing 100 µL of SDS 10% and 600 µL of phenol. Following vigorous shaking, samples were centrifuged for 15 min at 10,000 g at 4°C. The aqueous phases were further recovered for DNA adducts analysis as described previously.

2.4 Statistical analysis

EROD activity and genotoxicity data were exploited by respectively performing an analysis of variances (ANOVA) and a nested design ANOVA, using Statistica 6.0 (Statsoft. Inc). Normalization was performed by mathematical processing (\sqrt{x}) and normality of the data was checked (normal p-plot). An *a posteriori* test (Tuckey's test) was performed each time a significant difference was ascertained.

3. Results

3.1 Hepatocyte exposure

3.1.1 EROD activity

Results, expressed as a percentage relating to the control group are described in Figure 49. The normalized EROD activity (\sqrt{x}) was significantly decreased by Fluo from the lowest exposure concentration of 0.5 μM ($p < 0.01$). This decrease in activity seemed to occur in a concentration-dependent manner, and was the most significant for the highest exposure concentrations ($p < 0.05$).

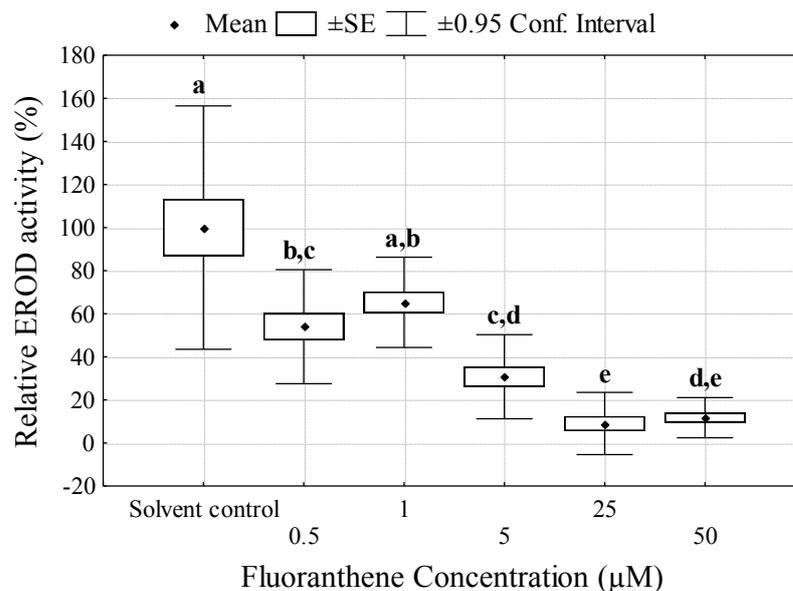


Figure 49 – EROD activity of sole hepatocytes exposed in flasks to Fluo during 24 hrs. Values are expressed as a percentage relative to the mean of the control group. Boxes denote standard error and vertical bars denote 95 % confidence interval. Letters are grouping homogenous groups (ANOVA, Tukey test $p < 0.05$).

3.1.2 DNA strand breakage

In order to normalize the data, results are expressed in the square root of the DNA contained in the comet tail (Figure 50). A significant genotoxic effect of Fluo was observed for both exposure mode in flask or wells ($p < 0.01$). In each case, this effect was not concentration-dependent.

Except at 0.5 μM exposure ($p < 0.05$), the levels of DNA strand breaks were similar following exposure in flasks or in wells. A genotoxic effect is confirmed in both cases from the exposure concentration of 5 μM . In wells, a genotoxic effect was observed at the lowest concentration of 0.5 μM that is the only concentration for which differences were observed between the different exposure modes. As a consequence, the genotoxic effect observed at this concentration requires confirmation.

Considering the results obtained following flask exposure, no correlation between DNA strand breaks and EROD activity was observed ($R = -0.51$, $N = 15$, $p > 0.05$).

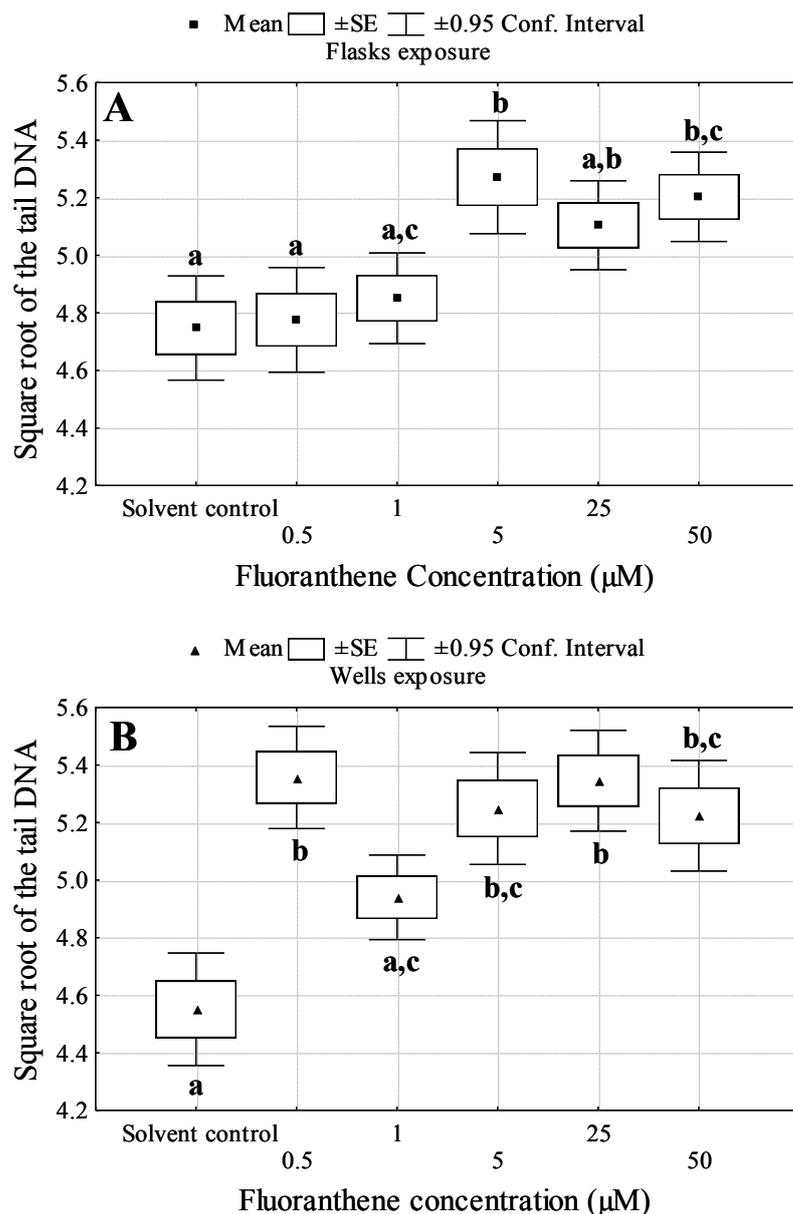


Figure 50 – DNA strand break level following 24 hrs of exposure to Fluo in flasks (A) or wells (B). Boxes denote standard error and vertical bars denote 95 % confidence interval. Letters are grouping homogenous groups (Nested ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$).

3.2 DNA adduct measurement

3.2.1 Microsome exposure

The results are described in Figure 51. The microsomes exposed to 100 μM of Fluo showed the reproducible formation of two adducts (#2 and #3) in calf thymus DNA. The autoradiograms obtained following exposure to 200 μM of Fluo showed the formation of only one reproducible adduct (#4).

Despite these qualitative differences, the Relative Adduct Level (RAL) (Table 24) showed no quantitative significant difference between solvent control and Fluo exposed samples ($p > 0.5$), probably due to the low production of one adduct in one of the two postlabeling assay for the solvent control.

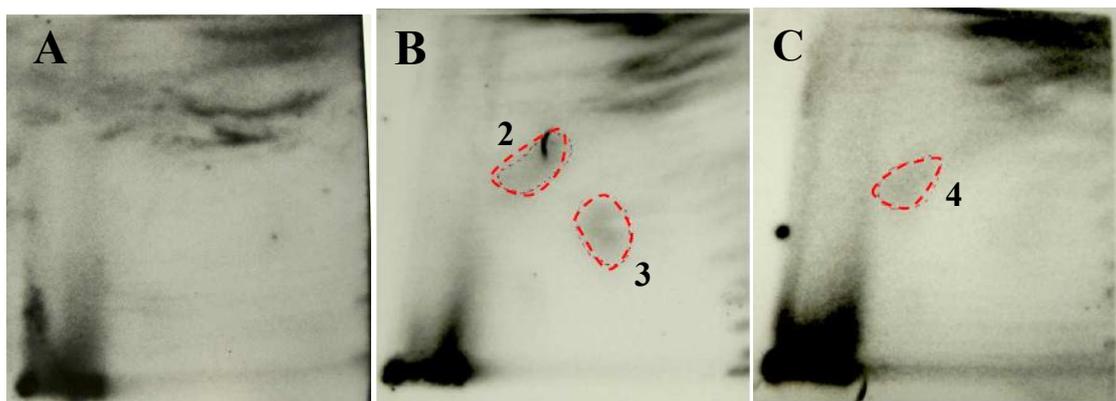


Figure 51 – Autoradiograms of ^{32}P -postlabeled DNA from Fluo-exposed microsomes. **A:** Solvent control; **B:** Microsomes exposed to 100 μM Fluo; **C:** Microsomes exposed to 200 μM Fluo.

3.2.1 Hepatocyte exposure

The results indicated a significant, reproducible, and exposure-dependent formation of one adduct following 24 hrs-exposure of sole hepatocytes to Fluo (Figure 52) ($p < 0.01$). This adduct (#1) was detected for the highest exposure concentrations in the two post-labeling experiments. Its mean RAL (Table 24) was $0.49 \text{ RAL} \times 10^{-8}$ that remained quite low compared to published data on PAH adduct levels measured *in vitro*.

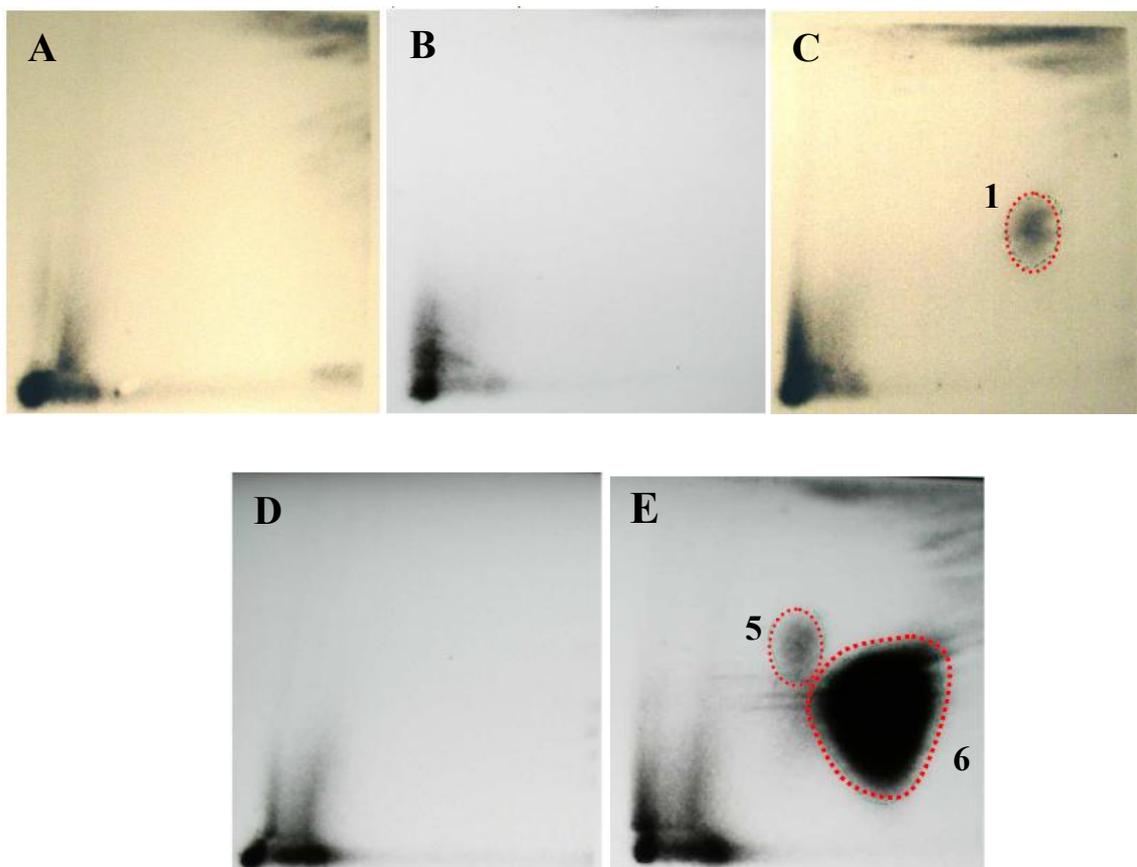


Figure 52 – Autoradiograms of ^{32}P -postlabeled DNA from Fluo-exposed hepatocytes. **A:** Solvent control (DMSO); **B:** Hepatocytes exposed to the lower concentrations of Fluo; **C:** Hepatocytes exposed to the higher concentrations of Fluo; **D:** Plasmidic DNA used as a negative control; **E:** Thymus DNA exposed to BaP diol-epoxide used as a positive control.

Table 24 – Mean of Relative Adduct Level (RAL) following Fluo exposure. * denote samples for which only one postlabeling was performed.

Biological Matrice	Condition	Fluo Concentration (μM)	Mean RAL (RAL.10 ⁻⁸)
Microsomes	DMSO control	0	1.06 \pm 1.44
	Fluo	100	1.62 \pm 0.68
	Fluo	200	0.48 \pm 0.20
Hepatocytes	DMSO control	0	0.01*
	Fluo	low (0.5 and 1 μM)	0.01*
	Fluo	high (2, 25 and 50 μM)	0.49 \pm 0.05

4. Discussion

4.1 Enzymatic activity

In the present study, the EROD activity of sole hepatocytes decreased in a concentration-dependent manner following Fluo exposure. The EROD is a representative enzyme of the CYP450 monooxygenase family, regulated by the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) [24], known to be involved in the PAH phase I biotransformation process [6, 25, 26]. The inhibition of EROD activity could be achieved by two possible mechanisms. The first one involves a direct competitive or non-competitive interaction of Fluo with the enzyme molecule. In human, it was already shown *in vitro* that Fluo directly inhibit P450 1A1, P450 1A2 and P450 1B1 EROD activity [27]. The second possible mechanism involves an interaction at the gene transcription level. In fact, in some cases, the inhibition of EROD activity could be due to a weak binding of Fluo to AhR, leading to the repression of the CYP1A by inducing the AhR repressor (AhRR), which acts as a negative regulator of the AhR function [28]. When PAHs are present in mixture, a competition for AhR binding may exist. As a result of the AhR signaling pathways, the genes responsible for the induction of EROD can be activated or repressed [29]. Because Fluo is a weak AhR-ligand [30], the EROD inhibition observed in this study is rather expected to result from direct interaction with the enzyme than to AhR-mediated gene modulation.

The modulation of EROD activity by Fluo is a matter of debate and each time an effect was observed, it generally occurred at a low level. In fish, Fluo was considered as a weak inducer in a hepatoma cell line from *Poeciliopsis lucida* exposed for 24 hrs to 125 μM Fluo [31], while it didn't induce any modulation of EROD activity in trout liver cell line or primary hepatocytes exposed for 24 hrs to Fluo concentrations close to the concentrations used in this paper [32, 33]. In the *Fundulus heteroclitus*, no modulation of EROD activity was observed during both *in vitro* and *in vivo* exposure to Fluo [34]. However, when fish were co-exposed to Fluo and BaP, the BaP induction of both EROD activity and CYP1A protein synthesis decreased due to the presence of Fluo. Similar results were observed following co-exposure to BaP and Fluo of zebrafish or killifish embryos from relatively low-polluted areas [35, 36]. The authors suggest that the Fluo may inhibit EROD activity *in vivo* by down regulating the

CYP1A protein. In higher vertebrates, a modest induction of the EROD activity was observed following exposure of rat hepatoma H4IIE cell lines or human liver slices exposed for 24 hrs [30, 37, 38]. On the contrary, Fluo was considered as ineffective in rat liver and lung slices exposed respectively to ranges of Fluo concentrations from 1 to 100 μM for 24 hrs and from 0.25 to 5 μM for 48 hrs [30].

In higher vertebrates, most of the conducted studies on the Fluo biotransformation were performed *in vitro*, and suggest the involvement of other CYP450 isoforms than the most studied CYP1A1, 1A2, and 1B1. Fluo was found to inhibit *in vitro* the human CYP1A2 and CYP1B1 with respective IC_{50} of 14 and 15 nM, whereas the CYP1A1 was inhibited at higher concentrations ($>1 \mu\text{M}$) [39], suggesting the main involvement of other CYP450 isoforms. In this study, it would be worth studying the expression and activity levels of other CYP isoforms, like the CYP3A, which is also regulated by the AhR.

4.2 Genotoxic effects

4.2.1 DNA strand breaks

Despite the inhibition of EROD activity by Fluo exposure, the genotoxic effects measured in this study demonstrate the ability of sole hepatocytes to metabolize Fluo into reactive species. This genotoxicity may occur through the production of reactive oxygen species (ROS) [40] that can damage the DNA leading to DNA strand breakage. In the case of PAHs, oxidative DNA damage such as DNA base oxidation has already been reported [41, 42]. Moreover, several of the PAH metabolites formed during their biotransformation are able to bind covalently to DNA or proteins to form adducts [43]. The incomplete excision repair of both these types of DNA damage also causes DNA strand breakage detected by the comet assay [44].

As for EROD activity, data available on the genotoxic effects of Fluo is poor and equivocal. In fish, almost no data on the genotoxicity of Fluo is available. In flounder, a concentration-dependent increase in DNA strand breaks was observed in blood cells exposed *in vitro* to Fluo from a concentration of 0.25 μM [45].

Most of the studies conducted on Fluo genotoxicity were performed in higher vertebrates. *In vitro*, the genotoxicity of Fluo was observed mainly when exposure was conducted on pre-treated or co-exposed cells with other organic pollutants known to have a high affinity with AhR [46, 47]. The PCB induction allowed the HepG2 cells to metabolize Fluo into reactive metabolites that lead to sister chromatid exchanges in human lymphocytes. Fluoranthene was also shown to induce HPRT mutation and DNA strand breaks in Chinese hamster ovary cells at the same level than did BaP [48]. The exposure of microsomes from rodent pre-treated with PCB resulted in the major formation of mutagenic metabolites such as Fluo-2,3-diol and Fluo-2,3-dione [48, 49].

More controversial results have been published on Fluo genotoxicity when used alone, with suspected species-dependent patterns. In humans, no DNA damage was observed in cell lines exposed to Fluo or one of these metabolites, the 2,3-dione-Fluo [50, 51]. To the opposite, a significant aldehydic DNA lesions level was induced in calf thymus DNA from an exposure

concentration of 5 μM for 2 hrs [51]. *In vitro*, differences were observed in the stereoselective formation of the major Fluo metabolite, the trans-2,3-dihydrodiol, between rat and human microsomes [52] which could partly explain the differences in the toxic response, in particular the lack of Fluo genotoxicity in Human. In fact, the mutagenic activity of the 2R,3R-trans-dihydrodiol-Fluo which is most produced in rat is higher than the activity of the 2S,3S-trans-dihydrodiol-Fluo, which is predominantly formed in human [52].

The genotoxic effects observed in the present work, despite the EROD activity decreased suggest the activation of Fluo by sole hepatocytes through the action of enzymes other than those that are CYP1A dependent.

Except for one exposure concentration, the genotoxicity observed with the two modes of exposure was very close, which made it possible to validate the miniaturization of the cell exposure system. This validation was necessary in order to obtain the forthcoming perspective for comparing the genotoxicity of different Fluo and other PAH metabolites that can only be tested in low quantities due to their high value.

4.2.2 DNA adducts

The results of this study demonstrated the ability of Fluo to be bioactivated into electrophilic metabolites able to covalently bind to the DNA. In fact, certain reproducible adducts were detected following the exposure of microsomes or hepatocytes to relatively high concentrations of Fluo. All the adduct analysis were performed by applying the same DNA extraction and postlabeling protocols. As a consequence, it was possible to compare the autoradiograms from different samples and exposure modes. It is thus possible to suggest that some of the detected spots may represent the same adduct. Because spots #2 and #4 (Figure 4) seem to follow the same migration pattern, they could therefore represent the same adduct that was produced during microsomal exposure to Fluo. Spots #1 and #3 (Figures 3 and 4) produced respectively during hepatocyte and microsomal exposure could represent another adduct. This latter adduct did not appear in the autoradiograms of the microsomes exposed to 200 μM Fluo, but an adduct with close migration parameters was detected in one of the two postlabeling in the solvent control of microsomal exposure, that could be the same adduct produced artefactually.

In fish, there is almost no data on the potential formation of DNA adducts by Fluo. Following a single intraperitoneal injection of 5 or 50 mg/kg of Fluo to the fish *Fundulus heteroclitus*, no adduct was detected after 4 days of treatment [34]. More studies are available in higher vertebrates. Following *in vitro* exposure to 100 μM of Fluo, Babson et al. [53] demonstrated the formation of two adducts in Aroclor-activated rat microsomes, suggesting that the major activation pathways of Fluo involves the formation of the 2,3-diol-Fluo which is further metabolized to the anti-Fluo-2,3-diol-1,10b-epoxide. This metabolite is considered as a direct acting mutagen that reacts with exocyclic nitrogen of deoxyguanosine of DNA to form the 10b-(deoxyguanosine-N2-yl)-1,2,3-trihydroxy-1,2,3,10b-tetrahydrofluoranthene. A second DNA adduct was detected, and supposed to be a diastereomer of the major adduct. The formation of two DNA adducts was later confirmed during similar exposures to 70-100 μM of Fluo by HPLC coupled to ^{32}P postlabeling [54]. The major adduct formed derived from anti-

2,3-dihydroxy-1,10b-epoxy-1,2,3-trihydrofluoranthene (anti-FADE) and the minor adduct was identified as its syn-isomer. Contrary to this, no adduct was detected in human HepG2 cells exposed to a maximum concentration of 30 μM of Fluo for 6 hrs [55]. *In vivo* exposure made it possible to identify certain target organs. Following chronic exposure of rat, a major adduct was formed at similar levels in the liver, kidney, lung, heart and small intestine and identified as the same major adduct formed *in vitro* resulting of adduction of anti-FADE to N2-deoxyguanosine. In parallel, a single exposure to Fluo at 177 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ induced this DNA adduct formation only in lung [56]. Similar results were obtained following the exposure of rat and mice, indicating the major formation of the anti-FADE DNA adduct, and in a minor way of an unidentified deoxyguanosine adduct which could derived from the syn-FADE metabolite [57, 58].

In the case of the sole, our results suggest the production of two DNA adducts following *in vitro* Fluo bioactivation, which could be the anti-FADE-N2-deoxyguanosine and the syn-FADE-N2-deoxyguanosine adducts.

5. Conclusions

Following exposure of sole hepatocytes to a range of Fluo concentrations, EROD activity significantly decreased in a concentration-dependant manner, that could be explained by a direct interaction of Fluo with the EROD enzyme. However, Fluo was shown to display genotoxic effects in sole hepatocytes as measured by DNA strand breakage from an exposure concentration of 5 μM . Fluo genotoxicity also occurred through the exposure-dependant formation of one adduct, resulting from the covalent binding to the DNA of an electrophilic Fluo metabolite. An additional adduct was also detected during *in vitro* exposure of a sole microsomal fraction to Fluo. As in higher vertebrates, these adducts could result from the adduction of the anti-2,3-Fluoranthene-Diol-Epoxide to the N2 of the deoxyguanosine. Further experiments using mass spectrometry analysis are required to provide more information pertaining to the chemical structure of these adducts.

These results demonstrate the ability of sole hepatocytes to metabolize the Fluo into reactive species, which could generate DNA strand breakage and DNA adducts. The metabolism of Fluo may occur through the binding of Fluo to the AhR, leading to the repression of CYP1A gene expression, and to EROD inhibition. Other CYP450 families also regulated by AhR should be explored for a better understanding of Fluo activation pathways.

Fluo exposures were conducted in parallel in culture flasks and microplate wells and the levels of DNA strand breakage measured were very close between the two modes of exposure. The validation of a miniaturized exposure system will make it possible to compare the genotoxicity of Fluo and some of its metabolites in order to better assess the genotoxic potential of Fluo and to identify its bioactivation pathways.

References

- [1] H. Skarphéinsdóttir, G. Ericson, J. Svavarsson, K. Næs, DNA adducts and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) tissue levels in blue mussels (*Mytilus spp.*) from Nordic coastal sites. Mar. Environ. Res. 64 (2007) 479-491.

- [2] K. Cailleaud, J. Forget-Leray, L. Peluhet, K. LeMenach, S. Souissi, H. Budzinski, Tidal influence on the distribution of hydrophobic organic contaminants in the Seine Estuary and biomarker responses on the copepod *Eurytemora affinis*. *Environ. Poll.* 157 (2009) 64-71.
- [3] M.B. Fernandes, M.A. Sicre, A. Boireau, J. Tronczynski, Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *Mar. Poll. Bull.* 34 (1997) 857-867.
- [4] J.P. Meador, J. Buzitis, C.F. Bravo, Using fluorescent aromatic compounds in bile from juvenile salmonids to predict exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 845-853.
- [5] R. Van der Oost, J. Beyer, N.P.E. Vermeulen, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13 (2003) 57-149.
- [6] T. Shimada, Xenobiotic-Metabolizing Enzymes Involved in Activation and Detoxification of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21 (2006) 257-276.
- [7] F. Akcha, T. Burgeot, J.F. Narbonne, P. Garrigues, Metabolic Activation of PAHs: Role of DNA Adduct Formation in Induced Carcinogenesis, in: Douben, P.E.T. (Eds.), PAHs: An ecotoxicological perspective. Wiley, Chichester, West Sussex, UK, 2003, pp. 65-79.
- [8] W. Xue, D. Warshawsky, Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206 (2005) 73-93
- [9] N. Wessel, R. Santos, D. Menard, K. Le Menach, V. Buchet, N. Lebayon, V. Loizeau, T. Burgeot, H. Budzinski, F. Akcha, Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). *Mar. Environ. Res.* *In press*.
- [10] U. Varanasi, D.J. Gmur, Metabolic activation and covalent binding of Benzo[a]pyrene to deoxyribonucleic acid catalysed by liver enzymes of marine fish. *Biochem. Pharmacol.* 29 (1980) 753-761.
- [11] K. Cailleaud, J. Forget-Leray, S. Souissi, D. Hilde, K. LeMenach, H. Budzinski, Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (*Calanoïda, copepoda*). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70 (2007) 270-280.
- [12] M. Machala, J. Vondráček, L. Bláha, M. Ciganek, J. Neca, Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. Mutat.* 497 (2001) 49-62.
- [13] O. Le Pape, F. Chauvet, S. Mahévas, P. Lazure, D. Guérault, Y. Désaunay, Quantitative description of habitat suitability for the juvenile common sole (*Solea solea*) in the bay of biscay (France) and the contribution of different habitats to the adult population. *J. Sea. Res.* 50 (2003) 139-149.

- [14] S. Rochette, E. Rivot, J. Morin, S. Mackinson, P. Riou, O. Le Pape, Effect of nursery habitat degradation on flatfish population: application to solea solea in the Eastern channel (Western Europe). *J. Sea. Res.* 64 (2010) 34-44.
- [15] JAMP, Guidelines for contaminant-specific biological effects. OSPAR convention for the protection of the marine environment of the North East Atlantic. 2009, 48 pp.
- [16] K.L. Wall, W. Gao, J.M.T. Koppele, G.Y. Kwei, F.C. Kauffman, R.G. Thurman, The liver plays a central role in the mechanism of chemical carcinogenesis due to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 12 (1991) 783-786.
- [17] K.E. Tollefsen, E. Bratsberg, O. Bøyum, E.F. Finne, I.K. Gregersen, M. Hegseth, C. Sandberg, K. Hylland, Use of fish *in vitro* hepatocyte assays to detect multi-endpoint toxicity in Slovenian river sediments. *Mar. Environ. Res.* 62 (2006) S356-S359.
- [18] H. Ollivier, K. Pichavant-Rafini, E. Puill-Stephan, P. Calvès, L. Nonnotte, G. Nonnotte, Effects of hyposmotic stress on exocytosis in isolated turbot, *Scophthalmus maximus*, hepatocytes. *J. Comp. Physiol., B* 176 (2006) 643-652.
- [19] M.D. Burke, R.T. Mayer, Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal o-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug. Metab. Dispos.* 2 (1974) 583-588.
- [20] F. Akcha, F. Vincent Hubert, A. Pfhof-Leszkowicz, Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of *in situ* exposure to genotoxic compounds. *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 534 (2003) 21-32.
- [21] J. Le Goff, J. Gallois, L. Pelhuet, M.H. Devier, H. Budzinski, D. Pottier, V. André, J. Cachot, DNA adduct measurements in zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, Pallas: Potential use for genotoxicant biomonitoring of fresh water ecosystems. *Aquat. Toxicol.* 79 (2006) 55-64.
- [22] R. Stagg, A. McIntosh, Biological effects of contaminants: determination of CYP1A-dependent mono-oxygenase activity in dab by fluorimetric measurement of EROD activity. *ICES Tech. Mar. Environ. Sci.* 23 (1998) 16 pp.
- [23] M. Bradford, A rapid method quantification of protein utilising the principle dried binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-264.
- [24] M. Till, D. Riebinger, H.J. Schmitz, D. Schrenk, Potency of various polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of CYP1A1 in rat hepatocyte cultures. *Chem-Biol. Inter.* 117 (1999) 135-150.
- [25] T.K. Collier, S.D. Connor, B.T.L. Eberhart, B.F. Anulacion, A. Goksoyr, U. Varanasi, Using cytochrome P450 to monitor the aquatic environment: Initial results from regional and national surveys. *Mar. Environ. Res.* 34 (1992) 195-199.
- [26] R.M. Stagg, J. Rusin, M.E. McPhail, A.D McIntosh, C.F. Moffat, J.A. Craft, Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on expression of CYP1A in salmon (*Salmo salar*)

following experimental exposure and after the Braer oil spill. *Environ. Toxicol. Chem.* 19 (2000) 2797-2805.

[27] T. Shimada, N. Murayama, K. Okada, Y. Funae, H. Yamazaki, F.P. Guengerich, Different Mechanisms for Inhibition of Human Cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by Polycyclic Aromatic Inhibitors. *Chem. Res. Toxicol.* 20 (2007) 489-496.

[28] M.E. Hahn, Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem-Biol. Inter.* 141 (2002) 131-160.

[29] M.E. Hahn, R.R. Merson, S.I. Karchner, T.P. Mommsen, T.W. Moon, Chapter 7 Xenobiotic receptors in fish: Structural and functional diversity and evolutionary insights, in: Moon, T.,W., Mommsen, T.,W. (Eds.), *Biochemical and molecular biology of fishes*, Vol 6- Environmental Toxicology, 2005 pp. 191-228.

[30] D.S. Pushparajah, M. Umachandran, T. Nazir, K.E. Plant, N. Plant, D.F.V. Lewis, C. Ioannides, Up-regulation of CYP1A/B in rat lung and liver, and human liver precision-cut slices by a series of polycyclic aromatic hydrocarbons; association with the Ah locus and importance of molecular size. *Toxicol. in Vitro* 22 (2008) 128-145.

[31] K. Fent, R. Bätcher, Cytochrome P4501A induction potencies of polycyclic aromatic hydrocarbons in a fish hepatoma cell line: demonstration of additive interactions. *Environ. Toxicol. Chem.* 19 (2000) 2047-2058.

[32] N.C. Bols, K. Schirmer, E.M. Joyce, D.G. Dixon, B.M. Greenberg, J.J. Whyte, Ability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Induce 7-Ethoxyresorufin-o-deethylase Activity in a Trout Liver Cell Line. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 44 (1999) 118-128.

[33] A. Behrens, K. Schirmer, N.C. Bols, H. Segner, Polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of cytochrome P4501A enzyme activity in the rainbow trout liver cell line, RTL-W1, and in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (2001) 632-643.

[34] K.L. Willett, D. Wassenberg, L. Lienesch, W. Reichert, R.T. Di Giulio, *In Vivo* and *in Vitro* Inhibition of CYP1A-Dependent Activity in *Fundulus heteroclitus* by the Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Fluoranthene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 177 (2001) 264-271.

[35] C.W. Matson, A.R. Timme-Laragy, R.T. Di Giulio, Fluoranthene, but not benzo[a]pyrene, interacts with hypoxia resulting in pericardial effusion and lordosis in developing zebrafish. *Chemosphere* 74 (2008) 149-154.

[36] L.P. Wills, S. Zhu, K.L. Willett, R.T. Di Giulio, Effect of CYP1A inhibition on the biotransformation of benzo[a]pyrene in two populations of *Fundulus heteroclitus* with different exposure histories. *Aquat. Toxicol.* 92 (2009) 195-201.

[37] A.T.C. Bosveld, P.A.F. De Bie, N.W. Van den Brink, H. Jongepier, A.V. Klomp, *In vitro* EROD induction equivalency factors for the 10 PAHs generally monitored in risk assessment studies in The Netherlands. *Chemosphere* 49 (2002) 75-83.

- [38] K.L. Willett, K. Randerath, G.D. Zhou, S.H. Safe, Inhibition of CYP1A1-Dependent Activity by the Polynuclear Aromatic Hydrocarbon (PAH) Fluoranthene. *Biochem. Pharmacol.* 55 (1998) 831-839.
- [39] T. Shimada, F.P. Guengerich, Inhibition of Human Cytochrome P450 1A1-, 1A2-, and 1B1-Mediated Activation of Procarcinogens to Genotoxic Metabolites by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Chem. Res. Toxicol.* 19 (2006) 288-294.
- [40] H.F. Ji, L. Shen, Mechanisms of reactive oxygen species photogeneration by benzo[a]pyrene: A DFT study. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* 893 (2009) 6-8.
- [41] J.H. Park, A.B. Troxel, R.G. Harvey, T.M. Penning, Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) o-quinones produced by the Aldo-Keto-Reductases (AKRs) generate abasic sites, oxidized pyrimidines, and 8-Oxo-dGuo via reactive oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.* 19 (2006) 719-728.
- [42] L.J. Marnett, Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21 (2000) 361-370.
- [43] B. Moorthy, K.P. Miller, W.W. Jiang, E.S. Williams, S.R. Kondraganti, K.S. Ramos, Role of cytochrome P4501B1 in benzo[a]pyrene bioactivation to DNA-binding metabolites in mouse vascular smooth muscle cells: Evidence from P-32-postlabeling for formation of 3-hydroxybenzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-3,6-quinone as major proximate genotoxic intermediates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305 (2003) 394-401, 10.1124/jpet.102.044271.
- [44] T. Godard, E. Deslandes, F. Sichel, J.-M. Poul, P. Gauduchon, P., Detection of topoisomerase inhibitor-induced DNA strand breaks and apoptosis by the alkaline comet assay. *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 520 (2002) 47-56.
- [45] S. Woo, S. Kim, S. Yum, U.H. Yim, T.K. Lee, Comet assay for the detection of genotoxicity in blood cells of flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to sediments and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar. Poll. Bull.* 52 (2006) 1768-1775.
- [46] C.C. Abnet, R.L. Tanguay, W. Heideman, R.E. Peterson, Transactivation Activity of Human, Zebrafish, and Rainbow Trout Aryl Hydrocarbon Receptors Expressed in COS-7 Cells: Greater Insight into Species Differences in Toxic Potency of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxin, Dibenzofuran, and Biphenyl Congeners. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 159 (1999) 41-51.
- [47] E.V. Hestermann, J.J. Stegeman, M.E. Hahn, Relative Contributions of Affinity and Intrinsic Efficacy to Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Potency. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168 (2000) 160-172.
- [48] C. Vaca, M. Törnqvist, U. Rannung, K. Lindahl-Kiessling, G. Ahnström, L. Ehrenberg, On the bioactivation and genotoxic action of fluoranthene. *Arch. Toxicol.* 66 (1992) 538-545.
- [49] J.R. Babson, S.E. Russo-Rodriguez, R.V. Wattley, Microsomal activation of fluoranthene to mutagenic metabolites. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 85 (3) (1986) 355-366.

- [50] Z. Baoying, H. Huey-Min, Y. Hongtao, E. Stephen, DNA damage produced in HaCaT cells by combined fluoranthene exposure and ultraviolet A irradiation. *Environ. Mol. Mutagen.* 44 (2004) 151-155.
- [51] J. Zielinska-Park, J. Nakamura, J.A. Swenberg, M.D. Aitken, Aldehydic DNA lesions in calf thymus DNA and HeLa S3 cells produced by bacterial quinone metabolites of fluoranthene and pyrene. *Carcinogenesis* 25 (2004) 1727-1733.
- [52] B.W. Day, Y. Sahali, D.A. Hutchins, M. Wildschutte, R. Pastorelli, T.T. Nguyen, S. Naylor, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, Fluoranthene metabolism: Human and rat liver microsomes display different stereoselective formation of the trans-2,3-dihydrodiol. *Chem. Res. Toxicol.* 5 (1992) 779-786.
- [53] J.R. Babson, S.E. Russo-Rodriguez, W.H. Rastetter, G.N. Wogan, *In vitro* DNA-binding of microsomally-activated fluoranthene: evidence that the major product is a fluoranthene N2-deoxyguanosine adduct. *Carcinogenesis* 7 (1986) 859-865.
- [54] N.J. Gorelick, G.N. Wogan, Fluoranthene-DNA adducts: identification and quantification by an HPLC-32P-postlabeling method. *Carcinogenesis* 10 (1989) 1567-1577.
- [55] Y.C.M. Staal, M.H.M. Van Herwijnen, F.J. Van Schooten, J.H.M. Van Delft, Modulation of gene expression and DNA adduct formation in HepG2 cells by polycyclic aromatic hydrocarbons with different carcinogenic potencies. *Carcinogenesis* 27 (2006) 646-655.
- [56] N.J. Gorelick, D.A. Hutchins, S.R. Tannenbaum, G.N. Wogan, Formation of DNA and hemoglobin adducts of fluoranthene after single and multiple exposures. *Carcinogenesis* 10 (1989) 1579-1587.
- [57] J.S. Wang, W.F. Busby, G.N. Wogan, Tissue distribution of DNA adducts in pre-weanling BLU:Ha mice treated with a tumorigenic dose of fluoranthene. *Cancer Lett.* 92 (1995) 9-19.
- [58] S.A. Walker, A.B. Addai, M. Mathis, A. Ramesh, Effect of dietary fat on metabolism and DNA adduct formation after acute oral exposure of F-344 rats to fluoranthene. *J. Nutr. Biochem.* 18 (2007) 236-249.

Article 5 – Genotoxic and enzymatic effects of PAH metabolites in freshly isolated hepatocytes from sole (*Solea solea*)

In preparation

N. Wessel¹, D. Ménard¹, K. Pichavant², E. Ollivier², T. Burgeot¹, F. Akcha^{1*}

¹Ifremer, Département de Biogéochimie et Ecotoxicologie, Rue de l'Île d'Yeu, 44311 Nantes Cedex 03, France.

²Unité de Physiologie Comparée et Intégrative, Université de Bretagne Occidentale, Avenue Le Gorgeu, 29200 Brest, France.

* Corresponding author:

Farida Akcha

Ifremer, Department of Biogeochemistry and Ecotoxicology, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes Cedex 03, France

Tel : 33 2 40 37 42 08

Fax : 33 2 40 37 42 41

Mail : fakcha@ifremer.fr

Abstract

PAH are hydrophobic pollutants, which are biotransformed by organisms into more soluble compounds in order to be easily excreted. Some of the metabolites produced during the biotransformation process are known to be genotoxic. In order to acquire a better knowledge on the bioactivation of PAHs, the aim of this study was to assess the potential of BaP and Fluo metabolites to modulate the CYP450 1A1 activity and to induce genotoxic effects on the common sole. Sole hepatocytes were exposed for 24 hrs to BaP, BPDE, 3-OH-BaP, 6,12-dione-BaP, 7,8-dione-BaP, and 7,8-dihydrodiol-BaP to a range of concentration from 0.05 to 1 μ M, and to Fluo, 3-OH-Fluo, 2,3-dione-Fluo and 2,3-dihydrodiol-Fluo at a range of concentrations from 0.25 to 5 μ M. The activity of a representative enzyme of the CYP450 1A1, the EROD, and the level of DNA strand breaks were measured.

BaP and 6,12-dione-BaP exposures lead to an increase in the EROD activity, while the other tested BaP-metabolites did not modulate this activity. The BaP induced a genotoxic effect from an exposure concentration of 0.25 μ M, while all of its tested metabolites induced genotoxicity from the lower exposure concentration of 0.05. The most genotoxic metabolite was the BPDE, known to be the ultimate carcinogen of BaP in higher vertebrates. Neither the Fluo nor its metabolites modulate the EROD activity. Compare to the control, Fluo and all these tested metabolites increased the level of DNA damage. However, due to relatively high level of DNA strand breaks in the solvent group, the increase was significant only for the 3-OH-Fluo.

1. Introduction

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are widespread hydrophobic organic contaminants that are among the most widely studied chemical pollutants in toxicology and chemistry. Due to their remaining input sources in freshwater and marine compartments, they are so still of great environmental concern. Many toxic effects, such as effects on growth and reproductive function, are associated to their presence in the environment (Johnson et al., 2008), that is mainly of pyrolytic origins, with supplementary petrogenic inputs near the harbour and oil refineries (Skarphedinsdottir et al., 2007). These hydrophobic contaminants become available for marine organisms by adsorption on particulate matter (Cailleaud et al., 2009). Along the Seine River and Estuary, particulate PAH concentrations, used as a chemical marker of PAH bioavailability, ranged from 2 ng/L at the most outside site to 687 ng/L near an industrial site (Cailleaud et al. 2007; Fernandes et al., 1997). One of the major PAH in the particulate matter is the Fluoranthene (Fluo), which reach concentrations approximately 1.3 fold greater than those of benzo[a]pyrene (BaP). Due to their hydrophobicity, PAHs have to be biotransformed in more soluble compounds by organisms, in order to be excreted by biliary and urinary ducts (Meador et al., 2008; Van der Oost et al., 2003). The biotransformation pathways involve enzymatic processes. The phase I reactions involve several inducible enzymes such as mixed function oxydases, usually represented by the cytochrome P450 (CYP450), some reductases, and some hydrolases represented by epoxide hydrolase. The metabolites produced during these reactions are responsible for the toxic

effects associated to the parent PAHs, such as genotoxicity (Akcha et al., 2003a, Xue and Warshawsky, 2005).

In this paper, two PAH compounds, the benzo[a]pyrene (BaP) and the fluoranthene (Fluo), and some of their respective metabolites were selected for genotoxic studies in sole (*Solea solea*). Due to their toxicity, both these PAHs feature on the list of the 33 priority pollutants of the European Water Framework Directive (2000/60/CE), and are two of the 16 priority monitored PAHs of the United States Environmental Protection Agency. The BaP is one of the most PAH studied. Its metabolic activation pathways have been widely investigated in higher vertebrates (Jiang et al., 2007), and its genotoxic effects have been extensively reports in higher vertebrates as in marine organisms (Akcha et al., 2003a; Varanasi and Gmur., 1980). Despite the Fluo is one of the most abundant PAH in human food an in marine compartments, its bioactivation pathways are almost unknown in fish. Moreover, the data on its genotoxic potential are poor and equivocal. The Fluo doesn't present a Bay region, compare to BaP, that could imply other bioactivation pathways.

Due to its benthic habitat and its nurseries located close to coastal and estuarine area, known to be a sink for hydrophobic contaminants (Witt and Trost, 1999, Cachot et al., 2006), the common sole (*Solea solea*) is listed as a sentinel specie for the biomonitoring of the marine environment by the International Council for the Exploration of the Sea (ICES). Due to the major role of liver in the bioactivation process (Wall et al., 1991), hepatocytes are commonly used as a tool for assessment of multi endpoint toxicity (Tollefsen et al., 2006).

In this context, the aim of this study was to assess *in vitro* the enzymatic and genotoxic effects, of both PAH parent compounds, and some of their metabolites in freshly isolated sole hepatocytes. In a previous work, a genotoxic effet of BaP and Fluo on sole hepatocytes was observed from respective concentrations of 1 and 5 μM (Wessel et al., a, submitted; Wessel et al., b, submitted). In this study, sole hepatocytes were exposed to BaP, BaP-diol-epoxide (BPDE), 7,8-dihydrodiol-BaP, 7,8-dione-BaP, 6,12-dione-BaP, and 3-OH-BaP to a range of concentrations from 0.05 to 1 μM , and to Fluo, 2,3-diol-Fluo, 2,3-dione-Fluo, and 3-OH-Fluo to a range of concentrations from 0.25 to 5 μM . The biotransformation activity was evaluated by the measurement of the EROD activity which is representative of the CYP450 1A1. The EROD is known to be dependent of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR), wich is regulated by PAH (Hahn et al., 2005). The DNA damages, in term of DNA strand breaks, were evaluated by the Comet Assay. This type of damage can result from oxidative stress, or by the incomplete repair of DNA adducts (Godard et al., 2002).

2. Material and methods

2.1. Chemicals and materials

NaCl, KCl, MgSO₄, Na₂HPO₄, NaHCO₃, HEPES, EDTA, D-(+)-Glucose, CaCl₂, RPMI 1640 medium, anhydrous dimethyl sulphoxide (DMSO), 0.4% trypan-blue solution, ethidium bromide (BET), normal and low melting point agarose, collagenase type IV (CAS No 9001-12-1), resorufin sodium salt (CAS No 34994-50-8), ethoxyresorufin (CAS No 5725-91-9), NADPH (CAS No 104809-32-7), Benzo[a]pyrene (CAS No 50-32-8) and Fluoranthene

(CAS No 206-44-0) were purchased from Sigma Aldrich Chemicals. PAH metabolites used, namely BPDE (CAS No 58917-67-2), 7,8-dihydrodiol-BaP (CAS No 57404-88-3), 7,8-dione-BaP (NCI No L0288), 6,12-Dione-BaP (CAS No 3067-12-7), 3-OH-BaP (CAS No 13345-21-6), 2,3-dihydrodiol-Fluo (CAS No 82911-12-4), 2,3-dione-Fluo (CAS No 105-74-8), and 3-OH-Fluo (NCI No L1095) were purchased from the Midwest Research Institute, NCI chemical Repository, USA. KH_2PO_4 was purchased from Fisher scientific. DMEM/F-12, Fetal Bovine Serum (SVF), antibiotics (penicillin-streptomycin), antifungic (fungizone-ampotericin B) and Trypsin-EDTA were purchased from Gibco. The 96-wells cell culture plates (Cat No. 611F96) were purchased from Bibby sterilin LTD.

2.2 Hepatocyte exposure

2.2.1 Fish sampling

Wild fish were used for this study. Soles were trawled in a relatively unpolluted area from the Loire estuary, France. Fish were maintained for 10 days in a 500 L tank in filtered sea water at 18°C before starting the experiment.

2.2.2 Hepatocyte isolation technique

For this study, exposures to BaP and its metabolites were conducted, by using the hepatocytes isolated from 4 fish. For Fluo and its metabolites, a second serie of exposures was realised by using used the hepatocytes isolated from 4 other fish. Sole hepatocytes were isolated by collagenase digestion as adapted from Ollivier et al., 2006. This miniaturized method was previously applied and validated for the evaluation of both the parent compounds (Wessel et al., a, submitted; Wessel et al., b, submitted).

2.2.3 Cell cultures and exposure

For each serie of exposure, cells isolated from 4 fish livers were pooled and viability was assessed by a trypan blue exclusion test. Cells were further seeded in 96-well culture plates in a medium containing 90% DMEM, 10% foetal bovine serum (FBS) and supplemented with 2% penicillin-streptomycin as antibiotics and 2% fungizone-ampotericin B as antifungics. For the control and each tested concentration of PAH compound, 6 wells were seeded. Each well contained 0.65×10^6 cells in a final volume of 200 μL (concentration: 3.24×10^6 cells/mL). Cells were placed at 17°C for one night before starting the contamination.

For BaP and Fluo, cells were further exposed to parent compounds and its metabolites to a range of concentrations. The highest exposure concentration was the parent compound concentration from which a genotoxic effect was observed in sole hepatocytes during a previous work (Wessel et al., a, submitted; Wessel et al., b, submitted). Hepatocytes were exposed to BaP and its metabolites at 0.05, 0.25, and 1 μM , and to Fluo and its metabolites at 0.25, 1, and 5 μM . All the compounds were dissolved in anhydrous DMSO so that the solvent concentration in the medium is 0.5%. A microscopic observation allowed checking for no PAH precipitation. Two control incubations were performed, one using anhydrous DMSO (0.5%), and another one without any solvent. At the start of contamination, plates were slowly shaken for 40 min and placed at 17°C in the dark for 24 hrs.

Following exposure, cell adhesion mainly occurred in wells, requiring a dissociation step with trypsin. For each well, the culture medium was recovered into microtubes. Each well was then rinsed twice with 1X Phosphate Buffered Saline (PBS) and the PBS was recovered into the tube. Cell trypsination was then performed by adding 50 μL trypsin-EDTA (1X) into the well. Following 8 min with gentle shake, trypsin action was stopped by adding 150 μL of culture medium. The total volume was recovered into the tube. Following tube centrifugation (15 min, 400 g, 4°C), the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 100 μL of freezing medium (55% RPMI 1640, 25% SVF, 20% DMSO). Following a cell viability test, samples were frozen by 30 min at -20°C , one night at -80°C , and stored in liquid nitrogen prior to analyses. Once defrosted, cell viability was determined for each sample by a trypan-blue exclusion test. In each case, cell viability was at least equal to 75% allowing the conduction of the comet assay.

2.2.4 EROD activity measurement

The Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity was measured using spectrophotometry directly on the cell suspension. Fluorometric measurement was performed with a microplate reader according to the modified method of Burke and Mayer (1974), with excitation at 535 nm and emission at 580 nm. An external resorufin standard is used to calibrate the apparatus for conversion of fluorescence units into picomolar quantities. Samples were defrosted on ice. For each sample, the measurement was performed in four replicates of 10 μL of cell suspension. Reaction was performed by adding NADPH as a cofactor in the reactional medium composed of cells in phosphate buffer and 7-ethoxyresorufin. The formation of resorufin was measured during 8 min. Specific activity is expressed in pmol of resorufin produced per min and per 10^6 cells.

2.2.5 Comet assay

The comet assay was performed on isolated cells as described in Akcha et al. (2003b). Cell samples were gently defrosted at ambient temperature. Following centrifugation (300 g, 4 min, 4°C), supernatant was discarded and pellet resuspended in 50 μL PBS. For each sample, 2 slides were prepared.

Slides were analysed using an optical fluorescence microscope (Olympus BX60, x 40) coupled to a CDD camera (Olympus) and an image analysis system (Komet 4, Kinetic Imaging Ltd). Several parameters were calculated for each observed cell (75 cells/slide), including the percentage of DNA present in the comet tail and the Olive tail moment (OTM).

2.3 Statistical analysis

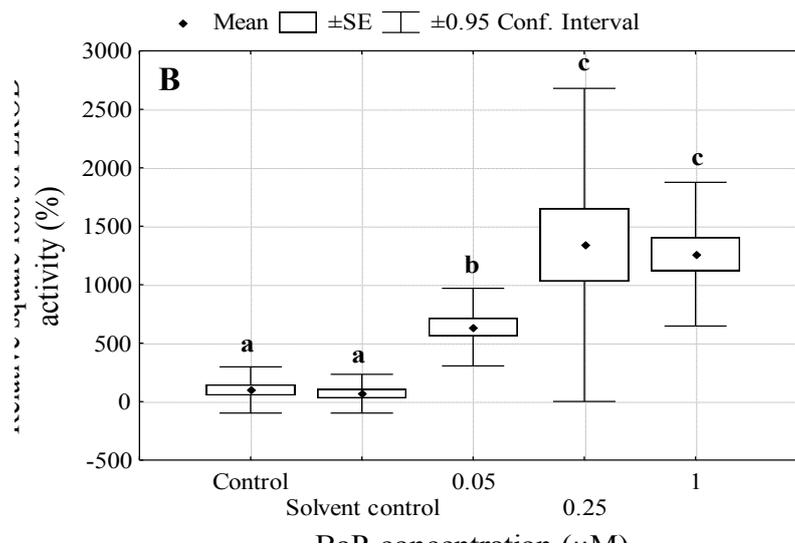
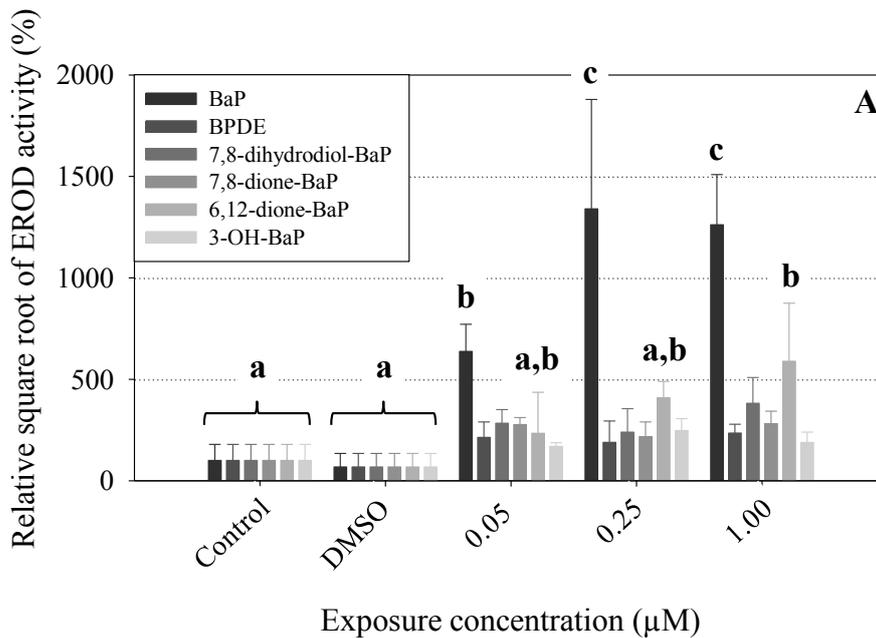
EROD activity and genotoxicity data were exploited by performing an analysis of variances, ANOVA, using Statistica 6.0 (Statsoft. Inc). Necessary normalization was performed by mathematical processing (\sqrt{x}) and normality of the data was checked (normal p-plot). Each time a significant difference was demonstrated, an *a posteriori* test (Tuckey's test) was performed.

3. Results

3.1 Effects of benzo[a]pyrene and its metabolites

3.1.1 EROD activity

Following 24 hrs of exposure, the EROD activity (Figure 53) was modulated by exposure to BaP and the 6,12-dione-BaP in a concentration dependent manner (ANOVA, $p < 0.01$). BaP increased the EROD activity from the lowest exposure concentration of 0.05 μM in a concentration dependent manner (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). The 6,12-dione-BaP increased the EROD activity, but effect was significant only at the highest exposure concentration of 1 μM (Tukey, $p < 0.05$).



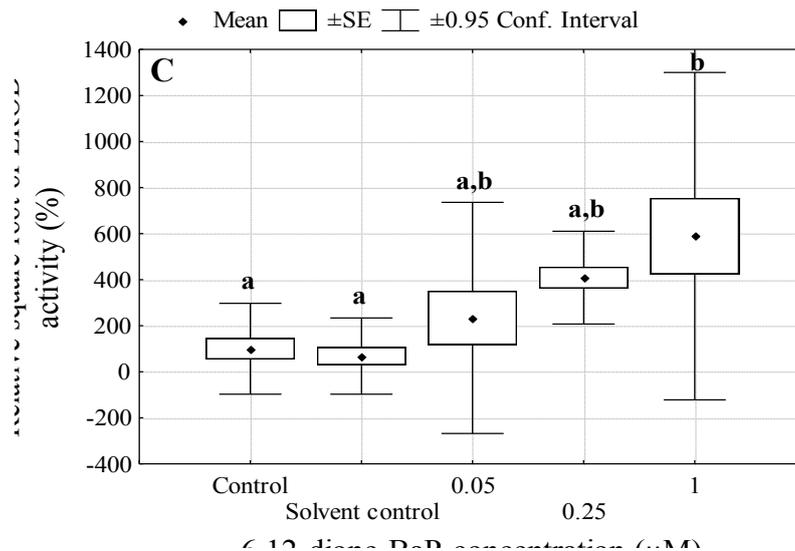


Figure 53 – A: EROD activity of hepatocytes exposed to BaP and its metabolites, expressed as a percentage relative to the control. B: EROD activity of hepatocytes exposed to BaP; C: EROD activity of hepatocytes exposed to the 6,12-dione-BaP. Letters are grouping homogenous groups (Tukey, $p < 0.05$).

3.1.2 DNA strand breaks

As shown in Figure 54, a genotoxic effect was observed following exposure to each tested compound (nested ANOVA, $p < 0.01$). No differences were observed between the control and the solvent control groups. Following exposure to BaP, a concentration dependent effect was measured, which became statistically significant from 0.25 μM of exposure (Tukey, $p < 0.05$). Concerning all the other BaP metabolites, a non concentration dependent effect was observed from the lowest exposure concentration of 0.05 μM . Differences in the genotoxicity effect were observed between the metabolites (ANOVA, $p < 0.01$). The Figure 55 represents the mean genotoxic response obtained for each compound from the results obtained with the different exposure concentrations. The BPDE appeared to be the most genotoxic, followed by the 6,12-dione-BaP, the 3-OH-BaP and the 7,8-dione-BaP, and the BaP. The 7,8-dihydrodiol-BaP appeared to be the less genotoxic.

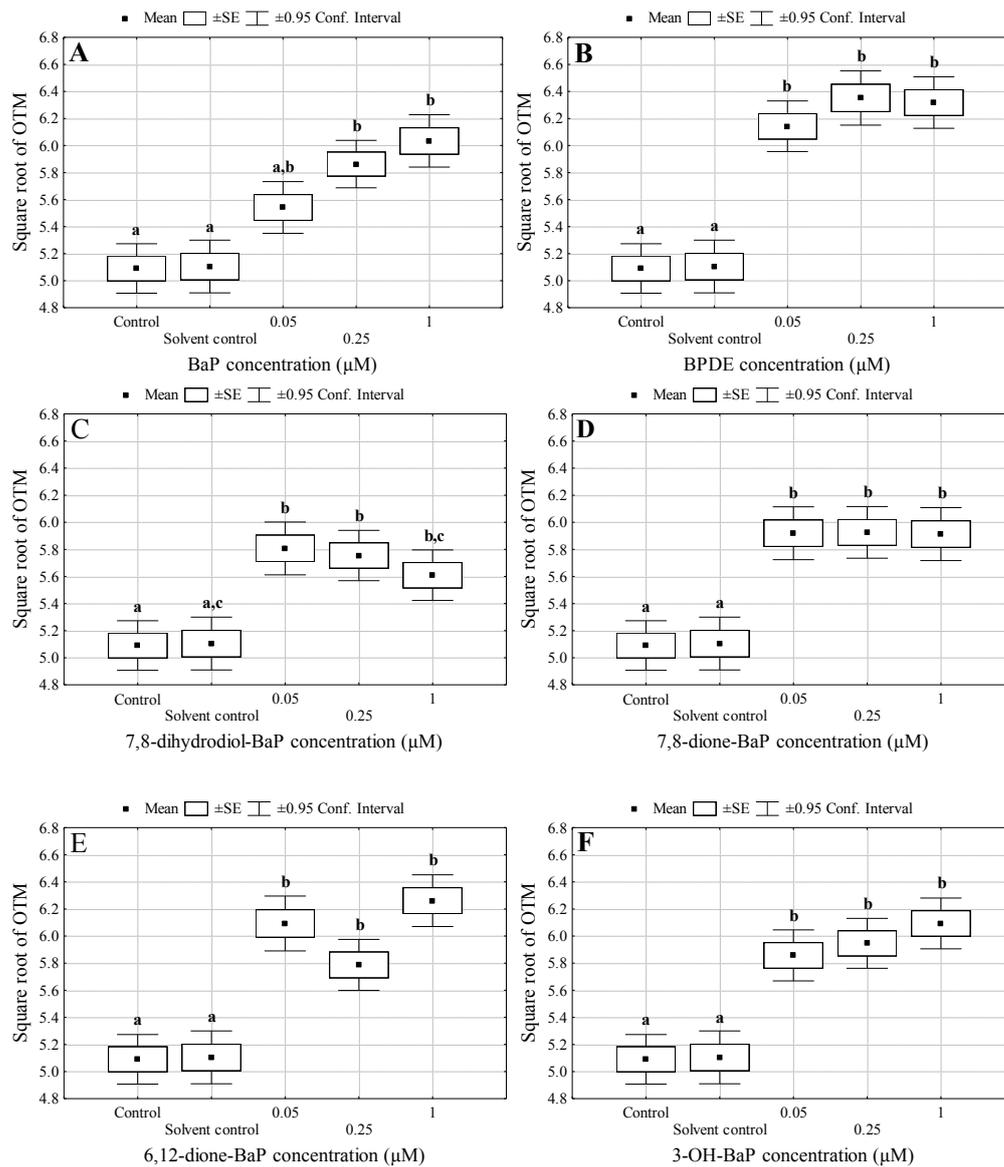


Figure 54 – DNA strand break levels expressed as square root of the Olive Tail Moment (OTM) of BaP (A), BPDE (B), 7,8-dihydrodiol-BaP (C), 7,8-dione-BaP (D), 6,12-dione-BaP (E), and 3-OH-BaP (F). Letters are grouping homogeneous groups (Tukey, $p < 0.05$).

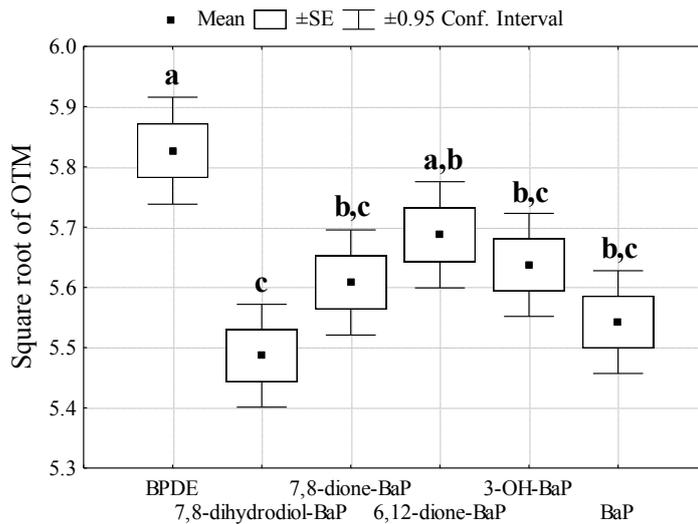


Figure 55 – Mean of DNA strand break levels measured following exposure to BaP and its metabolites. Letters are grouping homogeneous groups (Tukey, $p < 0.05$).

3.2 Effects of Fluoranthene and its metabolites

3.2.1 EROD activity

Results presented in Figure 56 showed a weak non significant increase of EROD activity following exposure to each Fluo metabolite and the parent compound.

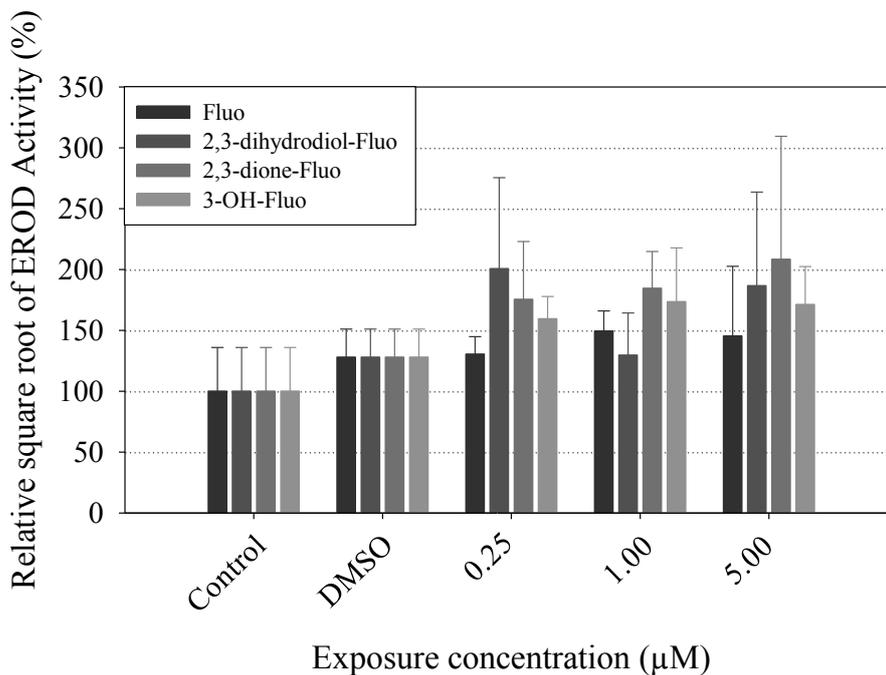


Figure 56 – EROD activity in hepatocytes exposed to Fluo and its metabolites, expressed as a percentage relative to the control group.

3.2.2 DNA strand breaks

The levels of DNA strand breaks measured following 24 hrs of exposure to Fluo and its metabolites are shown in Figure 57 and Figure 58.

A nested design ANOVA showed an effect of the exposure concentration ($p < 0.05$). No significant effect was observed between the control and the solvent control groups. Due to a weak non significant increase of DNA strand breaks in the solvent control group, only the 3-OH-Fluo showed a significant effect compare to the solvent control at the highest exposure concentration of 5 μM . All the tested Fluo metabolites showed a non significant increase of DNA strand breaks from the lowest exposure concentration. No difference was observed in genotoxicity between each compound.

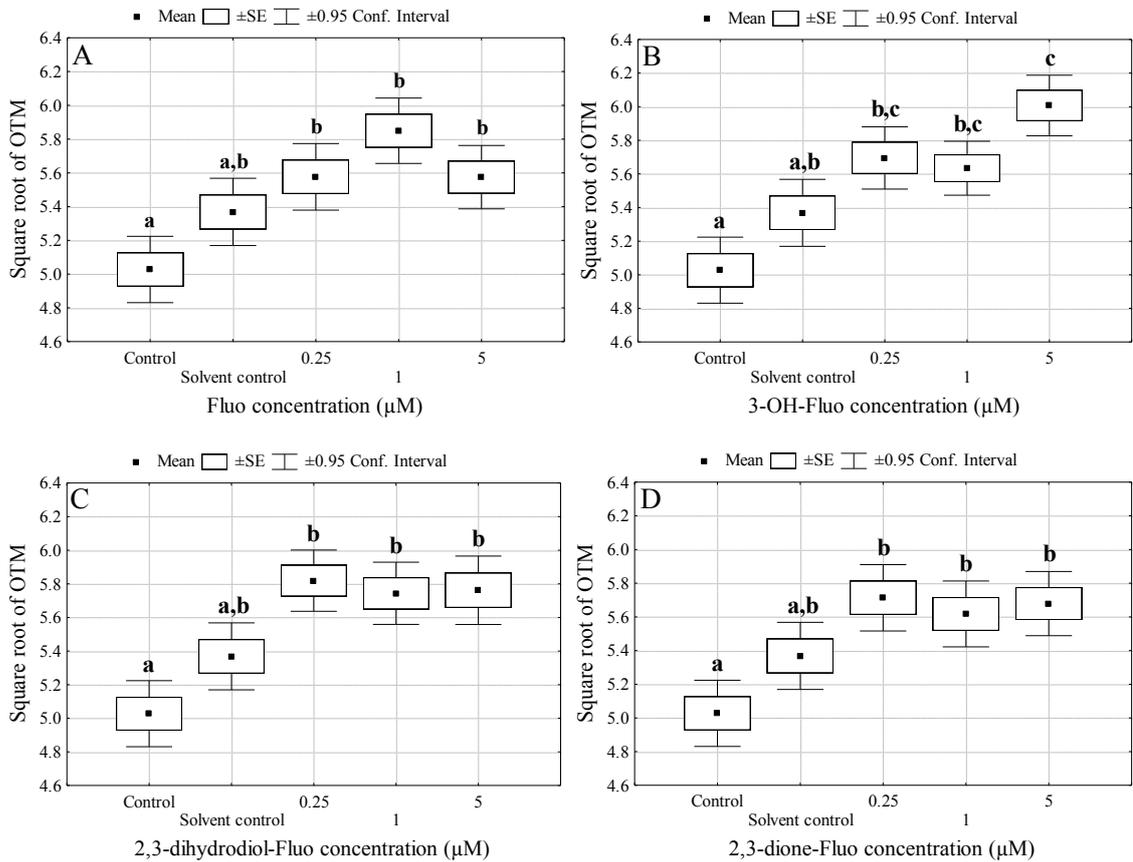


Figure 57 – Levels of DNA strand breaks measured following 24 hrs of exposure to Fluo (A), 3-OH-Fluo (B), 2,3-dihydrodiol-Fluo (C), and 2,3-dione-Fluo (D). Results are expressed as square root of the Olive Tail Moment (OTM). Letters are grouping homogeneous groups (Tukey, $p < 0.05$).

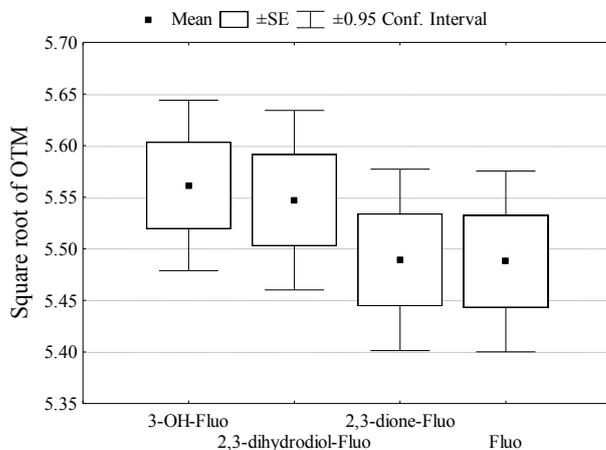


Figure 58 – Mean levels of DNA strand breaks measured following exposure of Fluo and each tested metabolite.

4. Discussion

4.1 Effect of BaP and its metabolites

4.1.1 EROD activity

In this study, following 24 hrs of exposure, an increase of the EROD activity in sole hepatocytes was induced by BaP in a concentration-dependent manner from the lowest exposure concentration of 0.05 μM , and the by the 6,12-dione-BaP from an exposure concentration of 1 μM . For the other tested metabolites, a low but non significant increase of the EROD activity was observed. In a previous work, we observed a bell shape modulation of EROD activity in sole hepatocytes following 24 hrs of exposure to a range of concentrations from 0.1 to 25 μM . Increase was at this maximum for a concentration of 1 μM (Wessel et al., a submitted).

EROD activity reflects the activity of the CYP450 1A1 enzymes. In fish as in higher vertebrates, the modulation of EROD activity by PAH metabolites have not been extensively investigated, while the EROD modulation by parent PAH is well documented, specially for BaP. Due to its high affinity for the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) (Pushparajah et al., 2008), BaP is known to induce the EROD activity in higher vertebrates and in fish (Bols et al., 1999; Bosveld et al., 2002; Fent and Bättscher, 2000). CYP450 dependent enzymes are involved in the three major activation pathways of BaP described in higher vertebrates, namely the diol-epoxide, the *o*-quinones, and the radical cation pathways (Akcha et al., 2003a; Xue and Warshawsky, 2005).

Considering the fact that BaP is the first substrate of EROD, the observed highest EROD activity increase by BaP is not very surprising. The gene battery responsible for the induction or inhibition of the CYP450 1A and 1B is regulated by the Aryl Hydrocarbon Receptor Response Elements (AhREs), which are activated by the complex BaP-AhR-AhR Nuclear Translocator (BaP-AhR-ARNT). This complex is formed in the nucleus following translocation of the BaP-AhR complex from the cytosol where the non active AhR is present (Hahn, 1998). During the diol-epoxide and the *o*-quinone pathways, CYP450 monooxygenases, including EROD, mediate the first oxidation step, leading to three major dihydro-epoxides, the 4,5-, the 7,8- and the 9,10-epoxide-BaP (Jacob and Grimmer, 1996), which are further hydrolysed to the corresponding dihydrodiols by the action of the epoxide hydrolase (EH) (Borgen et al., 1973), or rearranged spontaneously into phenols (1-OH-, 3-OH-, 7-OH-, or 9-OH-BaP) (Jacob and Grimmer, 1996; Jiang et al., 2007). The CYP450 monooxygenases are also involved during the oxygenation of the 7,8-*trans*-dihydrodiol-BaP to yield to the BPDE, which is considered as the ultimate carcinogen of the BaP (Shimada, 2006). The highly reactive BPDE can be hydrolysed into inactive tetrols, without any action of CYP450 dependent enzymes (Xue and Warshawski, 2005). The 7,8-dihydrodiol-BaP can also be oxidized to yield to the active and redox active *o*-quinone-BaP (Burczynski et al., 1998; Straif et al., 2005), i.e., the 7,8-dione-BaP. This oxidation is mediated by the dihydrodiol deshydrogenases (DD), which belong to the Aldo-Keto Reductase (AKR) superfamily, which competes with the CYP450 (Penning et al., 1998). The 3-OH-BaP is known as the major phenol produced in fish as in higher vertebrates (Pandey et al., 2006,

Wessel et al., c, submitted). It can be auto-oxidized into the corresponding 3,6-dione (Cooper et al., 1983). By the same way, other quinones are produced, namely the 1,6- and the 6,12-dione-BaP (Shimada, 2006).

These quinones can also be formed by the radical cation pathway. During the first step of this pathway, BaP is catalysed to radical cation by CYP450 peroxidases (Penning et al., 1998). The peroxidases catalysing the radical cation production are not yet isolated, but they didn't seem to belong neither to the CYP450 1A1 nor to the CYP450 1B1 isoforms (Jiang et al., 2007). The activated carbon leads to the formation of the 1,6-, 3,6-, or 6,12-dione-BaP, which undergo reduction to yield semi-quinones which in air come back through the redox-cycle to the quinones (Burdick et al., 2003; Jiang et al., 2007). The EROD doesn't seem to be involved in this pathway.

The EROD is so involved in two crucial steps during the BaP metabolism: the first oxidation of BaP, and the oxygenation of 7,8-dihydrodiol-BaP, leading to the BPDE. The lack of modulation of EROD activity by the 7,8-dione-BaP, and by BPDE can be explained by the fact that they are final products of reactions involving EROD. In consequences, they don't need biotransformation process. They don't seem to bind with the AhR. On the same way, the 3-OH-BaP biotransformation occurs through autooxidation leading to the corresponding quinones. This reaction is so not mediated by CYP450. On the contrary, the 7,8-dihydrodiol should induce a more important increase of EROD activity. The lack of significant effect observed could be due to a lowest affinity of these compounds for the AhR in the absence of the parent compound. The involvement of other CYP450 enzymes than EROD may be a hypothesis. This latest hypothesis is supported by the recent discovering of the inducibility of CYP450 1C1 by BaP exposure in fish *Fundulus heteroclitus* (Wang et al., 2006). Moreover, in mouse aortic culture cells, the CYP450 1B1 have been shown to mediate the conversion of 3-OH-BaP to DNA binding intermediates (Moorthy et al., 2003). The CYP450 1B1 may also contribute to 7,8-dihydrodiol-BaP metabolism, as in higher vertebrates (Kim et al., 1998). A supplementary important role for the DD mediating the transformation of 7,8-dihydrodiol to the 7,8-dione-BaP may occur. The measurement of the DD activity and of enzymes dependent of other CYP450 isoforms should allow checking for these hypotheses.

4.1.2 DNA damage

Following exposure of hepatocytes, a non concentration-dependent genotoxic effect in term of DNA strand breakage was observed for all the tested BaP metabolites from the lowest exposure concentration of 0.05 μ M, while a concentration dependent effect was observed following exposure to BaP. The BPDE known to be the ultimate carcinogen of BaP induced the more important effect, followed by the 6,12-dione-BaP. The 7,8-dione-BaP and the 3-OH-BaP induced similar DNA strand break levels, and the 7,8-dihydrodiol and the BaP were the weakest genotoxicants. The DNA strand breaks measured by the alkaline Comet assay can result from an incomplete repair of both DNA adducts and from oxidative DNA damage (Godard et al., 2002).

Most of the study assessing the genotoxicity of PAH metabolites were performed on higher vertebrates. The genotoxicity of BaP is well documented in fish as in higher vertebrates. It is

known to be biotransformed into reactive metabolites, some of them being able to bind to DNA leading to adducts. Moreover, the production of several metabolites lead to oxidative stress through the production of ROS. These genotoxic effects are known to be due to the metabolites produced. The production of stable DNA adducts mainly occurs through the diol-epoxide pathway (Akcha et al., 2003a; Masfaraud et al., 1992). During this pathway, the direct precursor of the BPDE is the 7,8-dihydrodiol, which is one of the most produced metabolites in sole as in higher vertebrates (Wessel et al., c, submitted). The genotoxicity associated to this compound is known to occur through its sub-products, the BPDE and the 7,8-dione-BaP.

The highest genotoxic effect induced by BPDE observed in this study is in accordance with the literature. In higher vertebrates, the BPDE is considered as the most potent genotoxic metabolite of BaP. In fact, it is known to form some stable DNA adducts (Chen et al., 1996), and to induce oxidative stress by ROS production (Douki et al., 2008).

During the activation of the 7,8-dihydrodiol-BaP to the 7,8-dione-BaP via the *o*-quinone pathway, hydrogen peroxide and superoxide anion are produced, leading to oxidative stress (Park et al., 2006; Burczynski et al., 1998). In human bronchoalveolar H358 cells, the 7,8-dione-BaP have been demonstrated as an inducer of 8-oxodGuo formation, through the redox cycling between 7,8-dione-BaP and 7,8-catechol-BaP with concomitant generation of ROS (Mangal et al., 2009). Moreover, the 7,8-dione-BaP is known to form some stable and depurinated adducts (Guengerich, 2000; Burczynski et al., 1998). Some of them have been identified as stable adducts produced on the guanine, the adenine, and the cytosine (Balu et al., 2004; Balu et al, 2006).

In salmon testis DNA, the oxidative DNA damage induced by the 7,8-dione-BaP have been demonstrated requiring the presence Cu(I) and of hydrogen peroxide and superoxide anion, which are produced during the *o*-quinone pathway (Park et al., 2005).

The 3-OH-BaP has been demonstrated as an indirect genotoxicity inducer in higher vertebrates. Following exposure of mouse aortic cells to 0.3 μ M of 3-OH-BaP during 24 hr, the 3-OH-BaP is converted to the 3,6-dione-BaP, which yield by one-electron reduction to the corresponding semi-quinone, which is able to bind to DNA (Joseph and Jaiswal, 1994; Moorthy et al., 2003). In the same way, the radical semi quinone of the 6,12-dione-BaP is also able to form DNA adducts.

The results observed in this study demonstrate the ability of all the tested BaP-metabolites to induce DNA strand breaks. The measurement of the DNA adduct levels induced by these compounds could allow to check for the genotoxicity mechanisms of BaP metabolites. The specific measurement of the DNA base oxidation could also give some new information on the relative part of each type of DNA damage, oxidative stress and DNA adducts production, induced by each metabolite. During this experiment, some hepatocytes were exposed in parallel to BaP and its metabolites at a lower concentration of 0.01 μ M. The analysis of these samples is actually in course and will allow a better assessment of the lowest effective genotoxic concentration.

4.2 Effects of Fluo and its metabolites

4.2.1 EROD activity

To our knowledge, there is no data available considering the EROD modulation by some Fluo metabolites. During the present experiment, neither the parent compound, nor its metabolites induced a significant modulation of EROD activity. In a previous work, an inhibition was observed from an exposure concentration of 5 μ M following similar exposure (Wessel et al., b, submitted). The level of EROD activity at the beginning of the exposure may have an impact on the further modulation of biotransformation enzymes activity. Honey et al. (2000) demonstrated that the predominant biotransformation pathway depends on the origin of organisms. Liver microsomes from ducks sampled in polluted area bioactivated PAH predominantly through the diol-epoxide pathway, while phenol production seems to be predominant when animals came from less polluted area. Wild fish were used for the present work. The soles used in the two different experiments we performed, were sampled in the same area, but they were not kept at the same time. Their life history and the contamination level at the moment they were kept may have an impact on the biotransformation enzyme activities.

4.2.2 DNA damage

In the present work, all the tested Fluo metabolites induced a genotoxic effect from the lowest exposure concentration compare to the control. Due to a surprising quite high level of DNA damage in the solvent control samples, only the level of DNA strand breaks measured in the hepatocytes exposed to 5 μ M of 3-OH-Fluo was significantly different from the solvent control. During the exposures, the solvent used (anhydrous DMSO 0.5%) was demonstrated as inert at this concentration in term of DNA strand break level.

In fish, no data are available on the genotoxicity of Fluo metabolites. In higher vertebrates, Babson et al. (1986a) demonstrated the ability of rat liver microsomes to biotransform the Fluo into mutagenic metabolites. Moreover, exposure of standard DNA in the presence of rat liver microsomes from aroclor pre-treated animals lead to the production of two DNA adducts (Babson et al., 1986b). These two adducts were identified as bounds to the guanine. Due to the major production of the 2,3-dihydrodiol-Fluo, it was suggested that the major adduct produced came from the *anti*-Fluo-2,3-diol-1,10b-epoxide, which is considered as a direct mutagen metabolite, able to bind to the exocyclic nitrogen of dGuo. The resulting adduct was proposed to be the 10b-(deoxyguanosine-N2-yl)-1,2,3-trihydroxy-1,2,3,10b-tetrahydro-Fluo. Authors suggested that the second produced adduct was an isomer of the major one.

Following similar exposures, Gorelick and Wogan (1989) confirmed the production of two DNA adducts. Authors identified the minor and the major adducts as resulting respectively of the binding of the *syn*- and the *anti*-2,3-dihydroxy-1,10b-epoxy-1,2,3-trihydroFluo (*anti*-FADE) to the dGuo in N2 position. These results were latter confirmed in rat and in mouse (Wang et al., 1995 ; Walker et al., 2007). The results obtained in this study demonstrated the genotoxicity of the 3-OH-Fluo, and the propable genotoxicity of the 2,3-dihydrodiol-Fluo and

the 2,3-dione-Fluo. The Comet analysis of the hepatocytes exposed to 25 μM of these compounds will allow to check for this hypothesis.

5. Conclusion

These experiments demonstrated the potential modulation of the EROD activity by BaP and the 6,12-dione-BaP, while the other tested BaP metabolites did not modulate this activity.

Due to the genotoxic effect observed for all of the tested BaP-metabolites, these results suggest that the genotoxic mechanism of other metabolites than 6,12-dione is not mediated by the EROD. The highest genotoxic effect was observed following the BPDE exposure, that demonstrated that the BaP genotoxicity seems to occur mainly by the diol-epoxide pathway in sole as in higher vertebrates.

Concerning the Fluo, none of the tested metabolites modulated the EROD activity at the tested concentrations. Only the 3-OH-Fluo induced a significant genotoxic effect, that may be due to the production of quinones from this diol.

In parallel to this experiment, some hepatocytes were exposed to BaP and its metabolites to a lower concentration of 0.01 μM and to Fluo and its metabolites to a higher concentration of 25 μM . The analysis of these samples will allow a better assessment of the lowest effective concentration of BaP and its metabolites and of the potential genotoxicity of Fluo and its metabolites. The EROD measurement on these samples will allow assessing the potential effect of Fluo and its metabolites on EROD activity.

For the most genotoxic BaP and Fluo metabolites, new exposures in higher volumes allowing the measurement of both the DNA base oxidation and the DNA adduct production could be performed. The measurement of each type of DNA damage could give some response elements about the mechanisms of BaP and Fluo genotoxicity.

References

- Akcha, F., Burgeot, T., Narbonne, J. F., Garrigues, P. 2003a. Metabolic Activation of PAHs: Role of DNA Adduct Formation in Induced Carcinogenesis. In *PAHs: An Ecotoxicological Perspective*, edited by Peter, E.T.D.
- Akcha, F., Vincent Hubert, F., Pfol-Leszkowicz, A. 2003b. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 534 (1-2):21-32.
- Babson, J.R., Russo-Rodriguez, S.E., Wattley, R.V. 1986a. Microsomal activation of fluoranthene to mutagenic metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology* 85 (3):355-366.
- Babson, J.R., Russo-Rodriguez, S.E., Rastetter, W.H., Wogan, G.N. 1986b. In vitro DNA-binding of microsomally-activated fluoranthene: evidence that the major product is a fluoranthene N2-deoxyguanosine adduct. *Carcinogenesis* 7 (6):859-865.
- Balu, N., Padgett, W.T., Lambert, G.R., Swank, A.E., Richard, A.M., Nesnow, S. 2004. Identification and Characterization of Novel Stable Deoxyguanosine and Deoxyadenosine Adducts of Benzo[a]pyrene-7,8-quinone from Reactions at Physiological pH. *Chemical Research in Toxicology* 17 (6):827-838.
- Balu, N., Padgett, W.T., Nelson, G.B., Lambert, G.R., Ross, J.A., Nesnow, S. 2006. Benzo[a]pyrene-7,8-quinone-3'-mononucleotide adduct standards for ³²P postlabeling analyses: Detection of benzo[a]pyrene-7,8-quinone-calf thymus DNA adducts. *Analytical Biochemistry* 355 (2):213-223.
- Bols, N. C., K. Schirmer, E. M. Joyce, D. G. Dixon, B. M. Greenberg, and J. J. Whyte. 1999. Ability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Induce 7-Ethoxyresorufin-o-deethylase Activity in a Trout Liver Cell Line. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44 (1):118-128.
- Borgen, A., H. Darvey, N. Castagnoli, T. T. Crocker, R. E. Rasmussen, and I. Y. Wang. 1973. Metabolic conversion of benzo[a]pyrene by Syrian hamster liver microsomes and binding of metabolites to deoxyribonucleic acid. *Journal of Medicinal Chemistry* 16 (5):502-506.
- Bosveld, Albertus T. C., Paul A. F. de Bie, Nico W. van den Brink, Hester Jongepier, and Anette V. Klomp. 2002. In vitro EROD induction equivalency factors for the 10 PAHs generally monitored in risk assessment studies in The Netherlands. *Chemosphere* 49 (1):75-83.
- Burczynski, M.E., Harvey, R.G., Penning, T.M. 1998. Expression and Characterization of Four Recombinant Human Dihydrodiol Dehydrogenase Isoforms: Oxidation of trans-7,8-Dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene to the Activated o-Quinone Metabolite Benzo[a]pyrene-7,8-dione. *Biochemistry* 37 (19):6781-6790.

- Burdick, A.D., Davis Li, J.W., Liu, K.J., Hudson, L.G., Shi, H., Monske, M.L., Burchiel, S.W. 2003. Benzo(a)pyrene Quinones Increase Cell Proliferation, Generate Reactive Oxygen Species, and Transactivate the Epidermal Growth Factor Receptor in Breast Epithelial Cells. *Cancer Research* 63 (22):7825-7833.
- Burke, M. Danny, and Richard T. Mayer. 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal o-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos* 2 (6):583-588.
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., Budzinski, H. 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology* 79 (3):257-267.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Hilde, D., LeMenach, K., Budzinski, H. 2007. Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoïda, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70 (2):270-280.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Peluhet, L., LeMenach, K., Souissi, S., Budzinski, H. 2009. Tidal influence on the distribution of hydrophobic organic contaminants in the Seine Estuary and biomarker responses on the copepod *Eurytemora affinis*. *Environmental Pollution* 157 (1):64-71.
- Chen, L., Devanesan, P.D., Higginbotham, S., Ariese, F., Jankowiak, R., Small, G.J., Rogan, E.G., Cavalieri, E.L. 1996. Expanded Analysis of Benzo[a]pyrene-DNA Adducts Formed in Vitro and in Mouse Skin: Their Significance in Tumor Initiation. *Chemical Research in Toxicology* 9 (5):897-903.
- Cooper, C.S., Grover, P.L., Sims, P. 1983. The metabolism and activation of benzo[a]pyrene. *Progress in Drug Metabolism* 7:295-396.
- Douki, T., Ksoury, Z., Marie, C., Favier, A., Ravanat, J.L., Maitre, A. 2008. Genotoxicity of combined exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and UVA - A mechanistic study. *Photochemistry and Photobiology* 84 (5):1133-1140.
- Fent, K., Bätischer, R. 2000. Cytochrome P4501A induction potencies of polycyclic aromatic hydrocarbons in a fish hepatoma cell line: demonstration of additive interactions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (8):2047-2058.
- Fernandes, M.B., Sicre, M.A., Boireau, A., Tronczynski, J. 1997. Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *Marine Pollution Bulletin* 34 (11):857-867.
- Godard, Thierry, Edwige Deslandes, François Sichel, Jean-Michel Poul, and Pascal Gauduchon. 2002. Detection of topoisomerase inhibitor-induced DNA strand breaks and apoptosis by the alkaline comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 520 (1-2):47-56.

- Gorelick, N.J., Wogan, G.,N. 1989. Fluoranthene-DNA adduct: identification and quantification by an HPLC-32P-postlabeling method. *Carcinogenesis* 10 (9):1567-1577.
- Guengerich, F. P. 2000. Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 21 (3):345-351.
- Hahn, Mark E. 1998. The aryl hydrocarbon receptor: A comparative perspective. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 121 (1-3):23-53.
- Hahn, Mark E., Rebeka R. Merson, Sibel I. Karchner, T. P. Mommsen, and T. W. Moon. 2005. Chapter 7 Xenobiotic receptors in fish: Structural and functional diversity and evolutionary insights. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*: Elsevier.
- Honey, Sangeet, Patrick O'Keefe, Adam T. Draushuk, James R. Olson, Subodh Kumar, and Harish C. Sikka. 2000. Metabolism of benzo(a)pyrene by duck liver microsomes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 126 (3):285-292.
- Jacob, J., Grimmer, G. 1996. Metabolism and excretion of polycyclic aromatic hydrocarbons in rat and in human. *Central European journal of public health* 4 Suppl:33-39.
- Jiang, H., Gelhaus, S.L., Mangal, D., Harvey, R.G., Blair, I.A., Penning, T.M. 2007. Metabolism of benzo[a]pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography-mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* 20 (9):1331-1341.
- Kim, Hyung Sik, Seung Jun Kwack, and Byung Mu Lee. 2000. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and benzo[a]pyrene-quinones in the blood of rats treated with benzo[a]pyrene. *Chemico-Biological Interactions* 127 (2):139-150.
- Meador, J.P., Buzitis, J., Bravo, C.F. 2008. Using fluorescent Aromatic Compounds in bile from juvenile salmonids to predict exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27 (4):845-853.
- Moorthy, B., K. P. Miller, W. W. Jiang, E. S. Williams, S. R. Kondraganti, and K. S. Ramos. 2003. Role of cytochrome P4501B1 in benzo[a]pyrene bioactivation to DNA-binding metabolites in mouse vascular smooth muscle cells: Evidence from P-32-postlabeling for formation of 3-hydroxybenzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-3,6-quinone as major proximate genotoxic intermediates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 305 (1):394-401.
- Ollivier, H., Pichavant-Rafini, K., Puill-Stephan, E., Calvès, P., Nonnotte, L., Nonnotte, G. 2006. Effects of hyposmotic stress on exocytosis in isolated turbot, *Scophthalmus maximus*, hepatocytes. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 176 (7):643-652.
- Pandey, M.K., Yadav, S., Parmar, D., Das, M. 2006. Induction of hepatic cytochrome P450 isozymes, benzo(a)pyrene metabolism and DNA binding following exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon residues generated during repeated fish fried oil in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 213 (2):126-134

- Park, J. H., S. Gopishetty, L. M. Szewczuk, A. B. Troxel, R. G. Harvey, and T. M. Penning. 2005. Formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dGuo) by PAH o-quinones: Involvement of reactive oxygen species and copper(II)/copper(I) redox cycling. *Chemical Research in Toxicology* 18 (6):1026-1037.
- Park, J. H., A. B. Troxel, R. G. Harvey, and T. M. Penning. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) o-quinones produced by the Aldo-Keto-Reductases (AKRs) generate abasic sites, oxidized pyrimidines, and 8-Oxo-dGuo via reactive oxygen species. *Chemical Research in Toxicology* 19 (5):719-728.
- Penning, Trevor M., Michael E. Burczynski, Chien-Fu Hung, Kirsten D. McCoull, Nisha T. Palackal, and Laurie S. Tsuruda. 1998. Dihydrodiol Dehydrogenases and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Activation: Generation of Reactive and Redox Active o-Quinones. *Chemical Research in Toxicology* 12 (1):1-18.
- Pushparajah, D.S., Umachandran, M., Nazir, T., Plant, K.E., Plant, N., Lewis, D.F.V., Ioannides, C. 2008. Up-regulation of CYP1A/B in rat lung and liver, and human liver precision-cut slices by a series of polycyclic aromatic hydrocarbons; association with the Ah locus and importance of molecular size. *Toxicology in Vitro* 22 (1):128-145.
- Shimada, T. 2006. Xenobiotic-Metabolizing Enzymes Involved in Activation and Detoxification of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 21 (4):257-276.
- Skarphéinsdóttir, H., Ericson, G., Svavarsson, J., Næs, K. 2007. DNA adducts and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) tissue levels in blue mussels (*Mytilus* spp.) from Nordic coastal sites. *Marine Environmental Research* 64 (4):479-491.
- Tollefsen, K.-E., Bratsberg, E., Bøyum, O., Finne, E.F., Gregersen, I.K., Hegseth, M., Sandberg, C., Hylland, K. 2006. Use of fish in vitro hepatocyte assays to detect multi-endpoint toxicity in Slovenian river sediments. *Marine Environmental Research* 62 (Supplement 1):S356-S359.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13 (2):57-149.
- Varanasi, Usha, Gmur, Dennis J. 1980. Metabolic activation and covalent binding of Benzo[a]pyrene to deoxyribonucleic acid catalysed by liver enzymes of marine fish. *Biochemical Pharmacology* 29:753-761.
- Walker, S.A., Addai, A.B., Mathis, M., Ramesh, A. 2007. Effect of dietary fat on metabolism and DNA adduct formation after acute oral exposure of F-344 rats to fluoranthene. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 18 (4):236-249.
- Wall, K.L., Gao, W., Koppele, J.M.t., Kwei, G.Y., Kauffman, F.C., Thurman, R.G. 1991. The liver plays a central role in the mechanism of chemical carcinogenesis due to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 12 (5):783-786.

- Wang, J.-S., Busby, W.F., Wogan, G.N. 1995. Tissue distribution of DNA adducts in pre-weanling BLU:Ha mice treated with a tumorigenic dose of fluoranthene. *Cancer Letters* 92 (1):9-19.
- Wang, Lu, Brian E. Scheffler, and Kristine L. Willett. 2006. CYP1C1 Messenger RNA Expression is Inducible by Benzo[a]pyrene in *Fundulus heteroclitus* Embryos and Adults. *Toxicol. Sci.* 93 (2):331-340.
- Wessel, N., Ménard, D., Pichavant-Rafini, K., Ollivier, H., Le Goff, J., Burgeot, T., Akcha, F. **a**. The toxicity of benzo[a]pyrene on sole (*Solea solea*) hepatocytes: assessment of genotoxic and enzymatic effects. Accepted in *Polycyclic Aromatic Compounds*.
- Wessel, N., Ménard, D., Pichavant-Rafini, K., Ollivier, H., Le Goff, J., Burgeot, T., Akcha, F. **b, submitted**. Genotoxic and enzymatic effects of fluoranthene in microsomes and freshly isolated hepatocytes from sole (*Solea solea*). *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* (MUTGEN-D-10-00219)
- Wessel, N., Le Dû-Lacoste, M., Budzinski, H., Burgeot, T., Akcha, F. **c, submitted**. Quantification of some Benzo[a]pyrene and Fluoranthene metabolites produced in vitro by sole (*Solea solea*) and dab (*Limanda limanda*) microsomes: Application of a sensitive UPLC MS/MS method. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*.
- Witt, G., and E. Trost. 1999. Distribution and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments and fluffy layer material from the Odra river estuary. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 27 (5):308-315.
- Xue, W., Warshawsky, D. 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206 (1):73-93.

3.2. Caractérisation des adduits formés *in vitro*

Lors des expositions d'ADN de thymus de veau en présence de microsomes hépatiques de soles, une partie des échantillons a été consacrée à l'analyse structurale des adduits formés. Cette caractérisation a été réalisée par le Docteur Thierry Douki, du Laboratoire des Lésions des Acide Nucléiques (LAN) du CEA de Grenoble. Elle a été réalisée sur des échantillons exposés à 20 et 40 μM de BaP et sur des échantillons exposés à 100 et 200 μM de Fluo.

Certains adduits du BaP ont été assez bien caractérisés chez les vertébrés supérieurs, permettant leur détection et leur quantification chez d'autres espèces comme la sole. Après exposition d'ADN standard de thymus de veau en présence de protéines microsomales de foies de soles, les adduits formés ont été détectés. La méthode analytique de la détection de ces adduits est basée sur l'utilisation de l'HPLC couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem équipée d'une source d'ionisation en electrospray (Marie et al., 2008). Les adduits ont été quantifiés par l'utilisation d'une calibration externe. Pour cela une gamme d'un mélange de standards d'adduits de 5 à 500 fmol a été injectée avant et après chaque analyse. Les quantités de nucléosides normaux ont été quantifiées par une détection UV (270 nm). Les résultats sont exprimés en nombre d'adduits à l'ADN par million de nucléosides normaux.

Comme chez les vertébrés supérieurs, les adduits formés chez la sole résultent de la liaison du BPDE avec les bases de l'ADN. L'adduit majoritaire est formé en N2 de la dGuo (Figure 59). Le BPDE-N6-dAdo et le BPDE-N4-dCyd sont respectivement formés 4 à 5 fois moins et 10 fois moins que le BPDE-N2-dGuo. La quantité totale d'adduits formés est de 2,81 adduits. 10^6 bases et 7,08 adduits. 10^6 bases après expositions respectives à 20 et 40 μM de BaP. Chez les échantillons témoins, le niveau d'adduits a été mesuré à 0,01 adduit. 10^6 bases. Lors des analyses réalisées en postmarquage au ^{32}P , un effet de la concentration d'exposition n'a pas pu être observé. En effet, le niveau d'adduits formés étant très important, une saturation du signal était obtenue dès la plus faible concentration d'exposition. Un effet de la concentration plus marqué apparaît lors des analyses en HPLC-MS/MS.

Les adduits du Fluo ont quant à eux été détectés à des niveaux trop faibles pour permettre leur caractérisation en HPLC-MS/MS. De nouvelles expositions à partir de quantités plus importantes de microsomes et de substrat pourraient être réalisées afin de générer une quantité d'adduits plus importante. Cela pourrait permettre leur caractérisation.

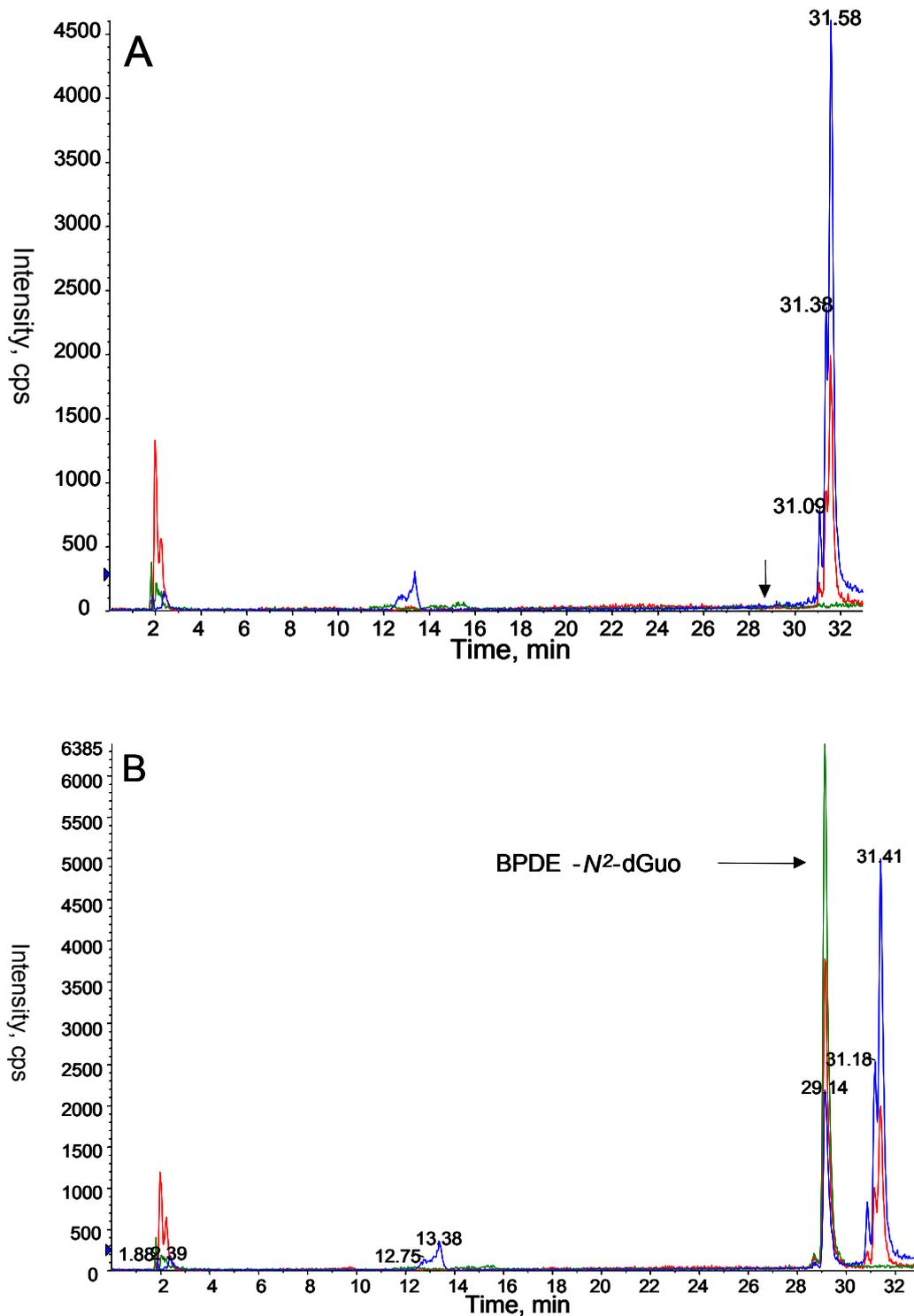


Figure 59 – Chromatogrammes obtenus en HPLC-MS/MS sur de l'ADN standard en présence de microsomes hépatiques de sole permettant de détecter l'adduit BPDE-N²dGuo, sans exposition (A) ou après exposition au BaP (B)

4. Etudes *in vivo* : projet Sole BEMol

4.1. Introduction

Dans l'environnement, les contaminants sont retrouvés sous la forme de mélanges complexes. Ces contaminants peuvent avoir des effets synergiques ou antagonistes. De plus, l'état physiologique global des organismes joue un rôle essentiel dans la réponse à la contamination chimique. Bien que les modèles d'expérimentation *in vitro* permettent d'étudier les effets de contaminants sur des expositions de courte durée, la validation de ces effets au niveau de l'individu est indispensable. La réalisation d'expositions *in vivo* permet donc d'étudier les effets biologiques de polluants chimiques à un niveau organisationnel plus élevé, tout en restant dans un système dont les conditions sont maîtrisées. De plus, l'utilisation de soles d'élevage permet de réaliser ces expérimentations sur des organismes dont le trait de vie est connu. Le but de ces expérimentations *in vivo* était d'étudier la relation entre la biotransformation des HAP et leurs effets génotoxiques. Pour cela, des mesures combinées de biomarqueurs d'exposition (métabolites biliaires de HAP ; activité EROD) et d'effets (génotoxicité) ont été réalisées. Les expositions *in vivo* ont été réalisées dans le cadre du projet Sole BEMol. Durant ces expositions, des juvéniles de soles provenant d'une exploitation aquacole (Solea BV, Ijmuiden, Hollande) ont été exposés par la voie trophique à un mélange équimolaire de BaP, Fluo et Pyr. Bien qu'il ne soit pas considéré comme génotoxique, le Pyr a été ajouté au mélange de nos deux HAP d'intérêt car sa biotransformation conduit uniquement à la formation du 1-OH-Pyr. Il était donc utilisé dans le mélange en tant que traceur de la biodisponibilité et de la biotransformation des HAP. Les différentes concentrations d'exposition ont été choisies sur la base des concentrations en HAP mesurées en Baie de Seine. Elles étaient plus élevées que les concentrations environnementales, afin de réaliser une étude mécanistique de la biotransformation et de la génotoxicité des HAP.

4.1.1. Matériel et méthodes

Deux expérimentations ont été réalisées, durant lesquelles les soles ont été exposées à différentes concentrations de HAP et à des temps d'exposition variables. La totalité des expérimentations a été réalisée au centre Ifremer de Brest. La mise en place et l'optimisation des expérimentations ont été élaborées par le Laboratoire Adaptation Reproduction Nutrition, et par le Laboratoire de Chimie des Contaminants Organiques du centre Ifremer de Brest.

4.1.1.1. Exposition *in vivo* à moyen terme (Phase A)

Au cours de la première expérimentation, appelée phase A (Figure 60), les soles ont été exposées durant 3 mois au mélange de HAP. La somme des concentrations en BaP, Fluo et Pyr mesurées en Baie de Seine, atteint 613 ng/g de sédiments (Cachot et al., 2006). Dans le but d'étudier les mécanismes de biotransformation et de toxicité des HAP, la concentration d'exposition choisie a donc été environ 9 fois supérieure à celle mesurée dans les sédiments de la Baie de Seine, soit une concentration de 5,875 µg de HAP par g de nourriture. Afin de mesurer la rapidité de l'excrétion des métabolites de HAP et d'étudier la réversibilité des

effets éventuellement observés, cette exposition a été suivie d'une période de dépuración de 3 mois. En parallèle, un groupe de poissons témoins a été nourri avec les granulés contenant uniquement le mélange de solvants utilisé pour dissoudre les HAP (isooctane/Toluène 90/10). Durant toute l'expérimentation, les soles étaient nourries *ad libitum* par l'utilisation d'un distributeur automatique de nourriture, en supplément d'un nourrissage manuel. La température de l'eau était fixée à $19 \pm 1^\circ\text{C}$.

Des prélèvements ont été effectués régulièrement au cours de cette expérimentation. Pour chaque poisson, le sang et le foie étaient prélevés pour les mesures respectives des niveaux de cassures de brins de l'ADN et de la base oxydée 8-oxodGuo. Ces mesures ont été par la suite interprétées par rapport au niveau de métabolites biliaires de HAP mesuré en UPLC-MS/MS par le LPTC de l'Université de Bordeaux 1, chez des poissons issus des mêmes bacs expérimentaux.

La mesure des métabolites biliaires de HAP nécessite un volume important de bile. Le volume de bile étant plus important lorsque les organismes sont à jeun, un jeûne de 24 h a été observé avant chaque prélèvement.



Figure 60 – Système d'exposition *in vivo* de Soles utilisé au cours de la phase A.

4.1.1.2. Exposition *in vivo* à court terme (Phase B)

Afin de compléter les résultats obtenus au cours de la phase A, une expérimentation supplémentaire de courte durée a été jugée nécessaire (Figure 61) (Phase B). Des juvéniles de soles (G0) ont été soumis pendant 1 mois au même mélange de HAP mais à une concentration de $120 \mu\text{g}$ de HAP par g de granulés. Une période de dépuración de 7 jours a été effectuée. La température des bassins était fixée à $20 \pm 1^\circ\text{C}$.



Figure 61 – Système d'exposition de soles utilisé au cours de la phase B.

Au cours de cette expérimentation, l'ensemble des prélèvements (foie, sang, bile) a été effectué sur les mêmes individus. Du fait qu'il est probable que les soles aient pu excréter une part importante des métabolites de HAP lors des périodes de jeûne, les poissons n'ont pas subi de jeûne avant les prélèvements au cours de cette expérimentation.

4.2. Résultats et discussion

4.2.1. Exposition *in vivo* à moyen terme (phase A)

Durant les 3 mois de contamination à un mélange équimolaire de 3 HAP (concentration totale 5,8 $\mu\text{g/g}$), suivis par 3 mois de dépuración, le niveau des métabolites biliaires de HAP a été mesuré (Figure 62). Ces résultats ont démontré l'ingestion et la métabolisation des HAP par les soles exposées. En effet, on observe une différence significative (Nested design ANOVA, $p < 0,05$) entre les groupes témoin et HAP, marquée par une augmentation du niveau de métabolites biliaires tout au long de la période d'exposition, suivie par une diminution très importante (89 %) dès 4 jours de dépuración. Bien que les poissons aient été exposés à une concentration dans la nourriture environ 9 fois supérieure à celle mesurée dans les sédiments de la baie de Seine, le niveau de métabolites biliaires de HAP chez les poissons exposés reste relativement faible si on le compare aux niveaux mesurés dans la bile de poissons pêchés lors de campagnes *in situ*. Au cours de cette exposition, le niveau de métabolites biliaires de HAP (1637 ng.g^{-1} de bile) est seulement 1,7 fois supérieur à celui des soles pêchées en estuaire de Seine au plus près du Havre (954 ng.g^{-1} de bile). Les réactions de métabolisation des HAP étant relativement rapides, il est probable qu'au cours du jeûne de 24 h précédant le prélèvement, une partie des métabolites de HAP puisse être excrétée par les soles, ne permettant pas ainsi d'obtenir une contamination « chronique ». En parallèle, deux mesures de génotoxicité ont été effectuées : la mesure du niveau de cassures de brins de l'ADN (Figure 63 et Figure 64) et la mesure du niveau de la base oxydée 8-oxodGuo (Figure 65 et Figure 66). Aucun effet significatif n'a pu être mis en évidence sur le niveau de ces dommages oxydatifs à l'ADN (Nested ANOVA, $p > 0,05$). Des variations significatives ont été observées au cours du

temps ($p < 0,001$) chez les individus exposés, ainsi que chez ceux du groupe Témoin solvant. Ces variations semblent donc être dues aux seules conditions d'expérimentation.

Néanmoins, une corrélation positive a pu être mise en évidence entre les deux mesures de génotoxicité ($R = 0,540$, $p < 0,05$), ainsi qu'entre le niveau de la base oxydée 8-oxodGuo et le niveau de métabolites mesuré ($R = 0,706$, $p < 0,01$).

Les niveaux de contamination choisis pour les HAP sont donc apparus comme étant trop faibles pour induire un effet génotoxique dans les conditions d'expérimentation sélectionnées. En effet, les soles ont subi des périodes de jeûne de 24 h avant chaque prélèvement. De plus, les soles n'ont subi aucune autre pression que celle de la contamination durant les expérimentations. Les conditions étaient donc probablement trop favorables à l'excrétion des métabolites de HAP, ainsi qu'à la prise en charge rapide et efficace d'éventuels dommages à l'ADN générés.

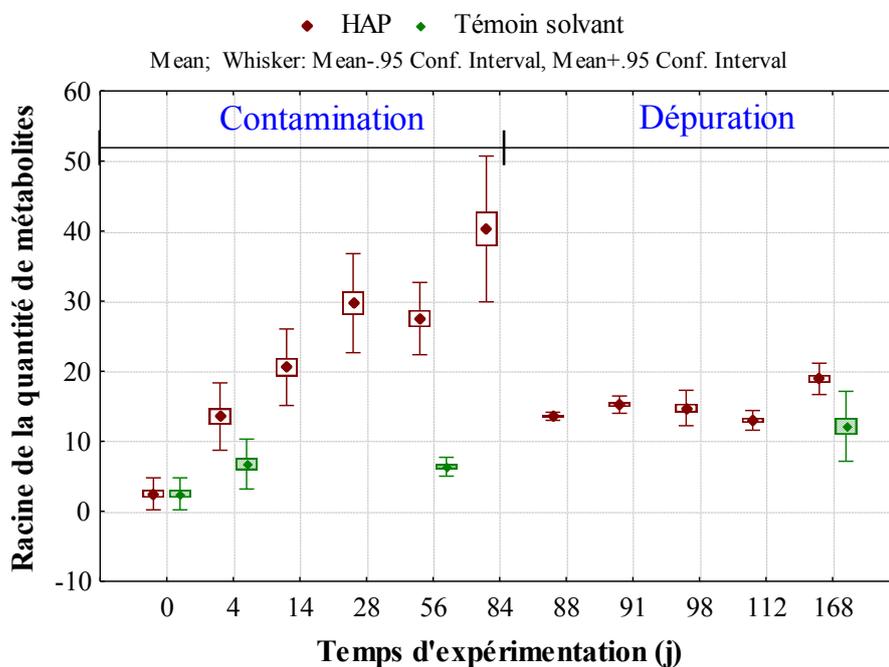


Figure 62 – Quantités de métabolites mesurées au cours de l'expérimentation chez les poissons exposés aux HAP et chez les poissons témoins ($\sqrt{\text{ng/g bile}}$).

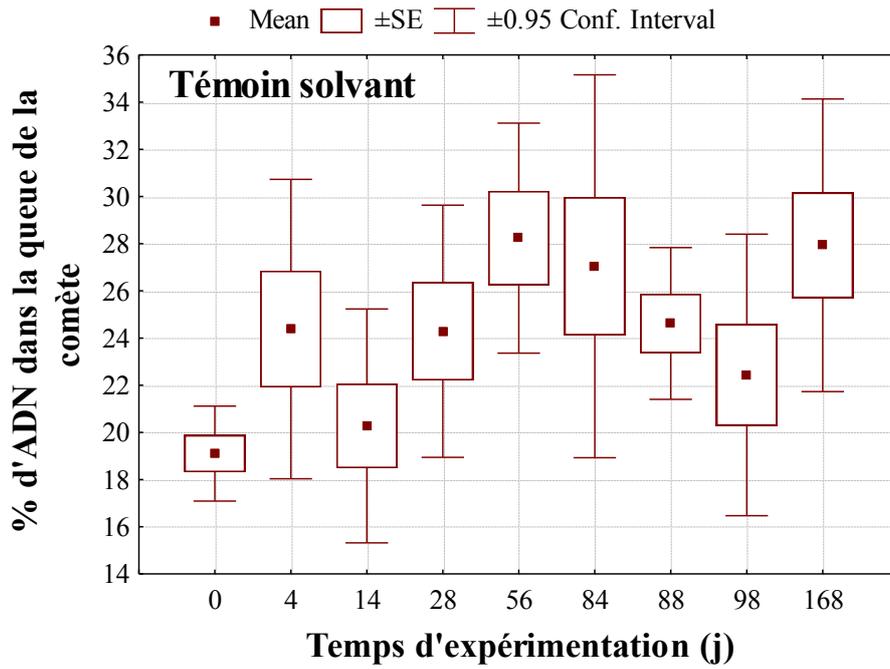


Figure 63 – Niveau de cassures de brins de l'ADN chez les soles du groupe témoin solvant.

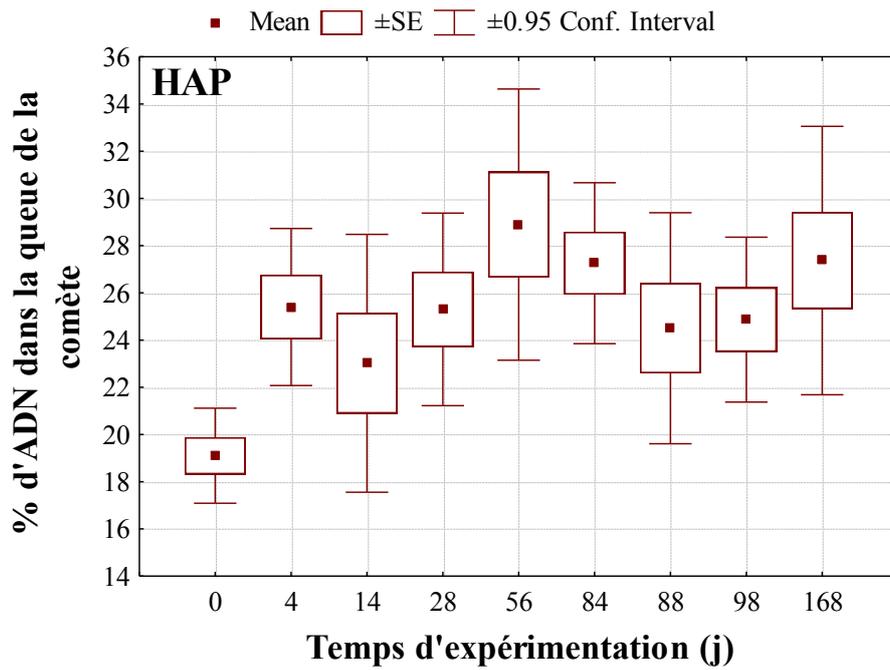


Figure 64 – Niveau de cassures de brins de l'ADN chez les soles exposées aux HAP.

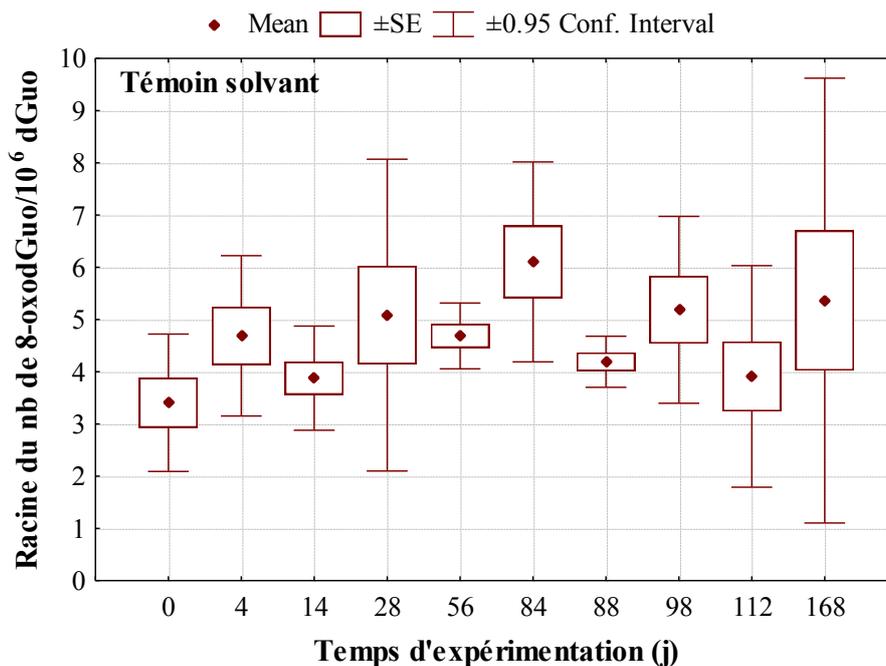


Figure 65 – Niveau de 8-oxodGuo dans le groupe de poissons témoins.

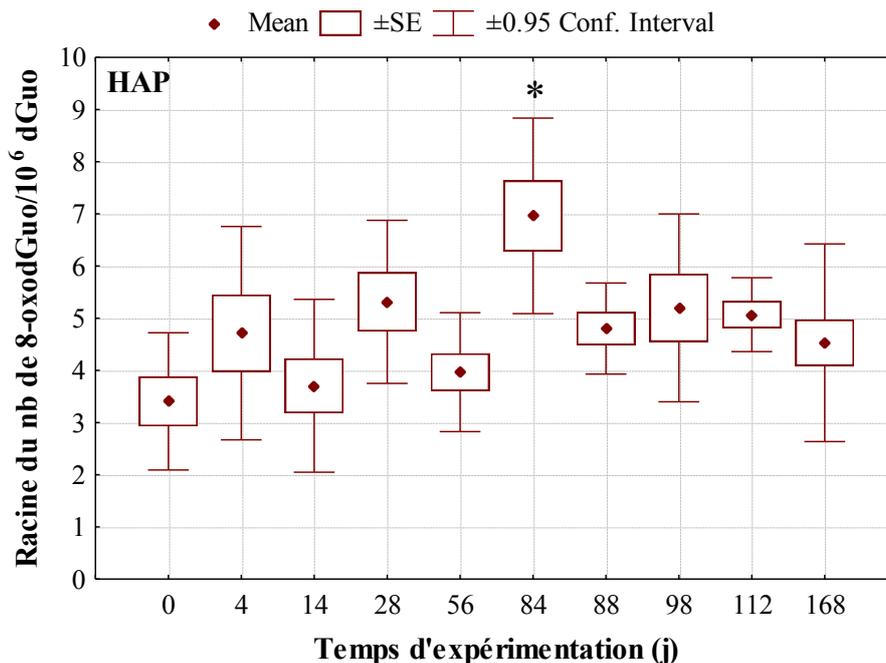


Figure 66 – Niveau de 8-oxodGuo dans le groupe de poissons exposés aux HAP. Les * dénotent les groupes différents du T0.

4.2.2. Exposition *in vivo* à court terme (phase B)

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont fait l’objet d’une publication acceptée dans une issue spéciale du journal Marine Environmental Research, à la suite de leur présentation au congrès international Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO), Mai 2009,

Bordeaux, France : MERE-D-09-00166 . Cette publication constitue l'article 6 (pages 180-183).

Résumé de l'article 6 (pages 180-183)

Le but de ce travail était d'étudier le lien entre l'exposition aux HAP et la génotoxicité chez une espèce de poisson plat. Des juvéniles de soles ont été exposés durant quatre semaines à un mélange de HAP (BaP, Fluo, Pyr) suivies par une semaine de dépuración. Les soles ont été exposées quotidiennement par la voie trophique à une concentration en HAP de 120 µg/g de nourriture. Des prélèvements ont été effectués à différents pas de temps. La biodisponibilité et la biotransformation des HAP ont été évaluées par la mesure du niveau de métabolites biliaires grâce à une nouvelle méthode basée sur l'utilisation de l'UPLC-MS/MS. L'activité de la 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase a été mesurée sur des fractions subcellulaires du foie, en tant que biomarqueur des activités de la phase I de biotransformation. La génotoxicité a été mesurée en parallèle par la mesure du niveau de cassures de brins de l'ADN par un test des comètes. Au cours de cette étude, la production importante de métabolites de HAP par les soles a démontré la biodisponibilité des HAP présents dans la nourriture et les capacités de la sole à les biotransformer. Un effet génotoxique a été observé chez les soles exposées aux HAP, et une corrélation positive a été démontrée entre le niveau de métabolites hydroxylés des HAP et le niveau de cassures de brins de l'ADN.

Article 6 – Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*)

In press in Marine Environmental Research (MERE-D-09-00166),
june 2010.

N. Wessel¹, R. Santos¹, D. Menard¹, K. Le Menach³, V. Buchet², N. Lebayon², V. Loizeau¹,
T. Burgeot¹, H. Budzinski³, F. Akcha^{1a}

ARTICLE IN PRESS

Marine Environmental Research xxx (2010) 1–3



Contents lists available at ScienceDirect

Marine Environmental Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/marenvres

Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*)

N. Wessel^a, R. Santos^a, D. Menard^a, K. Le Menach^c, V. Buchet^b, N. Lebayon^b, V. Loizeau^a, T. Burgeot^a, H. Budzinski^c, F. Akcha^{a,*}

^aIfremer, Department of Biogeochemistry and Ecotoxicology, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes 03, France

^bIfremer, Laboratory of Adaptation, Reproduction and Nutrition of Marine Fish, 29280 Plouzané, France

^cISM, LPTC, University of Bordeaux I, 351 Cours de la Libération, 33405 Talence, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 July 2009
Received in revised form
9 March 2010
Accepted 11 March 2010

Keywords:

Ecotoxicology
Sole
PAH
Metabolites
EROD
Comet assay

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous contaminants in the marine environment. Their toxicity is mainly linked to the ability of marine species to biotransform them into reactive metabolites. PAHs are thus often detected at trace levels in animal tissues. For biomonitoring purposes, these findings have two main consequences, (i) the determination of the PAH tissue concentration is not suitable for the evaluation of individual exposure to PAHs and (ii) it can explain sometimes the lack of correlations obtained with relevant markers of toxicity such as genotoxicity biomarkers.

The aim of the present study was to better investigate the link between PAH exposure and genotoxicity in marine flatfish. During a laboratory experiment, juvenile soles were exposed for four weeks to a mixture of three PAHs, namely benzo[a]pyrene, fluoranthene and pyrene, followed by one week of depuration. Fish were exposed via the trophic route to a daily PAH concentration of 120 µg/g food. Fish were sampled at different time points. The bioavailability and the biotransformation of PAHs were assessed by the measurement of biliary metabolites using a sensitive UPLC MS/MS method. The 7-ethoxyresorufine-O-deethylase was also measured in liver subcellular fractions as a biomarker of phase I biotransformation activities. Genotoxicity was assessed in parallel by the measurement of DNA strand breaks in fish erythrocytes by the alkaline comet assay.

During this study, the high amount of PAH metabolites produced in sole demonstrated the bioavailability of PAHs and their biotransformation by fish enzymes. A positive correlation was observed between the level of hydroxylated PAH metabolites and genotoxicity as measured by the alkaline comet assay.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

In ecotoxicology, there is a need to better assess the exposure level of organisms to chemical pollutants to investigate their toxic effects and their potential impact in the environment. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) present most of the properties required to be classified as Persistent Organic Pollutants (POPs), except the ability to bioaccumulate in organisms (Nfon et al., 2008). As a matter of fact, PAH bioaccumulation is only observed in the first trophic levels. At higher levels, organisms have the ability to biotransform and to eliminate them. As a consequence, PAHs are only detected at trace levels in the tissues, that is the case in fish. In order to assess the level of PAH exposure, several analytical protocols were developed these last years to detect and quantify

several PAH metabolites in biological fluids such as plasma and bile (Zhu et al., 2008).

In the present study, the link between PAH exposure as measured by biliary metabolites and genotoxicity was investigated in a flatfish species, *Solea solea*. The EROD activity was also measured as an indicator of the activity of cytochrome P450-1A1 enzyme that is known to be implicated in the biotransformation of PAHs.

Soles were exposed *in vivo* to an equimolar mixture of benzo[a]pyrene (BaP), pyrene (Pyr), and fluoranthene (Fluo) via the trophic way to a final concentration of 120 µg PAHs/g of food. Fish were fed *ad-libitum* with Dana-ex 1562 (Dana Feed AS). The estimated feeding rate was around 0.8% of body weight per day. In parallel, a control group was fed with food prepared with the solvent used to dissolve the PAHs (Isooctane/Toluene, 90/10). Exposure was conducted for four weeks, followed by one week of depuration. Samplings occurred at days 0, 2, 7, 14 and 28 of exposure and at the

* Corresponding author. Tel.: +33 2 40 37 42 08; fax: +33 2 40 37 42 41.
E-mail address: fakcha@ifremer.fr (F. Akcha).

ARTICLE IN PRESS

2

N. Wessel et al. / Marine Environmental Research xxx (2010) 1–3

end of the 7-day depuration period. At each sampling point, 7–10 fish were sampled in both assay groups for chemical and biological analysis.

For each sampled fish, biometric parameters (fish and liver weight) were measured in order to determinate the hepatosomatic ratio (HSR), which is commonly used as a growth indicator. The gall bladder was sampled individually for the measurement of biliary hydroxylated PAH metabolites (3-OH BaP, 9-OH BaP, 3-OH Fluo, 1-OH Pyr) using a novel and sensitive method based on Ultra Pressure Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry (UPLC/MS/MS) (Le Dû-Lacoste, 2008). The liver of each individual was sampled in order to determine the Ethoxyresorufine-O-Deethylase activity (EROD) as an indicator of phase I biotransformation activities. EROD activity was measured in the S9 subcellular liver fraction according to the method of Burke and Mayer (1974) adapted for microplate reader. For genotoxicity assessment, the alkaline comet assay was applied in fish erythrocytes as previously described by Akcha et al. (2003). The blood from each sampled individual was withdrawn in a freezing medium and stored in liquid nitrogen. A trypan blue viability test was performed on each defrosted blood sample prior to the comet assay. For each sample, two slides were prepared. For each slide, the DNA of 75 nuclei was analyzed by the measurement of the percentage of DNA present in the comet tail and the Olive tail moment (OTM) (Kinetic Imaging 4.0).

During the experiment, no difference in HSR value was observed between the control ($11.87 \times 10^{-3} \pm 3.43 \times 10^{-4}$) and the PAH-exposed groups ($11.55 \times 10^{-3} \pm 3.46 \times 10^{-4}$). Considering the relative short time of the experiment, a negative effect on fish growth was not expected.

Concerning the level of hydroxylated PAH metabolites (Fig. 1A), data were mathematically transformed ($\ln x$) for normalization. Only trace levels were detected in the control group, while a significant time-dependent increase was observed in the PAH-exposed group (Main effect ANOVA, $p < 0.01$). These results demonstrated the bioavailability of PAHs for sole and their biotransformation by fish enzymes.

At the end of the exposure period, the level of PAH metabolites in the exposed group reached more than $74 \mu\text{g}$ of metabolites per g of bile. During all the experiment, the 1-OH Pyr, commonly used as a marker of PAH exposure, was the major metabolite produced, followed by the 3-OH Fluo and the 3-OH BaP, while only trace levels of 9-OH BaP were quantified. Following only one week of depuration, more than 99% of the detected metabolites were excreted, demonstrating that sole rapidly eliminate PAHs.

Despite the production of high amount of PAH metabolites, no difference in EROD activity was observed between control and PAH-exposed fish (Fig. 1B) (Main effect ANOVA, $p = 0.90$). Moreover, no time-variation in EROD activity was observed whatever the experimental group (Main effect ANOVA, $p = 0.32$). The lack of a PAH effect on EROD activity could be explained by the antagonist effect of the different PAHs used for the exposure. In fact, BaP is considered as an inductor of the EROD activity, while an inhibitory effect on this activity was already demonstrated in fish for Fluo and Pyr (Willett et al., 2001; Kopecka-Pilardczyk and Correia, 2009).

Comet data were analyzed by a Main effect ANOVA (Statistica 8.0 Soft). The results of this analysis showed a significant effect of PAH exposure on the level of DNA strand breaks in fish erythrocytes ($p = 0.001$). This genotoxic effect is responsible for an increase respectively of 30% and 17% in OTM and Tail DNA values (Fig. 2). Whatever the experimental group (control, PAH-exposed), no time-effect on comet parameters was demonstrated ($p = 0.90$). That may be due to the relatively high level of DNA damage measured at the beginning of the experiment that doesn't seem to be associated with the freezing process. In a preliminary experiment, the basal

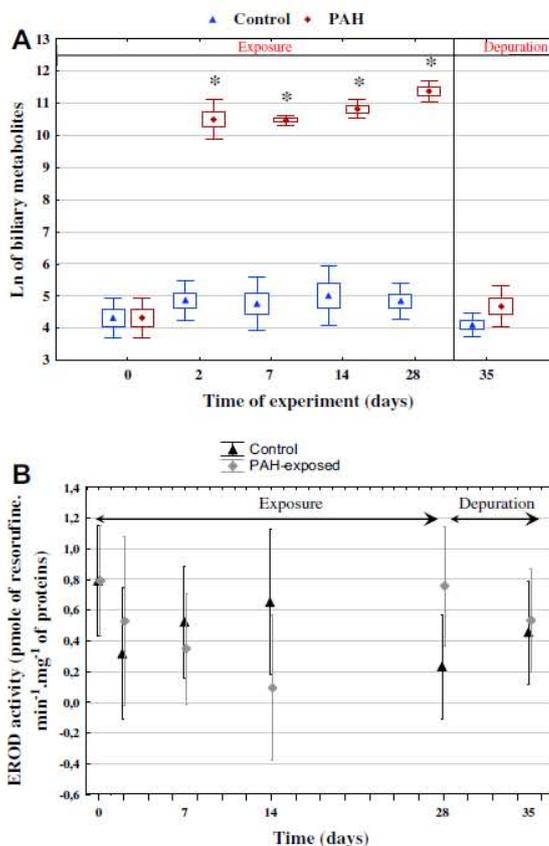


Fig. 1. Levels of biliary hydroxylated metabolites (A) and EROD activity (B) in juveniles of sole from both control and PAH-exposed groups. Boxes denote standard error and whiskers denote 0.95 confidence interval, *: significant differences between groups (Tukey, $p < 0.01$).

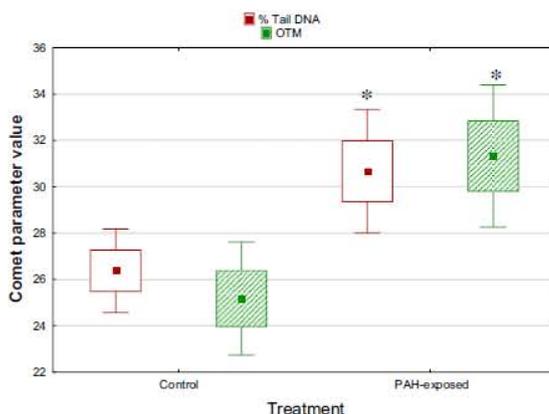


Fig. 2. Levels of DNA strand breaks in juveniles of sole from both control and PAH-exposed groups. Boxes denote standard error and whiskers denote 0.95 confidence interval, *: significant differences between groups ($p < 0.01$).

Please cite this article in press as: Wessel, N., et al., Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD..., Marine Environmental Research (2010), doi:10.1016/j.marenvres.2010.03.004

ARTICLE IN PRESS

N. Wessel et al. / Marine Environmental Research xxx (2010) 1–3

3

Table 1
Correlation matrix among the chemical and biological parameters measured in sole.

HSR	R (X,Y)	HSR			
	<i>p</i>				
Tail DNA	R (X,Y)	-0.260	Tail DNA		
	<i>p</i>	0.043			
OTM	R (X,Y)	-0.224	0.936	OTM	
	<i>p</i>	0.082	0.000		
	<i>p</i>	0.089	0.058	0.047	
Ln (OH-PAH metabolites)	R (X,Y)	-0.087	0.312	0.291	Ln (OH-PAH metabolites)
	<i>p</i>	0.482	0.015	0.024	metabolites)
EROD	R (X,Y)	-0.238	-0.001	0.030	-0.119
	<i>p</i>	0.100	0.996	0.849	0.436

level of DNA strand breaks measured in soles from the same origin (Solea BV, IJmuiden, Holland) and maintained in the same zootechnical conditions was 25% lower. The genotoxic effect measured is thought to result from the absorption and the biotransformation of PAHs in sole, as previously demonstrated by the analysis of biliary PAH metabolites. Among the three selected PAHs, BaP and Fluo have already been shown to be genotoxic in fish (Woo et al., 2006). In the present study, the DNA strand breaks induced by PAH exposure are thought to result from both the induction of an oxidative stress by pro-oxidant PAH metabolites and the excision activity of enzymes involved in the repair of both oxidative DNA damage and adducts.

All the parameters measured during this study were matched in order to check for correlations during the exposure period (Table 1). The level of biliary hydroxylated PAH metabolites was found to be positively correlated with the level of DNA strand breaks ($N = 60$, $p < 0.05$, $R = 0.312$ and 0.291 with Tail DNA and OTM respectively). This correlation is in accordance with the expected role of PAH biotransformation in the induced genotoxicity. A negative correlation was found between the HSR and the level of DNA strand

breaks, that could illustrate the possible consequences at physiological level of toxic events occurring at molecular level ($N = 61$, $p < 0.05$, $R = -0.260$). No correlation was observed between EROD and the other measured parameters.

During the present study, the exposure of sole via the trophic way led to a significant production of PAH metabolites in sole as demonstrated by the increase in the level of hydroxylated PAH metabolites in the bile. The production of these metabolites led to a genotoxic effect, in term of DNA strand breaks. Despite an evident biotransformation of PAHs in sole, no effect was observed on EROD activity. This latter result could be explained by the antagonist effect on this activity of the individual compounds constituting the PAH mixture. A positive correlation between PAH exposure as measured by biliary metabolites and the genotoxic effect was demonstrated, validating the use of metabolite detection as a suitable marker of PAH exposure in fish.

Acknowledgements

This project was supported by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR, ANR-06-PVULN-013) and Ifremer (French Institute for Exploitation of the Sea).

References

- Akcha, F., Vincent-Hubert, F., Pfohl-Leszkowicz, A., 2003. *Mutat. Res.* 534, 21–32.
- Burke, D., Mayer, R.T., 1974. *Drug Metab. Dispos.* 2, 583–588.
- Kopecka-Pilardczyk, J., Correia, A.D., 2009. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1296–1302.
- Le Dû-Lacoste, M., 2008. PhD Thesis, University of Bordeaux 1, France.
- Nfon, E., Cousins, I.T., Broman, D., 2008. *Sci. Total Environ.* 397, 190–204.
- Willett, K.L., Wassenberg, D., Lienesch, L., Reichert, W., Di Giulio, R.T., 2001. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 177, 264–271.
- Woo, S., Kim, S., Yum, S., Yim, U., Lee, T., 2006. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 1768–1775.
- Zhu, S., Li, L., Thornton, C., Carvalho, P., Avery, B.A., Willett, K., 2008. *J. Chromatogr.* 863B, 141–149.

5. Conclusion

L'utilisation de modèles d'exposition *in vitro* (incubations microsomales, hépatocytes primaires) a permis dans un premier temps de démontrer le potentiel des enzymes hépatiques des soles à métaboliser le BaP et le Fluo en métabolites génotoxiques. En effet, après exposition d'hépatocytes de sole au BaP, des dommages oxydatifs à l'ADN en termes de cassures de brins et d'oxydation de base de l'ADN ont pu être observés à partir de concentrations d'exposition respectives de 0,1 et 5 μM (Article 3). Après exposition de microsomes de soles à 20 et 40 μM de BaP en présence d'ADN standard, la formation de trois adduits majoritaires a également été démontrée. Ces adduits ont été caractérisés comme étant formés par l'addition du BPDE sur la dGuo principalement, ainsi que sur la dAdo et la dCyd. Les mécanismes de biotransformation et de génotoxicité du BaP semblent donc être similaires chez la sole et chez les vertébrés supérieurs.

Au cours de la première exposition *in vitro* d'hépatocytes de soles, le Fluo a été démontré comme inhibant l'activité EROD de façon dépendante de la concentration d'exposition. Ces résultats suggèrent que le Fluo pourrait avoir une faible affinité pour le récepteur Ah, dont dépendent les enzymes du CYP1A1. La métabolisation du Fluo pourrait impliquer des enzymes dépendantes d'autres isoformes du CYP450, non contrôlées par son récepteur Ah spécifique. En effet, chez le poisson, l'existence de deux formes de récepteurs Ah a été démontrée (Hahn et al., 2005). Des enzymes dépendantes de CYP450 contrôlés par un second récepteur Ah pourraient être impliquées, comme le CYP1B ou le CYP3A. De plus un effet génotoxique a été démontré en termes de cassures de brins de l'ADN à partir d'une concentration de 5 μM de Fluo, confirmant une bioactivation du Fluo par les enzymes hépatiques de sole. La détection par postmarquage au ^{32}P a également permis de mettre en évidence la formation d'un adduit à l'ADN après exposition d'hépatocytes à des concentrations entre 5 et 50 μM de Fluo. La formation d'adduits à l'ADN a été confirmée lors d'exposition de microsomes de soles en présence d'ADN standard de thymus de veau, où deux adduits ont été observés à partir d'une concentration d'exposition de 100 μM . Bien que la caractérisation des adduits du Fluo n'ait pas pu être effectuée, les résultats obtenus ont été comparés à ceux décrits chez les vertébrés supérieurs (Article 4). L'adduit majoritaire du Fluo pourrait résulter de la liaison entre l'anti-2,3-diol-époxyde-Fluo et la dGuo.

Le Fluo a donc été démontré comme étant génotoxique pour des hépatocytes de sole, lorsque la concentration d'exposition est 50 fois plus importante que la concentration de BaP nécessaire pour induire une génotoxicité. Bien que le Fluo soit en concentration plus importante que le BaP dans les compartiments environnementaux, le rapport des concentrations Fluo/BaP n'atteint pas 50. Si les résultats obtenus *in vitro* étaient vérifiés *in vivo*, il semblerait que le BaP reste le composé génotoxique le plus dangereux dans l'environnement. En revanche, le rapport Fluo/BaP peut atteindre des valeurs supérieures à 50 dans certaines denrées alimentaires, notamment dans les poissons ou les viandes fumés (Purcaro et al., 2009 ; Visciano et al., 2008). Dans ce cas, le Fluo pourrait être plus dangereux que le BaP, en termes de génotoxicité, dans le domaine de la sécurité alimentaire. De plus, une liste regroupant les facteurs d'équivalence toxique (TEF) de certains HAP a été publiée par

l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (Afssa, 2003). Le calcul des TEF permet de sommer le potentiel cancérigène des HAP d'un mélange et de le rapporter à une quantité de BaP, exprimée en équivalent toxique. Un TEF de 1 a été attribué au BaP, qui est utilisé comme référence. Le TEF attribué au Fluo est seulement de 0,01, soit un TEF 100 fois inférieur à celui du BaP. Il serait donc judicieux de réévaluer le TEF du Fluo, afin de ne pas sous-estimer le potentiel cancérigène d'un mélange de HAP dans le domaine de la sécurité alimentaire. De plus, il serait judicieux de prendre systématiquement en compte la concentration du Fluo lors d'études d'évaluation du risque génotoxique tant en environnement qu'en sécurité alimentaire.

La validation d'un système d'exposition miniaturisé (Articles 3 et 4) a permis la réalisation d'expositions d'hépatocytes de soles à certains métabolites du BaP (BPDE, 3-OH-BaP, 6,12-dione-BaP, 7,8-dione-BaP, 7,8-dihydrodiol) et du Fluo (3-OH-Fluo, 2,3-dione-Fluo et 2,3-dihydrodiol-Fluo) (Article 5). Concernant les métabolites du BaP, seule la 6,12-dione-BaP a entraîné une augmentation significative de l'activité EROD, bien qu'à un niveau plus faible que celle observée avec le composé parent. Cependant, chacun des 5 métabolites du BaP testés forme des cassures de brins de l'ADN dès la plus faible concentration d'exposition de 0,05 µM. Le BPDE est le métabolite dont l'effet génotoxique est le plus important. Lors de l'exposition au Fluo et à certains de ses métabolites, aucun composé n'a été démontré comme modulant le niveau d'activité de l'EROD. Tous les métabolites du Fluo ainsi que le composé parent ont entraîné une augmentation du niveau de cassures de brins de l'ADN. Cette augmentation n'est cependant pas significative, du fait d'un niveau de dommages relativement élevé dans le témoin solvant. Seul le 3-OH-Fluo induit un niveau significatif de dommages à la plus forte concentration d'exposition de 5 µM.

Des expositions à une concentration plus faible (0,01 µM) en BaP et ses métabolites ainsi qu'à une concentration plus élevée (25 µM) en Fluo et ses métabolites ont été réalisées en parallèle. Les analyses de ces échantillons sont en cours et permettront de vérifier la concentration à partir de laquelle un effet génotoxique de chacun des composés peut être observé. Ces résultats permettront de finaliser la rédaction de l'article 5. Par la suite, de nouvelles expositions aux HAP ainsi qu'aux métabolites pour lesquels un effet génotoxique a été démontré, pourraient être réalisées en flasques à des gammes de concentrations plus restreintes. Ces expérimentations permettraient de mesurer le niveau de la base oxydée 8-oxodGuo, ainsi que le niveau d'adduits à l'ADN généré par ces expositions. Ces résultats pourraient apporter de nouvelles informations quant aux mécanismes de génotoxicité majoritaires du Fluo et du BaP chez la sole.

Les résultats des expositions *in vivo* ont permis de démontrer la génotoxicité d'un mélange équimolaire de trois HAP (BaP, Fluo, Pyr) lorsque les organismes sont exposés de façon chronique à de fortes concentrations. Une corrélation positive a été mise en évidence entre le niveau de cassures de brins de l'ADN et le niveau de métabolites biliaires de HAP. La quasi-totalité des métabolites biliaires est excrétée dès 7 jours de dépuración, démontrant la continuité des activités de biotransformation jusqu'à l'obtention d'un niveau basal de métabolites biliaires. Le faible niveau de dommages à l'ADN observé n'ayant pas permis de discerner les groupes au dernier jour de contamination et après 7 jours de dépuración, la

réversibilité de la génotoxicité semble possible, mais reste à confirmer. L'activité EROD n'a pas été modulée par ces expositions. Cela pourrait être dû à des effets antagonistes de ces trois HAP sur le niveau d'activité de cette enzyme de biotransformation. L'absence de modulation de l'EROD, alors qu'un effet génotoxique est observé, démontre l'importance de la mesure de différents biomarqueurs d'exposition et d'effets lors des études écotoxicologiques.

L'utilisation de mélanges au cours des études *in vivo* permet de se rapprocher des conditions environnementales. Cependant, la génotoxicité mesurée lors des expositions *in vivo* peut être due à la présence de chaque HAP indépendamment ou de leurs effets combinés synergiques ou antagonistes. Les adduits à l'ADN sont les seules lésions à l'ADN pouvant être spécifiques d'un composé. Bien que trois adduits du BaP aient pu être identifiés comme provenant du BPDE, la caractérisation des adduits du Fluo et la production de standards de ces adduits est une des perspectives majeures de ce travail. Cela permettrait la détection d'adduits spécifiques du BaP et du Fluo après exposition à des mélanges et pourrait donner des éléments de réponse quant à l'implication de chaque HAP dans la réponse globale. Ainsi, il serait possible de vérifier si les différences de génotoxicité entre le Fluo et le BaP observées *in vitro* sont également observées à l'échelle de l'organisme. De plus, l'utilisation de standards lors d'études de biosurveillance permettrait d'étudier *in situ* l'implication des HAP dans la réponse génotoxique globale.

Dans le cadre du projet Sole BEMol, une troisième expérimentation est actuellement en cours, visant à étudier la relation entre la génotoxicité des HAP et leurs effets à long terme sur la croissance et la reproduction. Des juvéniles de soles ont été exposées pendant 12 mois au même mélange de HAP, suivis d'une période de dépuración de 6 mois. Cette expérimentation étant menée à long terme, une concentration de 13 µg de HAP par g de nourriture a été choisie. L'analyse des résultats est actuellement en cours.

Discussion générale, conclusion et perspectives

La contamination du milieu marin, et plus particulièrement des écosystèmes côtiers par de nombreux polluants chimiques peut avoir des répercussions sur les organismes y vivant, et ce de l'échelle moléculaire à celle de la population. La sole est un poisson plat, benthique, dont les zones de nurseries se situent en milieu côtier, et qui représente un fort intérêt économique. Dans le golfe de Gascogne, elle constitue la première espèce sur le plan économique (48 M€ en 2004, Durieux, 2007). Cependant, certains grands stocks de soles, comme celui de la Mer du Nord, sont en diminution. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées quant à ce déclin, comprenant la pression de pêche ainsi que la contamination chronique du milieu. Chaque année, l'ajustement des totaux admissibles de captures a pour but de contrebalancer la pression de pêche et de maintenir ainsi un recrutement suffisant pour une exploitation durable des stocks. Différents programmes européens sont mis en œuvre afin d'évaluer et de diminuer l'impact de la contamination du milieu sur la dynamique des populations. Ces programmes visent à répondre aux réglementations et aux normes de bon état écologique du milieu, définies notamment par la DCE et la DCSMM. Afin de permettre une meilleure évaluation des effets des contaminants à l'échelle de la population, l'étude de leurs mécanismes de toxicité à différents niveaux d'organisation biologique apparaît nécessaire. Parmi les contaminants majoritaires en milieu côtier et estuarien se trouvent les HAP. En écotoxicologie, un panel de biomarqueurs a été développé afin d'évaluer l'exposition des organismes aux HAP, et leurs effets toxiques (JAMP, 2009 ; Van der Oost, 2003). Parmi ces biomarqueurs, la mesure des métabolites biliaires de HAP est un des marqueurs d'exposition les plus sensibles. Les HAP étant connus pour leur potentiel génotoxique et cancérigène, ils représentent un intérêt majeur pour l'étude des mécanismes de génotoxicité et le développement de biomarqueurs d'effets.

Le but de cette thèse était d'étudier les mécanismes de bioactivation du BaP et du Fluo, ainsi que leurs effets génotoxiques chez la sole, espèce sentinelle du milieu marin. Les mécanismes de biotransformation des HAP ont été étudiés par la détection et la quantification des métabolites produits par les enzymes hépatiques de sole. La génotoxicité des HAP a été mesurée en parallèle à différents niveaux d'organisation biologique grâce à l'utilisation de modèles d'exposition *in vitro* (microsomes hépatiques, hépatocytes primaires) et *in vivo* (mésocosmes, projet Sole BEMol).

Le premier axe de cette thèse visait à étudier les voies de biotransformation des HAP suivant deux techniques complémentaires. Les résultats obtenus ont démontré une production majoritaire des dihydrodiols et des phénols. L'application de la Radio-HPLC a permis d'observer les profils métaboliques complets de ces deux HAP après exposition aux composés radiomarqués. Pour les deux HAP, des similarités ont été observées entre les profils métaboliques obtenus chez la sole dans le cadre de ma thèse et ceux obtenus chez le porc par l'UMR Xénobiotiques. Les métabolites du BaP ayant été caractérisés chez le porc, il a été possible de réaliser une identification *a priori* des métabolites du BaP formés chez la sole. Les

proportions relatives de chaque famille de métabolite ont été calculées chez la sole, et la production de phénols et de dihydrodiols est apparue comme prédominante (48% et 34% respectivement). De plus, la détection présumée de tétraols du BaP en Radio-HPLC suggère la production de leur précurseur, le BPDE, carcinogène ultime du BaP. Concernant le Fluo, les métabolites produits chez les vertébrés supérieurs n'ont pas encore fait l'objet d'une caractérisation par spectrométrie de masse. En conséquence, leur identification chez la sole reste hypothétique et partielle. Elle est basée sur les données obtenues *in vivo* chez la sole concernant la caractérisation des métabolites conjugués du Fluo (Hillenweck et al., 2008). Les proportions relatives des différentes familles de métabolites présumés ont également été calculées. Comme pour le BaP, les phénols et les dihydrodiols du Fluo sembleraient majoritaires (43% et 54% respectivement). D'après les taux de métabolisation calculés, les enzymes de microsomes hépatiques de sole semblent métaboliser le Fluo (29%) plus efficacement que le BaP (6%). Les différences de conformation structurale entre ces deux molécules pourraient expliquer ce résultat. Le Fluo ne possédant que 4 cycles aromatiques, alors que le BaP en compte 5, pourrait être biotransformé plus rapidement. De plus, le Fluo pourrait avoir une affinité différente de celle du BaP pour le récepteur Ah dont dépendent certaines enzymes du CYP1A1 connues pour être impliquées dans la biotransformation du BaP (Pushparajah et al., 2008b ; Hahn et al., 2002). L'utilisation de l'UPLC-MS/MS a permis quant à elle de quantifier de façon sensible certains métabolites ou familles de métabolites à l'aide de standards. Afin d'étudier les différences de métabolisation entre espèces de poissons plats, ces analyses ont été réalisées en parallèle chez la sole et chez la limande. Les parts relatives de certaines familles de métabolites ont pu être calculées. Quel que soit le HAP considéré, elles sont très proches de celles obtenues après détection en Radio-HPLC. Ces analyses confirment donc une production majoritaire des phénols (44% pour le BaP et 58% pour le Fluo en moyenne) et des dihydrodiols (37% pour le BaP et 40% pour le Fluo en moyenne) chez la sole. Du fait que les proportions calculées des différentes familles de métabolites soient proches quelle que soit la technique utilisée, l'identification *a priori* des métabolites détectés en Radio-HPLC semble vérifiée. Au cours de ces études *in vitro*, des différences de métabolisme entre la sole et la limande ont été mises en évidence. Bien que les profils métaboliques obtenus chez les deux espèces montrent des similarités, des différences dans les taux de biotransformation ont été observées. En effet, les enzymes de limande semblent biotransformer le BaP et le Fluo à des taux environ deux fois inférieurs à ceux mesurés chez la sole (Table 19). Les différences dans les taux de biotransformation pourraient être expliquées par l'existence de différences dans le niveau des activités enzymatiques de biotransformation des différents lots de poissons utilisés pour ces expérimentations. Cette activité de base est contrôlée par de nombreux facteurs biotiques (âge, sexe...) et abiotiques (régime alimentaire). La métabolisation du BaP et du Fluo chez les deux espèces considérées semble donc se faire par des mécanismes similaires à ceux des vertébrés supérieurs. La biotransformation du Fluo pourrait donc mener chez la sole à la production de métabolites génotoxiques, comme le diol-époxyde-Fluo.

Le second axe de cette thèse avait pour objectif d'évaluer le potentiel génotoxique du BaP et du Fluo chez la sole. Pour cela des expositions à différents niveaux (subcellulaire, cellulaire, individuel) ont été réalisées. Les expositions *in vitro* d'hépatocytes de sole et d'ADN standard

de thymus de veau en présence de microsomes hépatiques de sole ont permis de démontrer le potentiel génotoxique de ces deux HAP et de certains de leurs métabolites à des concentrations relativement faibles.

Concernant le BaP, au niveau subcellulaire, l'exposition *in vitro* d'ADN standard de thymus de veau en présence de protéines microsomales de foies de soles a permis de démontrer la formation de trois adduits à l'ADN à partir d'une concentration d'exposition de 20 μM . L'utilisation de l'HPLC-MS/MS a rendu possible l'identification de ces adduits. Les adduits du BaP résultent chez la sole de la liaison entre le BPDE et la dGuo principalement, ainsi qu'avec la dAdo et la dCyd. Au niveau cellulaire, après exposition d'hépatocytes de soles au BaP, un effet génotoxique, en termes de cassures de brins de l'ADN, a été démontré à partir d'une concentration d'exposition de 0,1 μM . De plus, le BaP induit chez les hépatocytes de sole, un effet au niveau de l'activité EROD, marqué par une augmentation de l'activité aux plus faibles concentrations, suivie d'une diminution aux plus fortes concentrations. Au cours d'expositions d'hépatocytes de sole, tous les métabolites du BaP testés (4,5-dihydrodiol, 3-OH-BaP, 6,12- et 7,8-dione-BaP et BPDE) ont induit chez les hépatocytes de sole un niveau de cassures de brins de l'ADN significatif dès la plus faible concentration d'exposition de 0,05 μM . Parmi eux, le BPDE est le métabolite le plus génotoxique en termes de cassures de brins de l'ADN. Au cours de ces expositions, parmi les métabolites testés, seule la 6,12-dione-BaP a été démontrée comme induisant une augmentation de l'activité EROD, à un niveau plus faible que celui mesuré après exposition au BaP. Ces résultats suggèrent un fort potentiel génotoxique du BaP chez la sole. En effet, la production majoritaire de dihydrodiols démontre une biotransformation prédominante par la voie des diol-époxydes et par la voie des *o*-quinones. Ces deux voies peuvent entraîner un stress oxydant, ainsi que la production d'adduits à l'ADN. Après exposition *in vitro*, la détection et la caractérisation d'adduits à l'ADN formés par l'addition du BPDE sur les bases de l'ADN semble démontrer une prédominance de la voie des diol-époxydes chez la sole. Bien que les quinones n'aient été quantifiées qu'en faibles quantités, la production majoritaire de leurs précurseurs, les phénols, suggère leur formation. De plus, la génotoxicité du 3-OH-BaP pourrait être liée à la production subséquente de quinones.

Le Fluo est également apparu comme génotoxique *in vitro*. Après exposition de microsomes hépatiques de sole en présence d'ADN standard à 100 μM de Fluo, la production de deux adduits a été observée. Lors des expositions d'hépatocytes de soles aux plus fortes concentrations de Fluo (5-50 μM), la production d'un adduit à l'ADN a également été démontrée. De plus, l'exposition d'hépatocytes de sole au Fluo a entraîné une augmentation du niveau de cassures de brins de l'ADN à partir d'une concentration d'exposition de 5 μM . *In vitro*, le Fluo a entraîné une diminution de l'activité EROD des hépatocytes de soles, suggérant ainsi une interaction avec le récepteur Ah, dont dépendent les enzymes du CYP1A1. La métabolisation du Fluo pourrait donc être catalysée par des enzymes autres que les enzymes dépendantes du CYP1A1. L'implication d'autres isoformes du CYP450 connues pour être également impliquées dans la métabolisation des HAP, telles que par exemple le CYP1B1, pourrait être possible. A la suite d'expositions d'hépatocytes de soles au Fluo et à certains de ses métabolites, seul le 3-OH-Fluo a induit un niveau de cassures de brins de

l'ADN significatif, bien que le 2,3-dihydrodiol-Fluo et la 2,3-dione-Fluo semblent également générer une génotoxicité plus faible. *In vitro*, la génotoxicité du BaP apparaît donc à des concentrations 50 fois plus faibles que les concentrations de Fluo nécessaires pour induire un niveau significatif de dommage à l'ADN. Le BPDE et le 3-OH-Fluo sont les métabolites les plus génotoxiques du BaP et du Fluo respectivement

À la suite des expositions *in vivo*, le mélange de BaP+Fluo+Pyr a induit un effet génotoxique chez les soles lorsque les concentrations utilisées étaient les plus importantes. Au cours de la première expérimentation, aucun effet génotoxique significatif n'a été mesuré lorsque les soles ont été exposées durant 3 mois à un mélange de HAP à une concentration de 5,875 µg de HAP par g de nourriture. Les concentrations en HAP utilisées au cours de cette expérimentation étaient environ 9 fois supérieures à celles mesurées dans les sédiments de Seine. Cependant, il semblerait que les conditions expérimentales aient été trop favorables à l'excrétion des HAP, notamment la période de jeûne de 24 h avant chaque prélèvement, qui a permis l'élimination d'une partie des métabolites de HAP produits. Les faibles niveaux de métabolites biliaires de HAP mesurés semblent conforter cette hypothèse. Lorsque les soles ont été exposées à des concentrations plus importantes (120 µg/g) pendant un mois, un effet génotoxique en termes de cassures de brins de l'ADN a été observé. À ces fortes concentrations, les niveaux de métabolites biliaires de HAP confirment une ingestion et une métabolisation relativement plus importante. Cependant, l'activité de l'EROD n'a pas été modulée par l'exposition. Des effets antagonistes des trois HAP présents dans le mélange pourraient expliquer ce résultat. Le BaP est connu pour activer l'EROD, tandis que le Fluo et le Pyr ont été démontrés comme inhibant cette activité. Chez le poisson, il existe deux récepteurs Ah, chacun contrôlant différentes isoformes du CYP450. D'autres enzymes, dépendantes d'autres isoformes du CYP450, pourraient être impliquées dans la métabolisation de ces HAP, permettant la formation de métabolites génotoxiques. Ces résultats démontrent l'importance de l'utilisation combinée de plusieurs biomarqueurs d'exposition et d'effets pour l'étude de la métabolisation des HAP. En effet, bien qu'aucune corrélation n'ait été mise en évidence entre l'activité EROD et les autres marqueurs, une corrélation positive a été démontrée entre la mesure du niveau de métabolites biliaires de HAP et le niveau de cassures de brins de l'ADN. Les concentrations induisant un effet génotoxique étaient environ 200 fois supérieures à celles mesurées dans les sédiments de la Baie de Seine. Cependant, en conditions environnementales, les poissons sont soumis à des mélanges de contaminants beaucoup plus variés. Les interactions entre ces différents contaminants (HAP, PCB, PBDE, dioxines, pesticides...) sont peu connues, étant très difficiles à évaluer. Des effets synergiques ou antagonistes peuvent être observés. Les soles utilisées lors des expérimentations *in vivo* étant des juvéniles, les résultats obtenus permettent de démontrer la capacité de jeunes organismes à métaboliser les HAP en métabolites génotoxiques.

En perspective de ce travail, après incubations de microsomes de soles, la collecte des métabolites du BaP et du Fluo détectés en Radio-HPLC, et leur caractérisation structurale par spectrométrie de masse permettrait de vérifier leur identification *a priori*. De plus, cela permettrait de vérifier la production de métabolites électrophiles du Fluo. La possibilité de produire des standards spécifiques de ces métabolites permettrait leur quantification en

UPLC-MS/MS. Ainsi, il serait possible de vérifier les différences observées entre les techniques analytiques. De nouvelles expositions réalisées sur des microsomes de soles et de limandes pêchées aux mêmes périodes sur des sites de typologie identique, et dont certains paramètres biotiques auraient été déterminés, permettrait d'étudier l'influence de ces facteurs sur les niveaux de base de certaines activités enzymatiques des poissons benthiques, et d'étudier les différences de métabolisation entre espèces.

Lors des expositions *in vitro* d'hépatocytes de sole au BaP, au Fluo et à certains de leurs métabolites, des hépatocytes ont été exposés à une plus faible concentration de BaP et de ses métabolites (0,01 μM), ainsi qu'à une plus forte concentration de Fluo et de ses métabolites (25 μM). L'analyse de ces échantillons permettra de compléter les résultats obtenus, et devrait rendre possible la détermination des concentrations à partir desquelles un effet génotoxique peut être observé pour chaque composé. En perspective, de nouvelles expositions d'hépatocytes primaires de soles en flasques à une gamme de concentrations plus restreinte de chaque composé génotoxique permettrait de mesurer séparément le niveau de la base oxydée 8-oxodGuo et le niveau d'adduits à l'ADN engendrés par les expositions. Ainsi, pour chaque métabolite, il serait possible de déterminer si les effets génotoxiques mesurés sont dus principalement à un stress oxydatif ou à la production d'adduits à l'ADN. Après de nouvelles expositions d'hépatocytes de sole au Fluo, la mesure de l'expression de différentes isoformes du CYP450 au niveau moléculaire chez la sole permettrait d'obtenir de nouvelles informations quant aux mécanismes de biotransformation du Fluo. Le 3-OH-Fluo étant un des métabolites du Fluo produit majoritairement et le métabolite le plus génotoxique, l'étude approfondie des mécanismes de génotoxicité de ce composé serait nécessaire. Afin de pouvoir caractériser les adduits du Fluo, de nouvelles expositions au niveau subcellulaire devraient être réalisées. Pour cela, l'utilisation de quantités plus importantes de protéines microsomales de sole, d'ADN standard et de Fluo devrait permettre une production d'adduits suffisante pour leur caractérisation par spectrométrie de masse. De plus, des expositions d'hépatocytes de sole en flasques à chaque métabolite suivies par la détection d'adduits par postmarquage au ^{32}P devrait permettre d'apporter des éléments de réponse quant aux métabolites impliqués dans la formation d'adduits à l'ADN. La démonstration de la génotoxicité du Fluo *in vitro* permet de suggérer qu'il pourrait également être génotoxique *in vivo*. Étant donné qu'il est un des HAP les plus abondants dans le milieu marin et dans l'alimentation humaine, la mesure systématique de sa concentration serait judicieuse lors d'études de biosurveillance, ainsi qu'en sécurité alimentaire.

Lors des expositions *in vivo*, un effet génotoxique d'un mélange de HAP, corrélé au niveau de métabolites biliaires de HAP, a pu être mis en évidence chez des juvéniles de soles. De même que lors des expositions *in vitro*, la mesure de la base oxydée 8-oxodGuo et du niveau d'adduits à l'ADN permettrait d'évaluer les parts respectives de chacun de ces types de dommages dans la réponse globale. De plus, la formation d'adduit étant une lésion spécifique d'un composé, la caractérisation des adduits formés permettrait de renseigner sur la part de chaque HAP dans la réponse génotoxique globale. Cela permettrait également de vérifier *in vivo* les différences de génotoxicité du BaP et du Fluo observées *in vitro*. Si ces différences

étaient aussi marquées *in vivo* qu'*in vitro*, le BaP serait donc plus dangereux que le Fluo dans l'environnement, en terme de génotoxicité.

La capacité de juvéniles de soles à biotransformer les HAP en métabolites génotoxiques, suggère qu'il est probable que la sole puisse métaboliser les HAP à des stades encore plus précoces. Chez l'huître creuse, une corrélation a pu être mise en évidence entre des effets génotoxiques et embryotoxiques lors des premiers stades de développement, comme le démontrent les résultats de l'article 7 (Annexe 9, pages 236-246). Les effets génotoxiques pourraient donc être précurseurs d'embryotoxicité et de tératogénicité. Chez la sole, une étape cruciale du développement est la métamorphose, dont le mécanisme n'a pas encore été totalement élucidé. L'exposition de soles à différents HAP avant ou pendant la métamorphose pourraient entraîner des effets génotoxiques, embryotoxiques, et tératogènes, et avoir des répercussions sur les principales fonctions physiologiques telles que la croissance et la reproduction. En conditions environnementales, ce type d'effet pourrait mener à la mort des organismes. L'extrapolation de ces effets à une plus grande échelle spatio-temporelle pourrait donc avoir un impact au niveau populationnel. Il serait donc important d'étudier la corrélation entre génotoxicité et tératogénicité chez la sole lors des étapes cruciales du développement comme la métamorphose. Ces résultats pourraient permettre de mieux appréhender l'impact des HAP chez la sole, au niveau populationnel.

Enfin, l'étude des effets de mélanges de contaminants reste une priorité environnementale pour permettre une interprétation des données obtenues lors d'études de biosurveillance. Pour cela, des expositions en milieu contrôlé à des sédiments provenant de différents sites est un des meilleurs moyens pour se rapprocher des conditions environnementales. La relation entre les profils de contamination et les réponses en termes de modulation des activités enzymatiques et de génotoxicité pourrait ainsi être étudiée. Par la suite, des études similaires pourraient être réalisées pour d'autres composés métabolisés par le poisson. Par exemple, la présence de HAP alkylés dans l'environnement constitue également une problématique environnementale. Dans certaines zones, les concentrations en HAP alkylés peuvent atteindre des concentrations équivalentes à celles des HAP (Yunker et al., 2002). Peu de données sont disponibles quant aux mécanismes de biotransformation et aux effets de ces molécules. De part leur différence de conformation, liée à la présence de chaînes alkylées, des mécanismes de biotransformation différents pourraient être impliqués. Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse par combinaison de méthodes *in vitro* et *in vivo* permet une étude mécanistique des voies d'activation métaboliques et il est tout à fait transposable pour l'étude des mécanismes de bioactivation d'autres polluants organiques hydrophobes. De plus, le couplage d'approches *in vitro* et *in vivo* pourrait être appliqué en screening et lors d'études de biosurveillance.

Références bibliographiques

- A -

- Aas, E., Beyer, J., Jonsson, G., Reichert, W.L., Andersen, O.K. 2001. Evidence of uptake, biotransformation and DNA binding of polyaromatic hydrocarbons in Atlantic cod and corkwing wrasse caught in the vicinity of an aluminium works. *Marine Environmental Research* 52 (3):213-229.
- Afssa, 2003. Avis du 29 juillet 2003. Saisine n°2000-SA-0005.
- Ahokas, J.T., Pelkonen, O. 1984. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fish liver cytochrome P-450. *Marine Environmental Research* 14 (1-4):59-69.
- Akcha, F., Burgeot, T., Narbonne, J. F., Garrigues, P. 2003. Metabolic Activation of PAHs: Role of DNA Adduct Formation in Induced Carcinogenesis. In *PAHs: An Ecotoxicological Perspective*, edited by Peter, E.T.D.
- Azqueta, A., Shaposhnikov, S., Collins, A.R. 2009. DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 674 (1-2):101-108.

- B -

- Babson, J.R., Russo-Rodriguez, S.E., Wattley, R.V. 1986,a. Microsomal activation of fluoranthene to mutagenic metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology* 85 (3):355-366.
- Babson, J.R., Russo-Rodriguez, S.E., Rastetter, W.H., Wogan, G.N. 1986,b. In vitro DNA-binding of microsomally-activated fluoranthene: evidence that the major product is a fluoranthene N2-deoxyguanosine adduct. *Carcinogenesis* 7 (6):859-865.
- Balu, N., Padgett, W.T., Lambert, G.R., Swank, A.E., Richard, A.M., Nesnow, S. 2004. Identification and Characterization of Novel Stable Deoxyguanosine and Deoxyadenosine Adducts of Benzo[a]pyrene-7,8-quinone from Reactions at Physiological pH. *Chemical Research in Toxicology* 17 (6):827-838.
- Balu, N., Padgett, W.T., Nelson, G.B., Lambert, G.R., Ross, J.A., Nesnow, S. 2006. Benzo[a]pyrene-7,8-quinone-3'-mononucleotide adduct standards for 32P postlabeling analyses: Detection of benzo[a]pyrene-7,8-quinone-calf thymus DNA adducts. *Analytical Biochemistry* 355 (2):213-223.
- Barata, C., Calbet, A., Saiz, E., Ortiz, L., Maria Bayona, J. 2005. Predicting single and mixture toxicity of petrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) to the copepod *Oithona davisae*. Implications for environmental risk assessment of oil spills in the marine plankton food web. *Symposium on Marine Accidental Oil Spill*.
- Barbee, G.C., Barich, J., Duncan, B., Bickham, J.W., Matson, C.W., Hintze, C.J., Autenrieth, R.L., Zhou, G.-D., McDonald, T.J., Cizmas, L., Norton, D., Donnelly, K.C. 2008. In situ biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71 (2):454-464.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Narbonne, J.F., Burgeot, T., Michel, X., Bellocq, J. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus* sp.) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Marine Environmental Research* 47 (5):415-439.

- Baumard, P., Budzinski, H., Michon, Q., Garrigues, P., Burgeot, T., Bellocq, J. 1998. Origin and Bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from Mussel and Sediment Records. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 47 (1):77-90.
- Bjelland, S., Seeberg, E. 2003. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 531 (1-2):37-80.
- Bock, K.W., Raschko, F.T., Gschaidmeier, H., Seidel, A., Oesch, F., Grove, A.D., Ritter, J.K. 1999. Mono- and diglucuronide formation from benzo[a]pyrene and chrysene diphenols by AHH-1 cell-expressed UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7. *Biochemical Pharmacology* 57 (6):653-656.
- Boiteux, S., Guillet, M. 2004. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 3 (1):1-12.
- Boitsov, S., Jensen, H.K.B., Klungsoyr, J. 2009. Natural background and anthropogenic inputs of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in sediments of South-Western Barents Sea. *Marine Environmental Research* 68 (5):236-245.
- Borgen, A., Darvey, H., Castagnoli, N., Crocker, T.T., Rasmussen, R.E., Wang, I.Y. 1973. Metabolic conversion of benzo[a]pyrene by Syrian hamster liver microsomes and binding of metabolites to deoxyribonucleic acid. *Journal of Medicinal Chemistry* 16 (5):502-506.
- Bouloubassi, I., Saliot, A. 1993. Dissolved, particulate and sedimentary naturally derived polycyclic aromatic hydrocarbons in a coastal environment: geochemical significance. *Marine Chemistry* 42 (2):127-143.
- Boysen, G., Hecht, S.S. 2003. Analysis of DNA and protein adducts of benzo[a]pyrene in human tissues using structure-specific methods. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 543 (1):17-30.
- Bradford, M. 1976. A rapid method quantification of protein utilising the principle dried binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-264.
- Brown, P.J., Long, S.M., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Hankard, P.K. 2004. Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Chemosphere* 57 (11):1675-1681.
- Burczynski, M.E., Harvey, R.G., Penning, T.M. 1998. Expression and Characterization of Four Recombinant Human Dihydrodiol Dehydrogenase Isoforms: Oxidation of trans-7,8-Dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene to the Activated o-Quinone Metabolite Benzo[a]pyrene-7,8-dione. *Biochemistry* 37 (19):6781-6790.
- Burdick, A.D., Davis, J.W., Liu, K.J., Hudson, L.G., Shi, H., Monske, M.L., Burchiel, S.W. 2003. Benzo(a)pyrene Quinones Increase Cell Proliferation, Generate Reactive Oxygen Species, and Transactivate the Epidermal Growth Factor Receptor in Breast Epithelial Cells. *Cancer Research* 63 (22):7825-7833.
- Burgeot, T., Bocquéné, G., Porte, C., Dimeet, J., Santella, R.M., Garcia de la Parra, L.M., Pffhol-Leszkowicz, A., Raoux, C., Galgani, F. 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series* 131:125-141.
- Burrows, C.J., Muller, J.G. 1998. Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chemical Reviews* 98 (3):1109-1152.

— C —

- Cachot, J., Degrémont, C. 2008. Quel est le risque génotoxique en estuaire de Seine ? *Programme Scientifique Seine-Aval*:70 pp.

- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., Budzinski, H. 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology* 79 (3):257-267.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., Ravanat, J.L. 1997. Oxidative damage to DNA: Formation, Measurement, and Biological Significance. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 131:1-87.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.-P., Ravanat, J.-L., Sauvaigo, S. 1999. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 424 (1-2):9-21.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., Ravanat, J.-L. 2003. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 531 (1-2):5-23.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Hilde, D., LeMenach, K., Budzinski, H. 2007. Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoïda, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70 (2):270-280.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Peluhet, L., LeMenach, K., Souissi, S., Budzinski, H. 2009. Tidal influence on the distribution of hydrophobic organic contaminants in the Seine Estuary and biomarker responses on the copepod *Eurytemora affinis*. *Environmental Pollution* 157 (1):64-71.
- Carlson, E.A., Li, Y., Zelikoff, J.T. 2002. The Japanese medaka (*Oryzias latipes*) model: applicability for investigating the immunosuppressive effects of the aquatic pollutant benzo[a]pyrene (BaP). *Marine Environmental Research* 54 (3-5):565-568.
- Cavalieri, E.L., Rogan, E.G. 1985. Role of Radical Cations in Aromatic Hydrocarbon Carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* 64:69-84.
- Chen, L., Devanesan, P.D., Higginbotham, S., Ariese, F., Jankowiak, R., Small, G.J., Rogan, E.G., Cavalieri, E.L. 1996. Expanded Analysis of Benzo[a]pyrene-DNA Adducts Formed in Vitro and in Mouse Skin: Their Significance in Tumor Initiation. *Chemical Research in Toxicology* 9 (5):897-903.
- Chilmonczyk, S. 1992. The thymus in fish: Development and possible function in the immune response. *Annual Review of Fish Diseases* 2:181-200.
- Claisse, D., Le Moigne, M., Durand, G., Beliaeff, B. 2006. Ligne de base : Les contaminants chimiques dans les huîtres et les moules du littoral français. *RNO Surveillance du Milieu Marin, Travaux du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin*,:27-51.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J. 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17 (10):1195-1214.
- Cooper, C.S., Grover, P.L., Sims, P. 1983. The metabolism and activation of benzo[a]pyrene. *Progress in Drug Metabolism* 7:295-396.

– D –

- Day, B.W., Sahali, Y., Hutchins, D.A., Wildschutte, M., Pastorelli, R., Nguyen, T.T., Naylor, S., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. 1992. Fluoranthene metabolism: Human and rat liver microsomes display different stereoselective formation of the trans-2,3-dihydrodiol. *Chemical Research in Toxicology* 5 (6):779-786.
- Di Giulio, R.T., Meyer, J.N. 2008. Reactive oxygen species and oxidative stress. In *Toxicology of fishes*, edited by Di Giulio, R.T. and Hinton, D.E. New York: Taylor and Francis Group.

- Diderich, R. 2000. Etude des risques des substances contenues dans le fioul transporté par ERIKA sur les écosystèmes aquatiques. Dossier ERIKA, Rapport 7.: INERIS.
- Dixon, D.R., Pruski, A.M., Dixon, L.R.J., Jha, A.N. 2002. Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis* 17 (6):495-507.
- Douki, T., Ksoury, Z., Marie, C., Favier, A., Ravanat, J.L., Maitre, A. 2008. Genotoxicity of combined exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and UVA - A mechanistic study. *Photochemistry and Photobiology* 84 (5):1133-1140.
- Durieux, E. 2007. Ecologie du système hôte – parasite, juvéniles G0 de sole (*Solea solea*) – métacercaires de Digènes : dynamique et effets de l'infestation., Université de La Rochelle, La Rochelle.

– E –

- ENVILT, 2005, Michel Marchand, Eliminer la pollution chimique des mers, <http://wwz.ifremer.fr/envlit/documents/dossiers>

– F –

- Fent, K., Bättscher, R. 2000. Cytochrome P4501A induction potencies of polycyclic aromatic hydrocarbons in a fish hepatoma cell line: demonstration of additive interactions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (8):2047-2058.
- Fernandes, M.B., Sicre, M.A., Boireau, A., Tronczynski, J. 1997. Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *Marine Pollution Bulletin* 34 (11):857-867.
- Fjellstedt, T.A., Allen, R.H., Duncan, B.K., Jakoby, W.B. 1973. Enzymatic Conjugation of Epoxides with Glutathione. *Journal of Biological Chemistry* 248 (10):3702-3707.
- Forget-Leray, J., Landriau, I., Minier, C., Leboulenger, F. 2005. Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60 (3):288-294.
- Fretland, A.J., Omiecinski, C.J. 2000. Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology. *Chemico-Biological Interactions* 129 (1-2):41-59.

– G –

- Gao, D., Luo, Y., Guevara, D., Wang, Y., Rui, M., Goldwyn, B., Lu, Y., Smith, E.C.A., Lebwohl, M., Wei, H. 2005. Benzo[a]pyrene and its metabolites combined with ultraviolet A synergistically induce 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine via reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine* 39 (9):1177-1183.
- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D. 2003. Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *Actualité chimique* 11-12:91-96.
- Gendusa, A.C. 1990. Toxicity of chromium and fluoranthene from aqueous and sediment sources to selected freshwater fish., University of North Texas.
- George, S.G., Leaver, M.J., Wright, J. 1998. Structural Studies of a UDP-glucuronosyltransferase gene from the plaice (*Pleuronectes platessa*). *Marine Environmental Research* 46 (1-5):33-35.
- George, S.G., Taylor, B. Molecular evidence for multiple UDP-glucuronosyltransferase gene families in fish. *Marine Environmental Research* 54 (3-5):253-257.
- Gerbai-Chaloin, S. 2000. Extrait de la thèse de Mme Sabine Gerbai-Chaloin, Université de Montpellier I, Montpellier.

- Glatt, H. 1997. Sulfation and sulfotransferases 4: bioactivation of mutagens via sulfation. *FASEB J.* 11 (5):314-321.
- Glatt, H. 2000. Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions* 129 (1-2):141-170.
- Gorelick, N., J., Hutchins, D.,A., Tannenbaum, S.,R., Wogan, G.,N. 1989. Formation of DNA and hemoglobin adducts of fluoranthene after single and multiple exposures. *Carcinogenesis* 10 (9):1579-1587.
- Gorelick, N.J., Wogan, G.,N. 1989. Fluoranthene-DNA adducts: identification and quantification by an HPLC-32P-postlabeling method. *Carcinogenesis* 10 (9):1567-1577.
- Grove, A.D., Llewellyn, G.C., Kessler, F.K., White, K.L., Crespi, C.L., Ritter, J.K. 2000. Differential Protection by Rat UDP-Glucuronosyltransferase 1A7 against Benzo[a]pyrene-3,6-quinone- versus Benzo[a]pyrene-Induced Cytotoxic Effects in Human Lymphoblastoid Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 162 (1):34-43.
- Gustafsson, Ö., Gschwend, P.M., Buesseler, K.O. 1997. Using ²³⁴Th disequilibria to estimate the vertical removal rates of polycyclic aromatic hydrocarbons from the surface ocean. *Marine Chemistry* 57 (1-2):11-23.

- H -

- Hahn, M.E. 2002. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chemico-Biological Interactions* 141 (1-2):131-160.
- Hahn, M.E., Merson, R.R., Karchner, S.I., Mommsen, T.P., Moon, T.W. 2005. Chapter 7 Xenobiotic receptors in fish: Structural and functional diversity and evolutionary insights. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*: Elsevier.
- Hammock, B.D., Hasagawa, L.S. 1983. Differential substrate selectivity of murine hepatic cytosolic and microsomal epoxide hydrolases. *Biochemical Pharmacology* 32 (7):1155-1164.
- Hansen, J.D., Zapata, A.G. 1998. Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunol. Rev.* 166:199-220.
- Hansen, W.K., Kelley, M.R. 2000. Review of Mammalian DNA Repair and Translational Implications. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 295 (1):1-9.
- Harvey, R.G. 1991. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, chemistry and carcinogenicity*. New York: Syndicate of the University of Cambridge.
- Hasspieler, B.M., Douglas Haffner, G., Adeli, K. 1996. Influence of DT diaphorase on quinone-mediated genotoxicity in human and fish cell lines. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 360 (1):43-49.
- Helbock, H.J., Beckman, K.B., Shigenaga, M.K., Walter, P.B., Woodall, A.A., Yeo, H.C., Ames, B.N. 1998. DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1):288-293.
- Herbert, I.N., Svendsen, C., Hankard, P.K., Spurgeon, D.J. 2004. Comparison of instantaneous rate of population increase and critical-effect estimates in *Folsomia candida* exposed to four toxicants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57 (2):175-183.
- Hillenweck, A., Canlet, C., Mauffret, A., Debrauwer, L., Claireaux, G., Cravedi, J.P. 2008. Characterization of biliary metabolites of fluoranthene in the common sole (*Solea Solea*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 27 (12):2575-2581.
- Hoeijmakers, J.H.J. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366-374.

- Honey, S., O'Keefe, P., Drahushuk, A.T., Olson, J.R., Kumar, S., Sikka., H.C. 2000. Metabolism of benzo(a)pyrene by duck liver microsomes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 126 (3):285-292.
- Horne, J.D., Oblad, B.R. 1983. Aquatic toxicity studies of six priority pollutants. Final Report/Task II. *US Environmental Protection Agency, contract No. 68-01-6201, NUS Corporation, Houston, TX.*

— I —

- IARC. En préparation. Benzo[a]pyrene [50-32-8]. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. 32 (7).
- IARC. 1983. polycyclic aromatic hydrocarbons. *monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemical to man* 32:211-224.
- INERIS. 2005. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, le Fluoranthène. *DRC-01-25590-01DR123*.
- INERIS. 2005. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, le pyrène. *DRC-02-25590-02DF51*.
- INERIS. 2006. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, le benzo[a]pyrène. *DRC-01-25590-00DF252*

— J —

- Jacob, J., Grimmer, G. 1996. Metabolism and excretion of polycyclic aromatic hydrocarbons in rat and in human. *Central European journal of public health* 4 Suppl:33-39.
- Jacques , C., Jamin, E.L., Perdu, E., Duplan, H., Mavon, A., Zalko, D., Debrauwer, L. In press. Characterization of B(a)P metabolites formed in an ex vivo pig skin model, using three complementary analytical methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.
- James, M.O., Altman, A.H., Morris, K., Kleinow, K.M., Tong, Z. 1997. Dietary Modulation of Phase 1 and Phase 2 Activities with Benzo(a)pyrene and Related Compounds in the Intestine But Not the Liver of the Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. *Drug Metabolism and Disposition* 25 (3):346-354.
- JAMP. 2009. Guidelines for contaminant-specific biological effects. *OSPAR convention for the protection of the marine environment of the North-East Atlantic*:48 pp.
- Jensen, J., Sverdrup, L.E. 2002. Joint Toxicity of Linear Alkylbenzene Sulfonates and Pyrene on *Folsomia fimetaria*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52 (1):75-81.
- Jernstrom, B., Funk, M., Frank, H., Mannervik, B., Seidel, A. 1996. CARCINOGENESIS: Glutathione S-transferase A1-1-catalysed conjugation of bay and fjord region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons with glutathione. *Carcinogenesis* 17 (7):1491-1498.
- Jez, J.M., Penning, T.M. 2001. The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chemico-Biological Interactions* 130-132:499-525.
- Jha, A.N. 2004. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552 (1-2):1-17.
- Jiang, H., Gelhaus, S.L., Mangal, D., Harvey, R.G., Blair, I.A., Penning, T.M. 2007. Metabolism of benzo[a]pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography-mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* 20 (9):1331-1341.

- K -

- Kim, H.S., Kwack, S.J., Lee, B.M. 2000. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and benzo[a]pyrene-quinones in the blood of rats treated with benzo[a]pyrene. *Chemico-Biological Interactions* 127 (2):139-150.
- Knuckles, M.E., Inyang, F., Ramesh, A. 2004. Acute and subchronic oral toxicity of fluoranthene in F-344 rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59 (1):102-108.
- Konishi, T., Kato, K., Araki, T., Shiraki, K., Takagi, M., Tamaru, Y. 2005. A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major*. *Biochemical Journal* 388:299-307.
- Kopecka-Pilarczyk, J., Correia, A.D. 2009. Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to in vivo exposure to a mix of selected PAHs. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (4):1296-1302.
- Krasnov, A., Koskinen, H., Rexroad, C., Afanasyev, S., Mölsä, H., Oikari, A. 2005. Transcriptome responses to carbon tetrachloride and pyrene in the kidney and liver of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 74 (1):70-81.

- L -

- Larsen, E., Kwon, K., Coin, F., Egly, J.-M., Klungland, A. 2004. Transcription activities at 8-oxoG lesions in DNA. *DNA Repair* 3 (11):1457-1468.
- Le Dû-Lacoste, M. 2008. Etude des phénomènes de biotransformation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par les organismes aquatiques (poissons). Relation exposition-génotoxicité. , ISM-LPTC, Université de Bordeaux 1, Bordeaux.
- Le Pape, O., Chauvet, F., Mahévas, S., Lazure, P., Guérault, D., Désaunay, Y. 2003. Quantitative description of habitat suitability for the juvenile common sole (*Solea solea*, L.) in the Bay of Biscay (France) and the contribution of different habitats to the adult population. *Journal of Sea Research* 50 (2-3):139-149.
- Lee, J., Lee, K., Park, G. 2005. Acute toxicity of heavy metals, tributyltin, ammonia and polycyclic aromatic hydrocarbons to benthic amphipod *grandidierella japonica*. *Ocean Science Journal* 40 (2):61-66.
- Lemaire, P., Sturve, J., Förlin, L., Livingstone, D.R. 1996. Studies on aromatic hydrocarbon quinone metabolism and DT-Diaphorase function in liver of fish species. *Marine Environmental Research* 42 (1-4):317-321.
- Levin, W., Buening, M.K., Wood, A.W., Chang, R.L., Kedzierski, B., Thakker, D.R., Boyd, D.R., Gadaginamath, G.S., Armstrong, R.N., Yagi, H., Karle, J.M., Slaga, T.J., Jerina, D.M., Conney, A.H. 1980. An enantiomeric interaction in the metabolism and tumorigenicity of (+)- and (-)-benzo[a]pyrene 7,8-oxide. *Journal of Biological Chemistry* 255 (19):9067-9074.

- M -

- Marie, C. 2007. Recherche de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques à travers l'étude des lésions de l'ADN chez l'homme, Joseph Fournier, Grenoble I, Grenoble.
- Marie, C., Maître A., Douki T., Gateau, M., Tarantini, A., Guiraud, P., Favier, A., Ravanat, J.L. 2008. Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[a]pyrene DNA adducts. *Journal of Applied Toxicology* 28 (5):579-590.
- Marnett, L.J. 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21 (3):361-370.

- Meador, J.P., Buzitis, J., Bravo, C.F. 2008. Using fluorescent Aromatic Compounds in bile from juvenile salmonids to predict exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27 (4):845-853.
- Michel, X.R., Cassand, P.M., Narbonne, J.F. 1993. Activation of benzo[a]pyrene and 2-aminoanthracene to bacteria mutagens by mussel digestive gland postmitochondrial fraction. *Mutation Research Letters* 301 (2):113-119.
- Millau, J.-F. 2006. Test fonctionnel de mesure des activités enzymatiques de réparation de l'ADN par excision resynthèse sur support miniaturisé : mise au point et applications, Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement, Université Joseph Fourier Grenoble 1, Grenoble.
- Minier, C., Levy, F., Rabel, D., Bocquené, G., Godefroy, D., Burgeot, T., Leboulenger, F. 2000. Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Marine Environmental Research* 50 (1-5):373-377.
- Motelay-Massei, A., Ollivon, D., Garban, B., Tiphagne-Larcher, K., Chevreuil, M. 2007. Fluxes of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Seine estuary, France: mass balance and role of atmospheric deposition. *Hydrobiologia* 588 (1):145-157.

– N –

- Neff, J.M., Stout, S.A., Gunster, D.G. 2005. Ecological Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments: Identifying Sources and Ecological Hazard. *Integrated Environmental Assessment and Management* 1 (1):22-33.
- Nesnow, S., Davis, C., Nelson, G.B., Lambert, G., Padgett, W., Pimentel, M., Tennant, A.H., Kligerman, A.D., Ross, J.A. 2002. Comparison of the genotoxic activities of the K-region dihydrodiol of benzo[a]pyrene with benzo[a]pyrene in mammalian cells: morphological cell transformation; DNA damage; and stable covalent DNA adducts. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 521 (1-2):91-102.
- Niki, E. 2009. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine* 47 (5):469-484.
- Nishimoto, M., Varanasi, U. 1985. Benzo[a]pyrene metabolism and DNA adduct formation mediated by english sole liver enzymes. *Biochemical Pharmacology* 34 (2):263-268.

– O –

- Ollivier, H., Pichavant-Rafini, K., Puill-Stephan, E., Calvès, P., Nonnotte, L., Nonnotte, G. 2006. Effects of hyposmotic stress on exocytosis in isolated turbot, *Scophthalmus maximus*, hepatocytes. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 176 (7):643-652.
- Ollivon, D., Garban, B., Blanchard, M., Teil, M.J., Carru, A.M., Chesterikoff, C., Chevreuil, M. 2002. Vertical Distribution and Fate of Trace Metals and Persistent Organic Pollutants in Sediments of the Seine and Marne Rivers (France). *Water, Air, & Soil Pollution* 134 (1):57-79.
- Oostingh, G.J., Schmittner, M., Ehart, A.K., Tischler, U., Duschl, A. 2008. A high-throughput screening method based on stably transformed human cells was used to determine the immunotoxic effects of fluoranthene and other PAHs. *Toxicology in Vitro* 22 (5):1301-1310.

- P -

- Pandey, M.K., Yadav, S., Parmar, D., Das, M. 2006. Induction of hepatic cytochrome P450 isozymes, benzo(a)pyrene metabolism and DNA binding following exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon residues generated during repeated fish fried oil in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 213 (2):126-134.
- Penning, T.M., Burczynski, M.E., Hung, C.-F., McCoull, K.D., Palackal, N.T., Tsuruda, L.S. 1998. Dihydrodiol Dehydrogenases and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Activation: Generation of Reactive and Redox Active o-Quinones. *Chemical Research in Toxicology* 12 (1):1-18.
- Penning, T.M., Ohnishi, S.T., Ohnishi, T., Harvey, R.G. 1996. Generation of Reactive Oxygen Species during the Enzymatic Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon trans-Dihydrodiols Catalyzed by Dihydrodiol Dehydrogenase. *Chemical Research in Toxicology* 9 (1):84-92.
- Perdu, E., Gasc, N., Cravedi, J.P., Tulliez, J. 1993. Comparative biotransformation of benzo(a)pyrene in TCDD induced chondrostei and teleost fish. In *Polycyclic aromatic compounds : synthesis, properties, analytical measurements, occurrence and biological effects: Proceedings of the Thirteenth Int., 3*, edited by Garrigues, P. and Lamotte, M. Yverdon, Switzerland: Gordon and Breach science publishers.
- Perez, D.S., Armstrong-Lea, L., Fox, M.H., Yang, R.S.H., Campain, J.A. 2003. Arsenic and Benzo[a]pyrene Differentially Alter the Capacity for Differentiation and Growth Properties of Primary Human Epidermal Keratinocytes. *Toxicol. Sci.* 76 (2):280-290.
- Purcaro, G., Moret, S., Conte, L.S. 2009. Optimisation of microwave assisted extraction (MAE) for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) determination in smoked meat. *Meat Science* 81 (1):275-280.
- Pushparajah, D.S., Umachandran, M., Plant, K.E., Plant, N., Ioannides, C. 2008,a. Differential response of human and rat epoxide hydrolase to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure: Studies using precision-cut tissue slices. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 640 (1-2):153-161.
- Pushparajah, D.S., Umachandran, M., Nazir, T., Plant, K.E., Plant, N., Lewis, D.F.V., Ioannides, C. 2008,b. Up-regulation of CYP1A/B in rat lung and liver, and human liver precision-cut slices by a series of polycyclic aromatic hydrocarbons; association with the Ah locus and importance of molecular size. *Toxicology in Vitro* 22 (1):128-145.

- R -

- Ravanat, J.L. 2005. Measuring oxidized DNA lesions as biomarkers of oxidative stress: an analytical challenge. *Faseb J. Pharm.Sci* 30:100-113.
- Rastetter, W.H., Nachbar Jr, R.B., Russo-Rodriguez, S., Wattlely, R.V., Thilly, W.G., Andon, B.M., Jorgensen, W.L., Ibrahim, M. 1982. Fluoranthene: Synthesis and mutagenicity of four diol epoxides. *Journal of Organic Chemistry* 47 (25):4873-4878.
- Rether, B., Masfaraud, J.F., Keith, G., Devaux, A., Monod, G. 1997. Biomarqueurs de génotoxicité chez les végétaux et les animaux. In *Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux*, edited by Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C. and Ramade, F. Paris: Masson.
- Rochette, S., Rivot, E., Morin, J., Mackinson, S., Riou, P., Le Pape, O. 2009. Effect of nursery habitat degradation on flatfish population: Application to *Solea solea* in the Eastern Channel (Western Europe). *Journal of Sea Research* In Press, Corrected Proof.

- Rodríguez-Ariza, A., Alhama, J., Díaz-Méndez, F.M., López-Barea, J. 1999. Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of *Sparus aurata* fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 438 (2):97-107.
- Ross, D., Siegel, D. 2004. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1, DT-diaphorase), functions and pharmacogenetics. *Methods in enzymology* 382:115-144.
- Rotchell, J.M., Miller, M.R., Hinton, D.E., Di Giulio, R.T., Ostrander, G.K. 2008. Chemical carcinogenesis in Fishes. In *Toxicology of fishes*, edited by Di Giulio, R.T. and Hinton, D.E. New York: Taylor and Francis Group.
- Russo, M.T., De Luca, G., Degan, P., Bignami, M. 2007. Different DNA repair strategies to combat the threat from 8-oxoguanine. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 614 (1-2):69-76.

- S -

- Sanz-Lázaro, C., Marin, A., Borredat, M. 2008. Toxicity Studies of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs) on European Amphipods. *Toxicology Mechanisms and Methods* 18 (4):323-327.
- Saunders, C.R., Ramesh, A., Shockley, D.C. 2002. Modulation of neurotoxic behavior in F-344 rats by temporal disposition of benzo(a)pyrene. *Toxicology Letters* 129 (1-2):33-45.
- Saunders, C.R., Shockley, D.C., Knuckles, M.E. 2003. Fluoranthene-Induced Neurobehavioral Toxicity in F-344 Rats. *International Journal of Toxicology* 22 (4):263-276.
- Schlenk, D., Celander, M., Gallagher, E.P., George, S.G., James, M.O., Kullman, S.W., Van den Hurk, P., Willett, K.L. 2008. Biotransformation in fishes. In *The toxicology of fishes*, edited by Di Giulio, R.T. and Hinton, D.E. New York: Taylor and Francis Group.
- Shimada, T. 2006. Xenobiotic-Metabolizing Enzymes Involved in Activation and Detoxification of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 21 (4):257-276.
- Shimada, T., Guengerich, F.P. 2006. Inhibition of Human Cytochrome P450 1A1-, 1A2-, and 1B1-Mediated Activation of Procarcinogens to Genotoxic Metabolites by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Chemical Research in Toxicology* 19 (2):288-294.
- Shimada, T., Oda, Y., Gillam, E.M.J., Guengerich, F.P., Inoue, K. 2001. Metabolic Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Other Procarcinogens by Cytochromes P450 1A1 and P450 1B1 Allelic Variants and Other Human Cytochromes P450 in *Salmonella typhimurium* NM2009. *Drug Metabolism and Disposition* 29 (9):1176-1182.
- Sigma-Aldrich. 2008. Fiche de données de sécurité du pyrène.
- Sikka, H.C., Rutkowski, J.P., Kandaswami, C. 1990. Comparative metabolism of benzo[a]pyrene by liver microsomes from brown bullhead and carp. *Aquatic Toxicology* 16 (2):101-111.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175 (1):184-191.
- Skarphéinsdóttir, H., Ericson, G., Svavarsson, J., Næs, K. 2007. DNA adducts and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) tissue levels in blue mussels (*Mytilus* spp.) from Nordic coastal sites. *Marine Environmental Research* 64 (4):479-491.

- Spehar, R.L., Poucher, S., Brooke, L.T., Hansen, D.J., Champlin, D., Cox, D.A. 1999. Comparative toxicity of fluoranthene to freshwater and saltwater species under fluorescent and ultraviolet light. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37 (4):496-502.
- Spink, D.C., Wu, S.J., Spink, B.C., Hussain, M.M., Vakharia, D.D., Pentecost, B.T., Kaminsky, L.S. 2008. Induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo(k)fluoranthene and benzo(a)pyrene in T-47D human breast cancer cells: Roles of PAH interactions and PAH metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology* 226 (3):213-224.
- Sugihara, N., James, M.O. 2003. Binding of 3-hydroxybenzo[a]pyrene to bovine hemoglobin and albumin. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 17 (4):239-247.

– T –

- Tang, D., Rundle, A., Mooney, L., Cho, S., Schnabel, F., Estabrook, A., Kelly, A., Levine, R., Hibshoosh, H., Perera, F. 2003. Sulfotransferase 1A1 (SULT1A1) Polymorphism, PAH-DNA Adduct Levels in Breast Tissue and Breast Cancer Risk in a Case-Control Study. *Breast Cancer Research and Treatment* 78 (2):217-222.
- Tarantini, A., Maitre, A., Lefebvre, E., Marques, M., Marie, C., Ravanat, J.-L., Douki, T. 2009. Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo[a]pyrene as a pure compound and in complex mixtures. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 671 (1-2):67-75.
- Taura, K.-i., Naito, E., Ishii, Y., Mori, M.-a., Oguri, K., Yamada, H. 2004. Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) Inhibitor α -Naphthoflavone Interferes with UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) Activity in Intact but Not in Permeabilized Hepatic Microsomes from 3-Methylcholanthrene-Treated Rats: Possible Involvement of UGT–P450 Interactions. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27 (1):56-60.
- Till, M., Riebinger, D., Schmitz, H.-J., Schrenk, D. 1999. Potency of various polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of CYP1A1 in rat hepatocyte cultures. *Chemico-Biological Interactions* 117 (2):135-150.
- Turner, A., Rawling, M.C. 2002. Sorption of benzo[a]pyrene to sediment contaminated by acid mine drainage: contrasting particle concentration-dependencies in river water and seawater. *Water Research* 36 (8):2011-2019.
- Tusseau-Vuillemin, M.-H., Gourlay, C., Lorgeoux, C., Mouchel, J.-M., Buzier, R., Gilbin, R., Seidel, J.-L., Elbaz-Poulichet, F. 2007. Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin. *Science of The Total Environment* 375 (1-3):244-256.

– U, V –

- Uno, S., Dalton, T.P., Dragin, N., Curran, C.P., Derkenne, S., Miller, M.L., Shertzer, H.G., Gonzalez, F.J., Nebert, D.W. 2006. Oral Benzo[a]pyrene in Cyp1 Knockout Mouse Lines: CYP1A1 Important in Detoxication, CYP1B1 Metabolism Required for Immune Damage Independent of Total-Body Burden and Clearance Rate. *Molecular Pharmacology* 69 (4):1103-1114.
- US-EPA. 1989. Mouse Oral Subchronic Toxicity of Pyrene. *Study conducted by Toxicity Research, Laboratories, Muskegon, MI for the Office of Solid Waste U.S. Environmental Protection Agency. Washington DC. 042-012.*
- Van den Hurk, P., James, M.O. 2000. Sulfation and glucuronidation of benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol in intestinal mucosa of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Marine Environmental Research* 50 (1-5):11-15.

- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13 (2):57-149.
- Van Schanke, A., Holtz, F., Van der Meer, J., Boon, J.P., Ariese, F., Stroomberg, G., Van den Berg, M., Everaarts, J.M. 2001. Dose- and time-dependent formation of biliary benzo[a]pyrene metabolites in the marine flatfish Dab (*Limanda limanda*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (8):1641-1647.
- Varanasi, U., Stein, J.E., Hom, T. . 1981. Covalent binding of benzo[a]pyrene to DNA in fish liver. *Biochemical and biophysical research communications* 103 (2):780-787.
- Visciano, P., Perugini, M., Conte, F., Amorena, M. 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processed by traditional flue gas smoking and by liquid smoke flavourings. *Food and Chemical Toxicology* 46 (5):1409-1413.

– W –

- Walker, S.A., Addai, A.B., Mathis, M., Ramesh, A. 2007. Effect of dietary fat on metabolism and DNA adduct formation after acute oral exposure of F-344 rats to fluoranthene. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 18 (4):236-249.
- Walker, S.A., Whitten, L.B., Seals, G.B., Lee, W.E., Archibong, A.E., Ramesh, A. 2006. Inter-species comparison of liver and small intestinal microsomal metabolism of fluoranthene. *Food and Chemical Toxicology* 44 (3):380-387.
- Wall, K.L., Gao, W., Koppele, J.M.t., Kwei, G.Y., Kauffman, F.C., Thurman, R.G. 1991. The liver plays a central role in the mechanism of chemical carcinogenesis due to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 12 (5):783-786.
- Wang, J.-S., Busby, W.F., Wogan, G.N. 1995. Tissue distribution of DNA adducts in pre-weanling BLU:Ha mice treated with a tumorigenic dose of fluoranthene. *Cancer Letters* 92 (1):9-19.
- Wang, X.H., Hong, H.S., Mu, J.L., Lin, J.Q., Wang, S.H. 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolites in marine fishes as a specific biomarker to indicate PAH pollution in the marine coastal environment. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 43 (3):219-226.
- Weinstein, J.E., Polk, K.D. 2001. Phototoxicity of enthracene and pyrene to glochidia of the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (9):2021-2028.
- Wells, P.G., Kim, P.M., Laposa, R.R., Nicol, C.J., Parmana, T., Winn, L.M. 1997. Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 396 (1-2):65-78.
- Willett, K.L., Randerath, K., Zhou, G.-D., Safe, S.H. 1998. Inhibition of CYP1A1-Dependent Activity by the Polynuclear Aromatic Hydrocarbon (PAH) Fluoranthene. *Biochemical Pharmacology* 55 (6):831-839.
- Willett, K.L., Wassenberg, D., Lienesch, L., Reichert, W., Di Giulio, R.T. 2001. In Vivo and in Vitro Inhibition of CYP1A-Dependent Activity in *Fundulus heteroclitus* by the Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Fluoranthene. *Toxicology and Applied Pharmacology* 177 (3):264-271.
- Wyrobeck, A.J., Gordon, L.A., J.G., B., M.W., F., Jr, K.R.W., G., L., H.V., M., J.C., T., M.D., W. 1983. An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals. *Mutation Research* 115 (1):1-72.

- X, Y -

- Xue, W., Warshawsky, D. 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206 (1):73-93.
- Yang, S.K. 1988. Stereoselectivity of cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase in the metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochemical Pharmacology* 37 (1):61-70.
- Yunker, M.B., Macdonald, R.W., Vingarzan, R., Mitchell, R.H., Goyette, D., Sylvestre, S.. 2002. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry* 33 (4):489-515.

Table des illustrations

Figures

Figure 1 – Bilan des apports en HAP dans l'estuaire de la Seine en 2002-2003.	11
Figure 2 – Conformation des régions « baie » et « fjord ».....	21
Figure 3 – Activation métabolique du BaP par les voies des diol-époxydes et des o-quinones, menant principalement à la formation respective du 7,8-BaP-diol-époxyde, et de la 7,8-dione-BaP.....	23
Figure 4 – Activation métabolique du BaP en quinones.....	24
Figure 5 – Schéma d'activation métabolique du BaP chez les vertébrés supérieurs proposé à partir d'une synthèse de la littérature.	25
Figure 6 – Configuration d'un brin d'ADN.	29
Figure 7 – Dommages à l'ADN engendrés par différents agents génotoxiques, conséquences biologiques et mécanismes de réparation chez l'homme.....	29
Figure 8 – Principaux adduits du BaP.....	31
Figure 9 – Adduit majoritaire du Fluo chez les vertébrés supérieurs.....	32
Figure 10 – Réactions entre les principales espèces réactives de l'oxygène	34
Figure 11 – Réactions d'Haber Weiss et de Fenton.....	34
Figure 12 – Oxydation de la guanine par le radical hydroxyle	35
Figure 13 – Principales réactions d'oxydation de la thymine par le radical hydroxyle	37
Figure 14 – Réactions catalysées par les enzymes anti-oxydantes.	38
Figure 15 – Mécanisme de réparation par excision de bases (BER).....	40
Figure 16 – Système de réparation par excision de nucléotides (NER).....	42
Figure 17 – Sole commune <i>Solea solea</i>	45
Figure 18 – Densité de sole G0 (nées dans l'année) dans le golfe de Gascogne	45
Figure 19 – Densité de soles G0 (nées dans l'année) le long de la Manche.	46
Figure 20 – Système de Radio-HPLC de l'UMR xénobiotiques de l'INRA	54
Figure 21 – Chemical structures of investigated PAH metabolites	58
Figure 22 – UPLC TM -MS/MS chromatogram of the PAH metabolites mixtures.	64
Figure 23 – Radio-chromatogramme obtenu après expositions de microsomes de foie de sole à 10 µM de BaP pendant 2 h.	71
Figure 24 – Représentation graphique de la production des métabolites du BaP selon Michaelis-Menten	72
Figure 25 – Radio-chromatogramme obtenu après exposition de microsomes de foie de sole à 10 µM Fluo pendant 2 h.	73
Figure 26 – Représentation de Michaelis-Menten de la production des métabolites majoritaires du Fluo.	74
Figure 27 – France and French Atlantic coast maps. A: the Seine bay; B: the Pertuis Charentais.....	81

Figure 28 – Metabolite production by sole (A) and dab (B) microsomes exposed to BaP for 1 hr.	84
Figure 29 – Time-course production of BaP metabolites produced by sole (A) and dab (B) microsomes	85
Figure 30 – Overview of the phase I biotransformation pathways of BaP in higher vertebrates and of enzymes involved in these reactions.	86
Figure 31 – Metabolite production by sole (A) and dab (B) microsomes exposed to Fluo for 1 hr.	87
Figure 32 – Time-course production of Fluo metabolites produced by sole (A) and dab (B) microsomes	88
Figure 33 – Synoptique des incubations microsomales réalisées pour l'étude de l'influence des méthodes d'arrêt de la réaction sur les niveaux de métabolites mesurés.....	98
Figure 34 – Résultats obtenus suivant les différents protocoles d'exposition des microsomes et de quantification des métabolites	100
Figure 35 – Cellules dont l'ADN nucléaire est peu endommagé (A) ou fortement endommagé (B).	107
Figure 36 – Système HPLC couplé à un détecteur UV et un détecteur électrochimique.	108
Figure 37 – Electrovoltammogramme de la 8-oxodGuo.....	109
Figure 38 – Chromatogramme UV d'un standard contenant 4 nmoles de dGuo.....	110
Figure 39 – Gamme de dGuo illustrant la linéarité de la mesure de la dGuo.	111
Figure 40 – Chromatogramme électrochimique obtenu après injection d'un standard contenant 0.5 pmoles de 8-oxodGuo	111
Figure 41 – Gamme de 8-oxodGuo illustrant la linéarité de la mesure de la 8-oxodGuo.	111
Figure 42 – Nombre de résidus de 8-oxodGuo par million de résidus dGuo mesurés en fonction de la quantité d'ADN digéré et injecté	112
Figure 43 – Chromatogramme obtenu en UV après injection d'ADN de sole.	113
Figure 44 – Chromatogramme obtenu par détection électrochimique après injection d'ADN de sole.....	113
Figure 45 – Niveau de la base oxydée 8-oxodGuo mesuré sur des hépatocytes de sole après exposition au BaP pendant 24 h.	116
Figure 46 – Normalized EROD activity: square root of the EROD activity in pmol of resorufin formed per min and per 10^6 cells.....	124
Figure 47 – Normalized comet parameter: square root of the percentage of DNA in the tail of the comet. A: Exposure in flasks; B: Exposure in wells	125
Figure 48 – Autoradiograms of ^{32}P -postlabeled DNA from BaP-exposed microsomes.....	126
Figure 49 – EROD activity of sole hepatocytes exposed in flasks to Fluo during 24 hrs.....	138
Figure 50 – DNA strand break level following 24 hrs of exposure to Fluo in flasks (A) or wells (B).....	139
Figure 51 – Autoradiograms of ^{32}P -postlabeled DNA from Fluo-exposed microsomes	140
Figure 52 – Autoradiograms of ^{32}P -postlabeled DNA from Fluo-exposed hepatocytes.....	140
Figure 53 – A: EROD activity of hepatocytes exposed to BaP and its metabolites, expressed as a percentage relative to the control. B: EROD activity of hepatocytes exposed to BaP; C: EROD activity of hepatocytes exposed to the 6,12-dione-BaP.....	156

Figure 54 – DNA strand break levels expressed as square root of the Olive Tail Moment (OTM) of BaP (A), BPDE (B), 7,8-dihydrodiol-BaP (C), 7,8-dione-BaP (D), 6,12-dione-BaP (E), and 3-OH-BaP (F).....	157
Figure 55 – Mean of DNA strand break levels measured following exposure to BaP and its metabolites	158
Figure 56 – EROD activity in hepatocytes exposed to Fluo and its metabolites, expressed as a percentage relative to the control group.....	158
Figure 57 – Levels of DNA strand breaks measured following 24 hrs of exposure to Fluo (A), 3-OH-Fluo (B), 2,3-dihydrodiol-Fluo (C), and 2,3-dione-Fluo (D)	159
Figure 58 – Mean levels of DNA strand breaks measured following exposure of Fluo and each tested metabolite.	159
Figure 59 – Chromatogrammes obtenus en HPLC-MS/MS sur de l'ADN standard en présence de microsomes hépatiques de sole permettant de détecter l'adduit BPDE-N2dGuo, sans exposition (A) ou après exposition au BaP (B)	171
Figure 60 – Système d'exposition <i>in vivo</i> de soles utilisé au cours de la phase A.	174
Figure 61 – Système d'exposition de soles utilisé au cours de la phase B	175
Figure 62 – Quantités de métabolites mesurées au cours de l'expérimentation chez les poissons exposés aux HAP et chez les poissons témoins ($\sqrt{(\text{ng/g bile})}$).....	176
Figure 63 – Niveau de cassures de brins de l'ADN chez les soles du groupe témoin solvant	177
Figure 64 – Niveau de cassures de brins de l'ADN chez les soles exposées aux HAP.	177
Figure 65 – Niveau de 8-oxodGuo dans le groupe de poissons témoins.	178
Figure 66 – Niveau de 8-oxodGuo dans le groupe de poissons exposés aux HAP.....	178

Tableaux

Tableau 1 – Paramètres physico-chimiques du BaP	12
Tableau 2 – Résumé des DL50 et CL50 mesurées après expositions aiguës.....	13
Tableau 3 – Résumé des CSEO/DSENO mesurées après expositions chroniques	13
Tableau 4 – Paramètres physico-chimiques du fluoranthène.....	14
Tableau 5 – Résumé des DL50/CL50 calculées à la suite d'expositions aiguës.....	14
Tableau 6 – Résumé des CSEO/DSENO calculées suite à des expositions chroniques	15
Tableau 7 – Paramètres physico-chimiques du Pyrène.....	15
Tableau 8 – DL50/CL50 relevées pour le pyrène	16
Tableau 9 – CSEO/DSENO relevées pour le pyrène	16
Tableau 10 – Concentrations en HAP dans l'eau (ng.L ⁻¹).	17
Tableau 11 – Concentrations en HAP dans les sédiments (ng.g ⁻¹ ps).....	18
Table 12 – MRM parameters for selected PAH metabolites	63
Table 13 – Linearity and limits of detection of the UPLC-MS/MS method. IDL: instrumental limit of detection (10 µl injected). MDL: methodological limit of detection.	65
Table 14 – Intra- and inter-precision data of PAH metabolites at three different concentrations	66
Table 15 – Accuracy data of PAH metabolites at three different concentrations (mean ± SD)	66
Table 16 – BaP and Fluo metabolites detected in sole liver microsome samples after exposure to parent compounds	67
Tableau 17 – Paramètres cinétiques des métabolites du BaP chez la sole.....	72
Tableau 18 – Paramètres cinétiques des métabolites du Fluo chez la sole	74
Table 19 – Kinetic parameters for sole and dab microsomes exposed to BaP and Fluo for 1 hr to a range of concentrations from 10 to 150 µM.....	90
Tableau 20 – Différences des protocoles utilisés	96
Tableau 21 – Comparaison des résultats obtenus sur différents lots de microsomes pour le Fluo.	97
Tableau 22 – Comparaison des résultats obtenus sur différents lots de microsomes pour le BaP	97
Tableau 23 – Résultats obtenus concernant le dosage des phénols suivant les méthodes sur des mêmes lots de microsomes.....	99
Table 24 – Mean of Relative Adduct Level (RAL) following Fluo exposure	141

Liste des Abréviations

8-oxodGuo	8-oxo-7,8-dihydroguanine
AhR	Récepteur Aryl Hydrocarbure
AKR	Aldo-Kéto Réductase
APE	AP Endonucléase
ARNT	Protéine de Translocation Nucléaire du AhR
BaP	Benzo[a]pyrène
BER	Réparation par Excision de Base
BPDE	BaP Diol-époxyde
CAT	Catalase
CEMP	Programme Coordonné de Surveillance Continue de l'Environnement
CIEM=ICES	Conseil International pour l'Exploration de la Mer
CL	Concentration Létale
CSE	Concentration Sans Effet observé
CYP450	Cytochrome P450
DCE	Directive Cadre Européenne sur l'Eau
DCSMM	Directive Cadre de Stratégie pour le Milieu Marin
DD	Dohydrodiol Deshydrogénase
DEB	Bilan Energie Dynamique
DFLA=FADE	Fluoranthène diol-époxyde
DL	Dose Létale
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
Dpm	Désintégrations par minute
DSENO	Dose Sans Effet Néfaste Observé
EH	Epoxyde Hydrolase
ERO	Espèce Réactive de l'Oxygène
EROD	7-éthoxyrésorufine-o-dééthylase
ESCOOD	European Standards Committee On Oxidative DNA Damage
FapyGuo	2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine
Fluo	Fluoranthène
Fpg	Formamido pyrimidine glycosylase
G6P	Glucose 6 Phosphate
G6PDH	G6P déshydrogénase
GPX	Glutathion Peroxydase
GST	Glutathion-S-Transférase
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Pression
IARC	Agence Internationale de Recherche sur le Cancer
MEDPOL	Méditerranée Pollution
MMR	Réparation des Mésappariements
MS	Spectrométrie de Masse
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NER	Réparation par Excision de Nucléotide
NQO1	NADPH Quinone Oxydoréductase 1
OGG1	8-oxodGuo Glycosylase 1
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymérase

PBDE	Polybromodiphénylethers
PCB	Polychlorobiphényles
PNK	Polynucleotide Kinase
POP	Polluants Organiques Persistants
Pyr	Pyrène
RCT	Réparation Couplée à la Transcription
REACH	Registration Evaluation Autorisation of Chemicals
RGG	Réparation Globale du Génome
RPA	Protéine de Réplication A
Site AP	Site Apurinique
SOD	Superoxyde Dismutase
Sole BEMol	Sole Bioaccumulation Ecotoxicologie Modélisation
ST	Sulfotransférase
SVF	Sérum de Veau Fétal
UGT	UDP-Glucuronyl-Transférase
UPLC	Chromatographie Liquide Ultra Pression
US EPA	Agence de Protection de l'Environnement des Etats-Unis

Annexes

Liste des annexes

Annexe 1 – Liste des substances dangereuses prioritaires définies par la directive cadre européenne sur l'eau	219
Annexe 2 – Liste des 16 HAP définis comme polluants prioritaires dangereux par l'US EPA.....	221
Annexe 3 – Classifications du risque cancérigène d'une substance donnée pour l'homme	223
Annexe 4 – Extraction et quantification des protéines microsomales	225
Annexe 5– Méthode de calcul des paramètres cinétiques Vm et Km	227
Annexe 6 – Protocole du test des comètes	229
Annexe 7– Protocole d'extraction d'ADN par la méthode chaotrope	231
Annexe 8– Protocole d'isolement et de mise en culture d'hépatocytes primaires de sole	233
Annexe 9 – Article 7 : Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17α-ethinylestradiol and endosulfan on <i>Crassostrea gigas</i> embryos.....	235

Annexe 1 – Liste des substances dangereuses prioritaires définies par la directive cadre européenne sur l'eau

L 331/4

FR

Journal officiel des Communautés européennes

15.12.2001

ANNEXE

«ANNEXE X

LISTE DES SUBSTANCES PRIORITAIRES DANS LE DOMAINE DE L'EAU (*)

	Numéro CAS (1)	Numéro UE (2)	Nom de la substance prioritaire	Identifiée en tant que substance dangereuse prioritaire
(1)	15972-60-8	240-110-8	Alachlore	
(2)	120-12-7	204-371-1	Anthracène	(X) (***)
(3)	1912-24-9	217-617-8	Atrazine	(X) (***)
(4)	71-43-2	200-753-7	Benzène	
(5)	sans objet	sans objet	Diphényléthers bromés (**)	X (****)
(6)	7440-43-9	231-152-8	Cadmium et ses composés	X
(7)	85535-84-8	287-476-5	C ₁₀₋₁₃ -chloroalcane (**)	X
(8)	470-90-6	207-432-0	Chlorfenvinphos	
(9)	2921-88-2	220-864-4	Chlorpyrifos	(X) (***)
(10)	107-06-2	203-458-1	1,2-Dichloroéthane	
(11)	75-09-2	200-838-9	Dichlorométhane	
(12)	117-81-7	204-211-0	Di(2-éthylhexyl)phthalate (DEHP)	(X) (***)
(13)	330-54-1	206-354-4	Diuron	(X) (***)
(14)	115-29-7	204-079-4	Endosulfan	(X) (***)
	959-98-8	sans objet	(alpha-endosulfan)	
(15)	206-44-0	205-912-4	Fluoranthène (****)	
(16)	118-74-1	204-273-9	Hexachlorobenzène	X
(17)	87-68-3	201-765-5	Hexachlorobutadiène	X
(18)	608-73-1	210-158-9	Hexachlorocyclohexane	X
	58-89-9	200-401-2	(gamma-isomère, Lindane)	
(19)	34123-59-6	251-835-4	Isoproturon	(X) (***)
(20)	7439-92-1	231-100-4	Plomb et ses composés	(X) (***)
(21)	7439-97-6	231-106-7	Mercure et ses composés	X
(22)	91-20-3	202-049-5	Naphtalène	(X) (***)
(23)	7440-02-0	231-111-4	Nickel et ses composés	

	Numéro CAS ⁽¹⁾	Numéro UE ⁽²⁾	Nom de la substance prioritaire	Identifiée en tant que substance dangereuse prioritaire
(24)	251 54-52-3	246-67 2-0	Nonylphénols	X
	104-40-5	203-199-4	(4-(para)-nonylphénol)	
(25)	1806-26-4	217-302-5	Octylphénols	(X) (***)
	140-66-9	sans objet	(para-tert-octylphénol)	
(26)	608-93-5	210-172-5	Pentachlorobenzène	X
(27)	87-86-5	201-778-6	Pentachlorophénol	(X) (***)
(28)	sans objet	sans objet	Hydrocarbures aromatiques polycycliques	X
	50-32-8	200-028-5	(Benzo(a)pyrène),	
	205-99-2	205-911-9	(Benzo(b)fluoranthène),	
	191-24-2	205-883-8	(Benzo(g,h,i)perylène),	
	207-08-9	205-916-6	(Benzo(k)fluoranthène),	
	193-39-5	205-893-2	(Indeno(1,2,3-cd)pyrène)	
(29)	122-34-9	204-535-2	Simazine	(X) (***)
(30)	688-73-3	211-704-4	Composés du tributylétain	X
	36643-28-4	sans objet	(Tributylétin-cation)	
(31)	12002-48-1	234-413-4	Trichlorobenzène	(X) (***)
	120-82-1	204-428-0	(1,2,4-Trichlorobenzène)	
(32)	67-66-3	200-663-8	Trichlorométhane (Chloroforme)	
(33)	1582-09-8	216-428-8	Trifluraline	(X) (***)

(*) Lorsqu'un groupe de substances est retenu, un représentant typique de ce groupe est mentionné à titre de paramètre indicatif (entre parenthèses et sans numéro). Les contrôles sont ciblés sur ces substances types, sans exclure la possibilité de rajouter d'autres représentants, si nécessaire.

(**) Ces groupes de substances englobent généralement un très grand nombre de composés. Pour le moment, il n'est pas possible de fournir des paramètres indicatifs appropriés.

(***) Cette substance prioritaire est soumise à révision pour sa possible identification comme "substance dangereuse prioritaire". La Commission adresse au Parlement européen et au Conseil une proposition en vue de la classification définitive de cette substance, au plus tard 12 mois après l'adoption de la présente liste. Cette révision n'affecte pas le calendrier prévu à l'article 16 de la directive 2000/60/CE pour les propositions de la Commission relatives aux contrôles.

(****) Uniquement pentabromodiphényléther (numéro CAS 32534-81-9).

(*****) Le fluoranthène figure dans la liste en tant qu'indicateur d'autres hydrocarbures aromatiques polycycliques plus dangereux.

(1) CAS: Chemical Abstract Services.

(2) Numéro UE: Inventaire européen des produits chimiques commercialisés (EINECS) ou Liste européenne des substances chimiques notifiées (ELINCS).»

**Annexe 2 – Liste des 16 HAP définis comme polluants prioritaires
dangereux par l'US EPA**

Substance	Masse molaire	Nombre de cycles
Naphtalène	128	2
Acénaphtylène	152	3
Acénaphène	154	3
Fluorène	166	3
Phénanthrène	178	3
Anthracène	178	3
Fluoranthène	202	4
Pyrène	202	4
Benzo[a]anthracène	228	4
Chrysène	228	4
Benzo[b]fluoranthène	252	5
Benzo[k]fluoranthène	252	5
Benzo[a]pyrène	252	5
Indeno[1,2,3-dc]pyrène	276	6
Dibenzo[a,h]anthracène	278	5
Benzo[g,h,i]pérylène	276	6

Annexe 3 – Classifications du risque cancérigène d'une substance donnée pour l'homme

Classification de l'Union européenne

Catégorie 1 – substances que l'on sait être cancérigènes pour l'homme. On dispose de suffisamment d'éléments pour établir l'existence d'une relation de cause à effet entre l'exposition de l'homme à de telles substances et l'apparition d'un cancer.

Catégorie 2 – substances devant être assimilées à des substances cancérigènes pour l'homme. On dispose de suffisamment d'éléments pour justifier une forte présomption que l'exposition de l'homme à de telles substances peut provoquer un cancer.

Catégorie 3 – substances préoccupantes pour l'homme en raison d'effets cancérigènes possibles mais pour lesquelles les informations disponibles ne permettent pas une évaluation satisfaisante (preuves insuffisantes). Il existe des informations issues d'études adéquates sur les animaux mais elles sont insuffisantes pour classer la substance dans la catégorie 2.

Classification du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC/IARC)

Groupe 1 – l'agent (ou le mélange) est cancérigène pour l'homme

Groupe 2A – l'agent (ou le mélange) est probablement cancérigène pour l'homme

Groupe 2B – l'agent (ou le mélange) est un cancérigène possible pour l'homme

Groupe 3 – l'agent (ou le mélange) ne peut être classé du point de vue de sa cancérigénicité pour l'homme

Groupe 4 – l'agent (ou le mélange) est probablement non cancérigène pour l'homme. Ce groupe ne contient qu'une seule substance.

Classification par l'agence de protection de l'environnement des Etats Unis (US EPA)

Groupe A – substance cancérigène pour l'homme. Les substances de ce groupe ont été démontrées comme induisant des cancers chez l'homme.

Groupe B – substance probablement cancérigène pour l'homme. On distingue alors les groupes B1 et B2. Le groupe B1 contient les substances pour lesquelles les études épidémiologiques démontrant une relation de cause à effet sont limitées. Les substances du groupe B2 sont celles pour lesquelles un effet cancérigène a été démontré chez les animaux mais pour lesquelles les études épidémiologiques ne sont pas disponibles ou sont jugées inadéquates.

Groupe C – substance cancérigène possible. Ce groupe concerne les substances pour lesquelles les études concernant les effets cancérigènes sur les animaux sont limitées et pour lesquelles il n'existe pas de donnée pour l'homme.

Groupe D – substance ne pouvant être classifiée quant à sa cancérigénicité pour l'homme.

Groupe E – substance démontrée comme n'étant pas cancérigène pour l'homme.

Annexe 4 – Extraction et quantification des protéines microsomales

Extraction des microsomes

Décongeler et peser les échantillons

Broyer les échantillons au potter (800 à 1000 tr/min, 30 secondes) dans du tampon phosphate (K_2HPO_4/KH_2PO_4 100 mM, pH 7.4, 4°C) : V (mL) = 5 x masse de tissu (mg)

Transférer les homogénats dans des tubes à centrifugation

Centrifuger à 9 000 x g pendant 15 min à 4°C

Récupérer le surnageant (cytosol et microsomes) à l'aide d'une pipette. Le placer dans des tubes pour ultracentrifugation

Compléter le tube par du tampon phosphate et sceller l'ouverture du tube à l'aide d'un fer à souder

Centrifuger à 105 000 x g (34 000 rpm) pendant 60 min à 4°C

Ouvrir le tube à l'aide d'un scalpel, et retirer le surnageant à la pipette

Prendre le culot (microsomes) dans 300 μ L de tampon phosphate 100 mM, EDTA 1 mM, 20% de glycérol

Placer un aliquote de 15 μ L à -20°C pour le dosage des protéines.

Stocker les microsomes dans l'azote liquide jusqu'à utilisation.

Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Décongeler les échantillons de microsomes

Préparer la gamme étalon de BSA :

puit n°	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Protéines/puit (μ g)	0	1	2	3	4	5	6	8	10
H ₂ O (μ L)	100	90	80	70	60	50	40	20	0
BSA 0,1g/L (μ L)	0	10	20	30	40	50	60	80	100

Diluer les échantillons au 1/5 : 2 μ L de l'extrait + 8 μ L d'H₂O

Réaliser quatre puits par échantillon. Par puit : 2 μ L de l'échantillon dilué + 98 μ L d'H₂O.

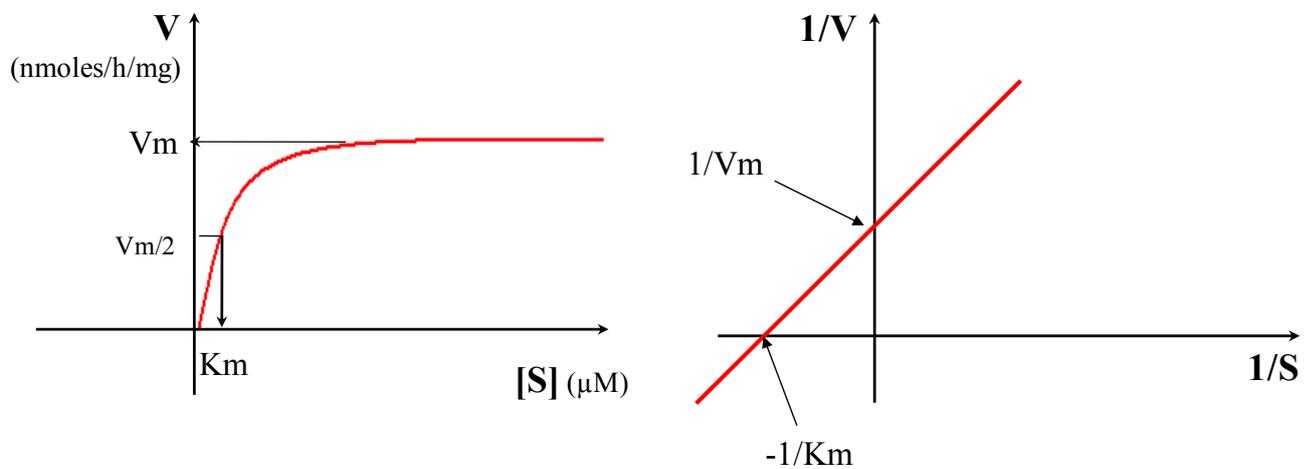
Préparer le réactif de Bradford (1/5) : 4 mL + 16 mL d'H₂O

Ajouter 280 μ L de réactif par puit à la pipette multicanaux.

Incuber 3 min.

Lire la plaque au Tecan à 595 nm.

Annexe 5 – Méthode de calcul des paramètres cinétiques V_m et K_m



Représentation de Michaelis-Menten

Représentation de Lineweaver-Burk

S représente la concentration en substrat (HAP) en μM

V représente la vitesse de formation du métabolite concerné en nmol/h/mg de protéines

A partir de la représentation de Lineweaver-Burk, on peut effectuer le calcul suivant :

Soit $y = ax + b$, l'équation de la droite du graphique de Lineweaver-Burk, alors

$1/V_m = b$, donc $V_m = 1/b$ nmol/h/mg de protéines

$-1/K_m = -b/a$, donc $K_m = a/b$ μM

Annexe 6 – Protocole du test des comètes

Préparation du matériel

Bain marie à 37°C

Agarose Normal Melting Point (NMP) 0.5%

A préparer dans du PBS 1X (Mg²⁺ et Ca²⁺ free)

Environ 1mL par lame

Porter la solution à ébullition au micro-ondes et vortexer. Répéter l'opération jusqu'à dissolution complète de l'agarose.

Conserver l'agarose dans un tube corning de 50mL au bain marie à 37°C.

Agarose Low Melting Point (LMP) 0.5%

A préparer dans du PBS 1X (Mg²⁺ et Ca²⁺ free)

Chauffer la solution sans porter à ébullition

Aliquoter à raison de 225µL dans des tubes eppendorfs stériles de 1.5mL

Maintenir au bain marie à 37°C

PBS (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 1.8mM, pH 7.4)

BET (20µg/mL)

NaCl 5M

EDTA,Na₂ 0.5M pH 8

Tris base 1M pH 7.5

NaOH 10M

Tampon de lyse (NaCl 2.5M, EDTANA₂ 0.1M, Tris base 0.01M, N-sarcosinate 1%, DMSO 10%, Triton X100 1%, pH 10)

Pour 200mL : NaCl : 100 mL de solution mère 5M

EDTANA₂ : 40mL de solution mère 0.5M pH8

Tris base : 2mL de solution mère 1M pH 7.5

N-sarcosinate : 2g

H₂O qsp 178 mL

Ajuster à pH 10.

Autoclaver

A préparer extemporanément : + 20mL DMSO

+ 2mL Triton X100

Conserver à 4°C.

Tampon de déroulement et d'électrophorèse (NaOH 0.3M, EDTA 1mM, pH 13)

Pour 2L : NaOH : 60mL de solution mère 10M

EDTANa₂ : 4mL de solution mère 0.5M pH 8

H₂O qsp 2L

Ajuster à pH 13

Tampon de neutralisation (Tris base 0.4M, pH 7.5)**Préparation des lames**

- Première couche d'agarose NMP 0.5%. Plonger les lames directement dans l'agarose. Séchage à température ambiante
- Deuxième couche d'agarose LMP 0.5%. Mettre 30µL de suspension cellulaire dans l'aliquote de LMP (225µL). Pipeter 85µL de ce mélange par lame. Laisser solidifier sur lit de glace (≈1min).
- Troisième couche d'agarose LMP (100µL). Laisser solidifier sur lit de glace (≈1min).

Lyse cellulaire

Recouvrir les lames de tampon de lyse glacé. Incuber 1h à 15-20°C et à l'obscurité.

Dénaturation : déroulement de l'ADN

Mettre les lames dans la cuve à électrophorèse. Recouvrir les lames de tampon d'électrophorèse pendant 15min à température ambiante et à l'obscurité.

Electrophorèse

Electrophorèse pendant 20min à 23V (E=0.66V/cm)

Lavage et neutralisation

Retirer les lames du bac à électrophorèse

Incuber les lames 3 x 5min dans le tampon de neutralisation.

Si les lames ne sont pas lues de suite, les déshydrater par incubation 10 min dans de l'éthanol absolu, puis les laisser sécher à l'obscurité et à température ambiante.

Coloration

Ajouter 75µL de BET par lame. Recouvrir d'une lamelle. Stocker les lames au moins 30 min à 4°C dans une boîte humide

Lecture des lames

Microscope à fluorescence, lumière verte.

BET : excitation à 510-560 nm, max à 546nm. Barrière filtre : 580nm.

Objectif x 40.

Annexe 7 – Protocole d'extraction d'ADN par la méthode chaotrope

Préparation du matériel

Tampon A (pH 7.5) : 320 mM de sucrose

5 mM MgCl₂

10 mM Tris-HCl

0.1 mM deferoxamine mesylate

1% Triton X-100

Tampon B (pH 8) : 5 mM EDTA-Na₂

10 mM Tris-HCl

0.15 mM deferoxamine mesylate

Solution d'iodure de sodium (pH 8) : 20 mM EDTA-Na₂

7.6 M NaI

40 mM Tris-HCl

0.3 mM deferoxamine mesylate

SDS 10%

RNase A (solution à 1mg.mL⁻¹) et RNase T1

Protease

Isopropanol

Isopropanol 40%

Ethanol 70% glacé.

Nucléase P1 (1U/μL dans 300 mM sodium acetate, 1 mM ZnSO₄, pH 5.5)

Phosphatase alcaline (10U/μL)

Tampon de déphosphorylation

Bloc chauffant à 50°C.

Extraction

Homogénéiser le tissu (100-150mg) par broyage au Potter dans 2 mL de tampon A

Centrifuger l'échantillon à 1500 x g pendant 10 min à 4°C.

Jeter le surnageant, et laver le culot avec 2 mL de tampon A.

Centrifuger à 1 500 x g pendant 10 min à 4°C.

Remettre le culot en suspension dans 600 μL de tampon B.

Ajouter 35 μL de SDS 10%.

Digestion de l'ARN par ajout de 120μg (120μL) de RNase A et 20 U de RNase T1.

Incuber pendant 15 min à 50°C.

Digestion des protéines par ajout de 600 μg de protéase. (30 μL)

Incuber 1h à 37°C.

Centrifuger à 5 000 x g pendant 15 min à 4°C.

Récupérer le surnageant dans un tube stérile de 15mL.
Ajouter 1.2 mL de solution d'iodure de sodium et 2 mL d'isopropanol.
Centrifuger à 5 000 x g pendant 15 min.
Remettre le culot en suspension dans 2 mL d'isopropanol 40%.
Centrifuger à nouveau
Rincer le culot par ajout de 2 mL d'éthanol 70% glacé.
Centrifuger à 5000 x g pendant 5 min à 4°C.
Oter l'éthanol à l'aide d'une pipette.
Laisser sécher l'ADN dans le tube à l'envers sur un papier absorbant pendant 1h.
Remettre en suspension dans 100µL (ou moins) de deferoxamine mesylate 0.1 mM
Laisser une nuit à 37°C pour redissoudre l'ADN
Doser les extraits au Nanodrop :
Le dosage est réalisé par spectrophotométrie à 280, 260 et 230 nm. Une solution d'ADN pur présente un rapport 260/280 compris entre 1.8 et 2 et un rapport 260/230 autour de 2. Une concentration de 50 µg d'ADN/ml d'eau est obtenue pour une absorbance théorique de 1 unité de densité optique à 260 nm.
Conserver les échantillons dans l'azote liquide en attendant la digestion.

Digestion enzymatique

Ajouter 3 U de nucléase P1.
Incuber les échantillons 2h à 37°C. Revortexer au bout d'1h.
Ajouter 4U de phosphatase alcaline et 1/10 du volume de tampon de déphosphorylation (5.3µL).
Incuber 1h à 37°C.
Centrifuger à 7 000 x g pendant 5 min.
Récupérer le surnageant pour l'injection.

Annexe 8 – Protocole d'isolement et de mise en culture d'hépatocytes primaires de sole

Préparation du matériel :

Solution de base isoosmotique (SDB Iso)

NaCl: 152 mM

KCl: 3.4 mM

MgSO₄, 7H₂O: 0.8 mM

Na₂HPO₄, 2H₂O: 0.33 mM

KH₂PO₄ : 0.44 mM

NaHCO₃ : 5 mM

Hépès : 10 mM

Solution SDB + EDTA 0.6 mM (0.01 g dans 50 mL)

Collagénase 1 mg/mL (0.02 g dans 20 mL de SDB Iso)

Solution SDB enrichie en glucose (5mM ; 0.09g pr 100 mL) et CaCl₂ (1.5 mM ; 0.022g pr 100 mL)

Incubateur à 17°C.

Isolement des cellules

Perfusion du foie

1 perfusion de SDB isoosmotique : 5 mL pour un foie de juvénile. (Débit : 0.4 mL/min, voire plus)

1 perfusion de SDB Iso + EDTA (0.6 mM) : 5 mL (Débit : 0.4 mL/min voire plus)

1 Perfusion de collagénase : 5 mL (débit : 0.2 mL/min, voire plus)

Dissociation au scalpel dans 2mL de SDB Iso

Filtrations sur 200, 85, puis 48 µm

Séparer l'échantillon en deux.

Effectuer une centrifugation : 4min, 300 x g, 4°C.

Remettre en suspension dans 1 ml de SDB Iso enrichie en glucose et calcium

Repooler les échantillons et les remettre dans 5 mL de SDB + glucose + Ca.

Laisser 1h à 17°C sans agitation.

Mise en culture des hépatocytes

Effectuer un comptage sur cellule de Neubauer. (essai UBO : $1,7 \cdot 10^6$ cellules/mL)

Mettre 1.5 ou 2 mL de cellules dans 10 mL de milieu de culture.

Préparation du milieu de culture : 9 mL de DMEM ; 1 mL de SVF ; 200 μ L d'antibiotiques, et 200 μ L d'antifongiques.

Placer à 17°C sans agitation.

Annexe 9 – Article 7 : Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17 α -ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos

Résumé de l'article 7 (pages 236-245)

Les biomarqueurs de génotoxicité, comme les effets toxiques de polluants environnementaux au niveau moléculaire, sont fréquemment mesurés en écotoxicologie. Pourtant, les conséquences à long terme de ce type de dommages ne sont toujours pas élucidées. Certains auteurs ont suggéré qu'une accumulation de lésions à l'ADN non réparées pourrait expliquer l'embryotoxicité induite par certains polluants chimiques. L'embryotoxicité ayant un impact direct sur le taux de recrutement, la génotoxicité pourrait être liée à des perturbations écologiques et exercer un impact sur la dynamique des populations. Le but de ce travail était d'étudier la génotoxicité et l'embryotoxicité de trois polluants chez l'embryon d'huître creuse : un HAP, le benzo[a]pyrène, une hormone de synthèse, l'éthinyl oestradiol (EE2), et un pesticide organochloré, l'endosulfan. Pour chaque substance, la fertilisation des gamètes et le développement embryonnaire ont été réalisés dans de l'eau de référence contaminée. Après exposition, l'embryotoxicité a été évaluée par la mesure du taux de larves D anormales à 20 h de développement. La génotoxicité a été mesurée en parallèle, par un test des comètes réalisé sur des cellules embryonnaires de larves pré-coquillées (16 h de développement) dissociées à l'aide d'une enzyme. La base oxydée 8-oxodGuo a également été mesurée par HPLC-UV/ECD. Pour chaque contaminant, la relation entre génotoxicité et embryotoxicité a été étudiée afin de vérifier l'existence d'un possible impact de la génotoxicité sur la dynamique des populations des bivalves marins vivant en zones polluées.

Pour le BaP, une embryotoxicité et des cassures de brins de l'ADN ont été observés dès la plus faible concentration d'exposition de 0,2 nM. Le niveau de 8-oxodGuo était significatif à partir d'une exposition à 20 nM. L'exposition à l'endosulfan a induit un effet similaire chez les embryons d'huître mais à partir de concentrations plus importantes, et de manière dépendante de la concentration. L'embryotoxicité et la génotoxicité mesurée en termes de cassures de brins de l'ADN ont été observés respectivement à partir de 300 et 150 nM. L'exposition à l'endosulfan n'a pas induit d'oxydation des bases de l'ADN. L'EE2 n'a induit aucun effet pour les embryons d'huître dans la gamme de concentrations testées (0,02 à 1,7nM). En considérant la totalité des données obtenues dans cette étude, une corrélation positive significative entre génotoxicité et embryotoxicité a pu être mise en évidence chez l'embryon d'huître.



Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[*a*]pyrene, 17 α -ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos

N. Wessel, S. Rousseau, X. Caisey, F. Quiniou, F. Akcha*

*Ifremer, Département de Biogéochimie et Ecotoxicologie, Rue de l'Île d'Yeu,
44311 Nantes Cedex 03, France*

Received 13 July 2007; accepted 16 August 2007

Abstract

Genotoxicity biomarkers are widely measured in ecotoxicology as molecular toxic endpoints of major environmental pollutants. However, the long-term consequences of such damage still have to be elucidated. Some authors have suggested that the accumulation of unrepaired DNA lesions could explain the embryotoxicity of certain chemical pollutants. As embryotoxicity exerts a direct impact on the recruitment rate, genotoxicity could be closely related to disturbances of ecological concern and produce a possible impact upon population dynamics.

The aim of the present work was to study the genotoxicity and the embryotoxicity of three relevant pollutants for oyster embryos: the polycyclic aromatic hydrocarbon, benzo[*a*]pyrene (BaP), the synthetic estrogenic hormone, 17 α -ethinylestradiol (EE2), and the organochlorine pesticide, endosulfan (ES). For each substance, gamete fertilization was performed and embryo development followed in contaminated reference seawater.

Following exposure, embryotoxicity was evaluated by calculating the percentage of abnormal D-larvae obtained at 20 h development. Genotoxicity was measured in parallel by conducting a comet assay on enzymatically dissociated cells of pre-shelled larvae (16 h development). The oxidized DNA base, 8-oxodGuo, was also measured by HPLC coupled to electrochemical detection. For each contaminant, the relationship between genotoxicity and embryotoxicity was then studied to check for the possible significance of genotoxicity in the population dynamics of marine bivalves from polluted areas.

For BaP, embryotoxicity and DNA strand breakage were both observed from the lowest tested concentration of 0.2 nM. Induction of 8-oxodGuo was significant from 20 nM. Endosulfan exposure resulted in similar effects for oyster embryos but from higher concentrations and followed a concentration-dependent manner. Embryotoxicity and genotoxicity in terms of DNA strand breaks were observed for endosulfan from 300 and 150 nM, respectively. No change in 8-oxodGuo level was observed following endosulfan exposure. EE2 displayed no toxic effect for oyster embryos within the range of tested concentrations (from 0.02 to 1.7 nM).

Taking into account all the data collected during this study, a positive and significant correlation was demonstrated in oyster embryos between genotoxicity as measured by the comet assay and embryotoxicity.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Pacific oyster; Embryotoxicity; DNA damage; Endosulfan; BaP; 17 α -Ethinylestradiol

1. Introduction

The marine environment is under high anthropic pressure, particularly within coastal and estuarine areas. The inputs of diverse chemicals, bioavailable for organisms, threaten the ecosystem's health and marine biodiversity. Further to bio-

transformation, chemical pollutants can exert different kinds of toxicity from molecular to physiological levels, triggering potential consequences on an individual or community scale. Such processes have been the subject of recent research (Matthiessen and Law, 2002; Shahidul Islam and Tanaka, 2004). In ecotoxicological studies, efforts are commonly focused on few toxic endpoints and on a restricted number of individuals. The remaining difficulty is to predict the long-term consequences of such toxic effects on the population, the community and the ecosystem. In the case of xenoestrogens, the situation is different as

* Corresponding author. Tel.: +33 240374208; fax: +33 240374075.
E-mail address: fakcha@ifremer.fr (F. Akcha).

the effects are related to the reproduction process and have a direct impact on the population dynamics (Miller and Ankley, 2004; Gutjahr-Gobell et al., 2006). For other toxic endpoints, it is more difficult to stipulate the long-term consequences caused by pollutant exposure. This is the case for genotoxicity, despite its reported involvement in mutagenesis, carcinogenesis, ageing and other pathologies.

Within this context, this study aims to bring response elements to the relationship that may exist between the genotoxicity and the embryotoxicity of certain chemicals. Such a relationship was previously suggested by some authors who propose the accumulation of unrepaired DNA damage as an explicative variable of chemical embryotoxicity (Anderson and Wild, 1994; Wells et al., 1997). By its direct effect on the recruitment rate, embryotoxicity is one of the parameters governing population dynamics. Such a relationship will thus establish a link between early markers of genotoxicity and indirect effects on population dynamics.

Three chemicals were studied in the present paper. The first one is benzo[*a*]pyrene (BaP) which is a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) often used as a model compound in genotoxicity and cancerogenicity studies. BaP features on the list of the 16 priority PAHs of the US Environmental Protection Agency (EPA) and on the dangerous substances list of the European Water Framework Directive (EU WFD). PAHs such as BaP are known as embryotoxic and teratogenic compounds (Wassenberg and Di Giulio, 2004). The second chemical tested is ethinylestradiol (Ethinyl-17 α -dihydroxy-3,17 estratriene-1,3,5(10), EE2), a synthetic hormone and part of the composition of contraceptive pills. EE2 is a water pollutant producing endocrine disruptor effects in exposed organisms, leading to growth and reproduction disturbances (Jobling et al., 2004). The last chemical studied is endosulfan, which is an organochlorine pesticide that was banned from production from December 2005 but whose use was permitted until May 2007 in Europe. In fact, its worldwide use is responsible for the high concentrations measured in aquatic systems. Because it is known as one of the most toxic pesticides for aquatic life, endosulfan is considered as a hazardous pollutant by the EPA and as a priority dangerous substance by the EU WFD. Endosulfan is also known as a xenoestrogen (Bulayeva and Watson, 2004).

The Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Lamarck, 1819), is the biological model selected for this study. Due to its bio-ecological particularities (e.g. filter-feeding activity, sessile nature, ubiquity), the oyster is an organism of choice for biomonitoring the marine environment. The knowledge of its life cycle and the control of its breeding allow for the development of an oyster bioassay based on the obtention of abnormal D-larvae as a measure of embryotoxicity (Chapman and Morgan, 1983; His et al., 1997). Further to exposure to these selected chemicals, embryotoxicity was evaluated by calculating the percentage of D-shell larvae presenting shell and/or mantle abnormalities. Genotoxicity was measured in parallel in terms of DNA strand breaks and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo). Genotoxicity and embryotoxicity data were then analyzed for correlations.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and material

The reference sea water used for the experiments was pumped from Argenton (Brittany, France) and was filtered at 0.22 μ m before use. RPMI 1640 medium, dimethyl sulphoxide (DMSO), 0.4% trypan-blue solution, benzo[*a*]pyrene (CAS No 50-32-8), endosulfan (CAS No 115-29-7), 17 α -ethinylestradiol (CAS No 57-63-6), ethidium bromide (BET), foetal bovine serum (SVF), sodium dodecyl sulfate (SDS), RNases A and T1, normal and low melting point agarose, collagenase, deferoxamine mesylate, nuclease P1, Triton X-100, pure 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) and pure 2'-deoxyguanosine (dGuo) were purchased from Sigma–Aldrich Chemicals. The protease came from Qiagen, and the alkaline phosphatase from Roche Diagnostics.

2.2. Animals

Oysters came from a hatchery specialized in the production of organisms used for bioassay monitoring (Guernsey sea farms, UK). Oysters were dispatched in batches of five males and five females. They were used within two days. The individuals not used the first day were stored at 4 °C.

2.3. Gamete recovery and fertilization

In the laboratory, spawning was induced by scarification as described by Quiniou et al. (2005). This method allows for a quick recovery of the gametes in reference sea water. Following rehydration, the oocytes and the sperm of different oysters were sieved at 100 nm for oocytes and 32 nm for spermatozoa, and observed under an inverted microscope. The oocytes were fertilized by the sperm-dense suspension to raise a ratio of 10 spermatozoa per 1 oocyte. Fifteen minutes after fertilization, embryos were counted and dispatched in each assay beaker at a final concentration of 50,000 fertilized eggs per litre.

2.4. Chemical exposure

BaP, EE2 and endosulfan are not water soluble and were previously dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) after having determined their solubility limits. Chemical solutions were prepared so that the DMSO concentration in the sea water was 0.1%. For each chemical, three concentrations of exposure were selected considering the environmental concentrations described in the bibliography. The lowest concentration was within the range of the highest environmental concentrations reported by the authors, the other two were multiplied by a factor of 10 to 10,000 (Table 1).

For the embryotoxicity assays, embryos were exposed for 20 h at 24 °C in the dark in beakers containing 30 mL of filtered sea water (four replicates per condition). This incubation time enables the embryo to develop until the D-shell stage.

Table 1
Environmental and tested concentrations of each studied chemical

Chemicals	Environmental concentrations	References	Exposure concentrations (nM)		
			C1	C2	C3
BaP	0.2 nM (0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$)	Kolpin et al. (2002)	0.2	20 ($\times 100$)	2 ($\times 10\ 000$)
EE2	0.02 nM (5 ng L^{-1})	Kolpin et al. (2002)	0.02	0.17 ($\times 10$)	1.7 ($\times 100$)
ES	0.3 nM (122 ng L^{-1})	Aleem and Malik (2005)	0.5	15 ($\times 30$)	150 ($\times 300$)

For the genotoxicity assays, embryos were incubated in 2 L beakers for 16 h at 24 °C in the dark. This incubation period allows for the recovery of unshelled larvae whose cells can later be enzymatically digested for the comet assay. Three replicates were performed per condition and each replicate consisted of four beakers containing a total of 400,000 larvae.

2.5. Embryotoxicity assay

Following exposure, the larvae of each beaker were fixed using formol (0.5 mL/beaker). For each assay beaker, 100 larvae were observed under an inverse microscope ($g \times 40$) to determine the rate of D-shell larvae presenting mantle and/or shell abnormalities (Fig. 1).

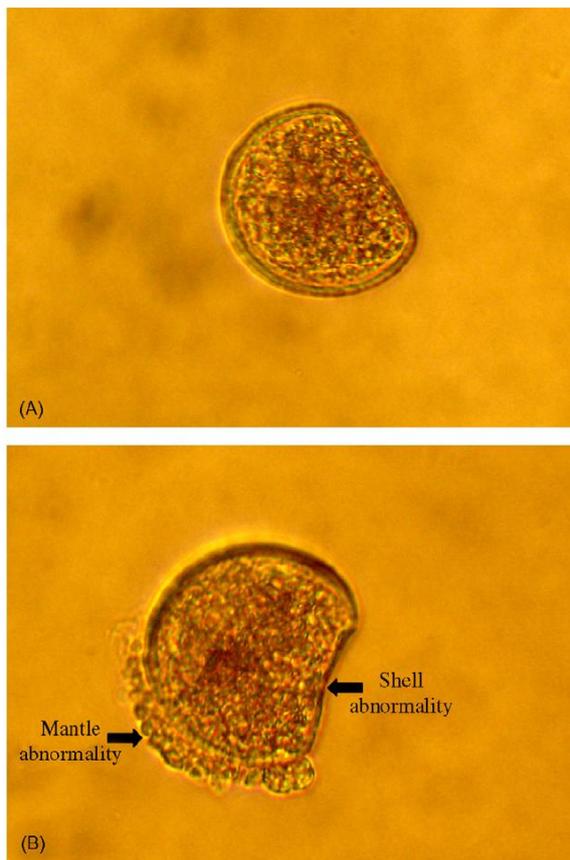


Fig. 1. Normal (A) and abnormal (B, mantle and shell abnormalities) oyster D-larvae at 20 h of development.

2.6. Genotoxicity assays

2.6.1. Measurement of DNA strand breaks (Comet assay)

2.6.1.1. Dissociation of embryo cells. The comet assay was performed on isolated cells as described in Akcha et al. (2003). As a consequence, it is necessary after pollutant exposure to dissociate larvae cells prior to comet measurement. Different protocols of cell dissociation were tested in our laboratory: mechanic dissociation by using a potter and enzymatic dissociation comparing the action of three different enzymes (trypsin, collagenase and accutase). Larvae digestion by collagenase was selected for our study due to a high dissociation efficiency, good cell viability (trypan blue exclusion test > 80%), and low comet parameter values (unpublished data). Digestion occurred as follows. Following 16 h of exposure, the larvae were recovered by sieving at 32 mm and incubated in 15 mL of a collagenase solution at 1.11 g L^{-1} . The reaction was stopped by centrifugation for 10 min at 1300 rpm and 4 °C. The cell pellet was then resuspended in 2.8 mL of freezing medium made up of 40% Calcium-Magnesium Free Saline (20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 12.5 mM KCl, 5 mM EDTA), 12% DMSO, 15% SVF, and 33% RPMI. Before and after freezing in liquid nitrogen, cell viability was determined for each sample by a trypan-blue exclusion test. In both cases, cell viability was at least equal to 75%, allowing the conduction of the comet assay.

2.6.1.2. Slide preparation and comet measurement. Cell samples were slowly defrosted at room temperature. Slides were prepared as follows: *First layer:* the slides were immersed in a 0.5% NMP agarose solution in PBS and allowed to dry at room temperature. *Second layer:* for each sample, 30 μL of the cell suspension were added in a 225 μL aliquot of a 0.5% LMP agarose solution in PBS. Eighty-five microliters of this mixture was then deposited on a slide and spread using a micro-cover glass. The slides were immediately placed on ice in the dark for 1 min to allow for the agarose to polymerise. For each sample, three slides were prepared from the same aliquot. *Third layer:* once the cover glass had been withdrawn, 90 μL of the LMP agarose solution was deposited on the slide and spread using a micro-cover glass. The slides were then stored in ice.

Once the last cover glass was withdrawn, the slides were immersed in an ice-cold lysis buffer (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA- Na_2 , 0.01 M Tris base, 1% *N*-sarcosinate, 10% DMSO, 1% Triton X-100, pH 10) for 1 h at room temperature in the dark. DNA unwinding was then performed by pre-incubating the slides in a freshly prepared electrophoresis buffer (0.3 M NaOH, 0.001 M EDTA, pH 13) for 15 min at room temperature in the dark. DNA migration was performed in the same buffer for

20 min at 23 V (390 mA, $E=0.66 \text{ V cm}^{-1}$). At the end of electrophoresis, slides were washed by incubation for 3×5 min in Tris base 0.4 M, pH 7.5. In order to obtain permanent preparations, the slides were immersed for 10 min in absolute ethanol for dehydrating, and allowed to dry at room temperature. Just before analysis, $75 \mu\text{L}$ of BET at $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ were deposited on the slide and spread over it using a cover glass. Slides were placed for at least 30 min at 4°C for coloration.

Slides were analysed using an optical fluorescence microscope (Olympus BX60, $\times 40$) fitted to a CDD camera (Olympus) and an image analysis system (Komet 4, Kinetic Imaging Ltd.). Several parameters were calculated for each observed cell (75 cells/slide), including the percentage of DNA present in the comet tail and the Olive tail moment (OTM).

2.6.2. Measurement of 8-oxodGuo (HPLC/ECD)

2.6.2.1. DNA extraction. DNA was isolated from embryo cells using the chaotropic NaI method which derives from that of Helbock et al. (1998), slightly modified by Akcha et al. (2000a). Samples were centrifuged at $1500 \times g$ for 10 min at 4°C . The supernatants were discarded and the pellets were suspended in 2 mL of Buffer A (320 mM sucrose, 5 mM MgCl_2 , 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM deferoxamine mesylate, 1% Triton X-100, pH 7.5). Following centrifugation ($1500 \times g$, 10 min, 4°C), pellets were recovered and resuspended in $600 \mu\text{L}$ of Buffer B (5 mM EDTA- Na_2 , 10 mM Tris-HCl, 0.15 mM deferoxamine mesylate, pH 8). After addition of $35 \mu\text{L}$ of 10% SDS, RNA digestion was performed by incubation with $120 \mu\text{g}$ of RNase A and 20 U of RNase T1 for 15 min at 50°C . Protein digestion was carried out by incubation with $600 \mu\text{g}$ of protease for 1 h at 37°C . Samples were then centrifuged at $5000 \times g$ for 15 min at 4°C , and supernatants recovered in 15 mL sterile tubes. Following addition of 1.2 mL of sodium iodide solution (20 mM EDTA- Na_2 , 7.6 M NaI, 40 mM Tris-HCl, 0.3 mM deferoxamine mesylate, pH 8) and 2 mL isopropanol, the tubes were centrifuged for 15 min at $5000 \times g$. The pellets were then recovered and resuspended in 2 mL 40% isopropanol. Following centrifugation ($5000 \times g$, 15 min, 4°C), pellets were washed in 2 mL of 70% glacial ethanol, and centrifuged at $5000 \times g$ for 5 min at 4°C . Ethanol was then discarded using a pipette, and the pellets were left to dry for 1 h at room temperature. DNA was finally resuspended in $100 \mu\text{L}$ of deferoxamine mesylate 0.1 mM and left to dissolve overnight at 37°C .

2.6.2.2. DNA quantification. Measurement was performed by spectrophotometry at 280, 260, and 230 nm wavelengths by using a ND1000 NanoDrop (NanoDrop Technologies, Inc). Pure DNA solution presents a 260/280 ratio between 1.8 and 2, and a 260/230 ratio of approximately 2. DNA concentration of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ is obtained for a theoretic absorbance of 1 OD unity at 260 nm. Following quantification, DNA samples were stocked in liquid nitrogen prior to analysis.

2.6.2.3. DNA digestion. For each sample, $15 \mu\text{g}$ of DNA was digested by incubation with 5 U of nuclease P1 for 2 h at 37°C . Four units of alkaline phosphatase were then added for an addi-

tional 1 h incubation at 37°C . The sample was centrifuged (5 min, $7000 \times g$, 4°C) and the supernatant was recovered for injection.

2.6.2.4. HPLC analysis. The 8-oxodGuo level was determined by HPLC (Agilent 1200 series) coupled to electrochemical (Coulchem III, ESA) and UV (Agilent 1200 series) detection. Separation of 8-oxodGuo and 2'-deoxyribosides was carried out by using an Ultrasphere pre-column (5C18, Interchim) and an Uptisphere column (5ODB, Interchim). Elution was performed in isocratic mode using a mobile phase composed of 10% methanol and 100 mM sodium acetate, at pH 5.2. The elution flow rate was set at 1 mL min^{-1} . The guard and the measure cells were respectively set at an oxidation potential of 460, 150 and 380 mV. The quantification of 8-oxodGuo was performed in accordance with a calibration curve previously obtained with known picomole amounts of authentic 8-oxodGuo. For a standard expression in the number of 8-oxodGuo residues per 10^6 dGuo, deoxyguanosine was also quantified by fitting a UV detector to the output of the HPLC column. The UV detector was set at a wavelength of 254 nm. A calibration curve was also obtained for this compound within the nmole range. For the conditions described, the retention times of both 8-oxodGuo and dGuo were respectively 11.5 and 8.5 min at 35°C .

2.7. Statistical analyses

Embryotoxicity and genotoxicity data were exploited by performing an analysis of variances, ANOVA, using Statistica 6.0 (Statsoft, Inc.). Normality of the data was checked (normal p-plot) and when necessary normalization was performed by mathematical processing. Each time a significant difference was demonstrated, an *a posteriori* test (Tukey's test) was performed. Correlations were also checked using the same software.

3. Results

3.1. Benzo[a]pyrene exposure

The percentage of abnormal D-shell larvae significantly increased following exposure to BaP ($p < 0.001$). Embryotoxicity was observed from the lowest tested concentration of 0.2 nM and did not appear to be concentration-dependent (Fig. 2).

Following 16 h exposure to BaP, a significant increase in DNA strand breaks was observed by the comet assay ($p < 0.001$). The increase was significant from the lowest tested concentration of 0.2 nM and was independent of the concentration (Fig. 3). An increase in the level of 8-oxodGuo was also observed from the exposure concentration of 20 nM ($0.01 < p < 0.05$) (Fig. 4).

3.2. 17 α -Ethinylestradiol exposure

Ethinylestradiol had no effect on larvae development in the oyster for the range of tested concentrations (0.02–1.7 nM) ($p > 0.05$) (Fig. 2).

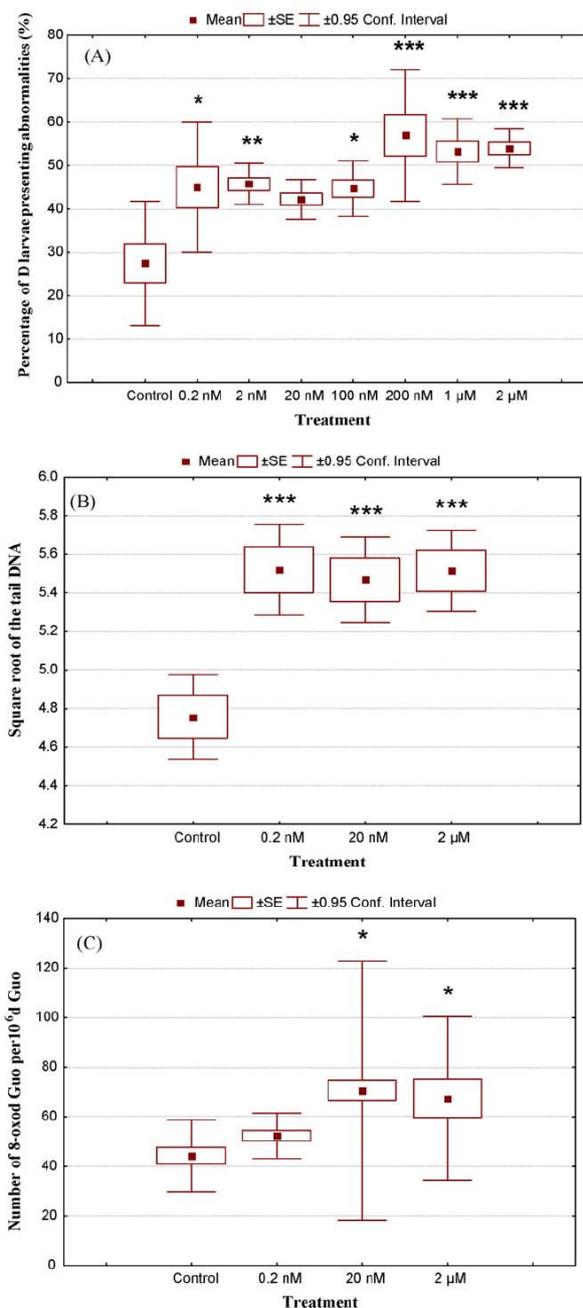


Fig. 2. Embryotoxic and genotoxic effects induced by BaP exposure. Percentage of D-larvae presenting abnormalities following 20h of exposure (A), levels of single DNA strand breaks (B) and 8-oxodGuo residues (C) following 16h of exposure (S.E.: Standard error; conf. interval: confidence interval at 95%). (*), (**), (***) Statistically significant at $p \leq 0.05$; $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$, respectively.

The results of the comet assay revealed no difference between the control and the exposed groups in the extent of DNA strand breaks ($p > 0.05$) (Fig. 3). For this treatment, 8-oxodGuo measurement could not be carried out.

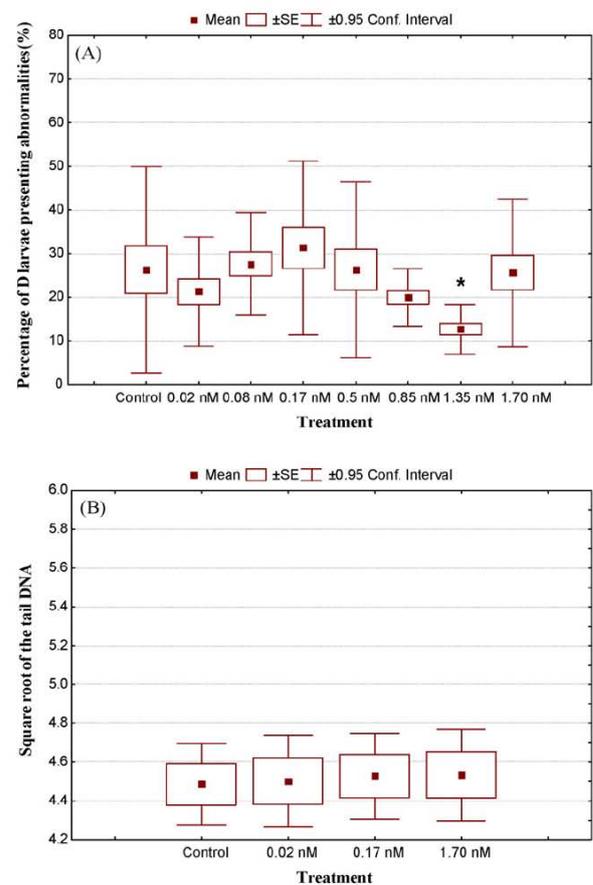


Fig. 3. Results obtained following EE2 exposure. Percentage of D-larvae presenting abnormalities (A) and levels of DNA strand breaks (B) following respectively 20h and 16h of exposure (S.E.: standard error; conf. interval: confidence interval at 95%). (*): Statistically significant at $p \leq 0.05$.

3.3. Endosulfan exposure

Following endosulfan exposure, an increase in abnormal D-larvae was observed ($p < 0.001$) (Fig. 2). The increase became statistically significant from the highest tested concentration of 300 nM.

The level of DNA strand breaks increased with the concentration of endosulfan. However, the increase became statistically significant only at the highest tested concentration of 150 nM ($0.001 < p < 0.005$) (Fig. 3). No difference in the level of 8-oxodGuo was observed for the tested range of endosulfan concentration ($p > 0.05$) (Fig. 4).

3.4. Relationship between embryotoxicity and genotoxicity

The data collected in the present study were analyzed together in order to check for correlations between the embryotoxic parameter (% of abnormal D-larvae) and the genotoxicity measurement ($\sqrt{\text{Tail DNA}}$ and 8-oxodGuo level). The results obtained are described in Table 2. A significant positive

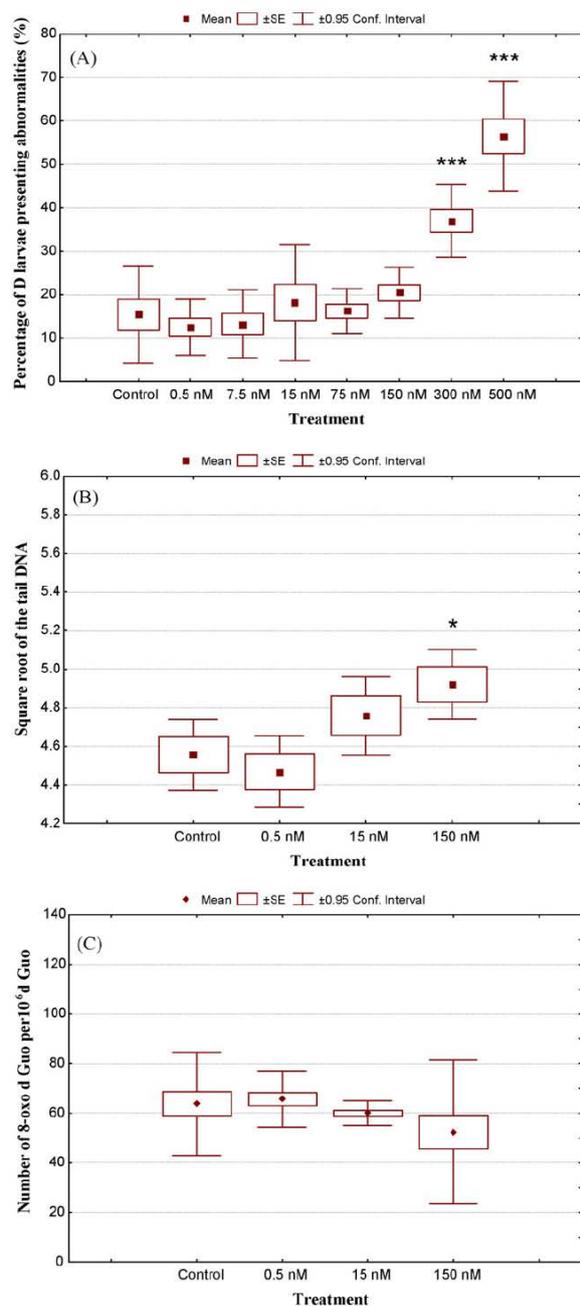


Fig. 4. Embryotoxic and genotoxic effects following ES exposure. Percentage of D-larvae presenting abnormalities following 20h of exposure (A), levels of DNA strand breaks (B) and 8-oxodGuo residues (C) following 16h of exposure (S.E.: standard error; conf. interval: confidence interval at 95%). (*), (**), (***): Statistically significant at $p \leq 0.05$; $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$, respectively.

correlation was demonstrated between the comet parameter, $\sqrt{\text{Tail DNA}}$ and the percentage of abnormal D-shell larvae ($R^2 = 0.651$, $p < 0.001$). No correlation was observed between 8-oxodGuo level and embryotoxicity ($p = 0.91$) nor between the two genotoxic parameters measured ($p = 0.93$).

Table 2

Correlations between embryotoxicity parameter and genotoxicity measurement

	Embryotoxicity	Genotoxicity: DNA strand breaks
Genotoxicity: DNA strand breaks	$R^2 = 0.652$; $p < 0.001$; $N = 36$	
Genotoxicity: 8-oxodGuo	$R^2 = 0.026$; $p = 0.906$; $N = 24$	$R^2 = 0.019$; $p = 0.931$; $N = 24$

4. Discussion

4.1. BaP

In this paper, embryotoxicity was observed for BaP at a concentration of 0.2 nM, which is environmentally relevant (Kolpin et al., 2002), suggesting a risk for the oyster recruitment rate in severely polluted areas.

The embryotoxicity observed for BaP is in accordance with the results of previous studies conducted on the prenatal toxicity of PAH exposure for aquatic organisms. The applications of the oyster embryo-larval bioassay already contributed to a sounder knowledge of the embryotoxic and teratogenic effects of PAHs (Geffard et al., 2002, 2003). In the echinoderm, sea urchin, PAH exposure results in a dose-dependent disruption of axial development of the embryo (Pillai et al., 2003). In the early life stages of the zebrafish (48–96 hpf), certain PAHs have been associated with the observation of what is called the “blue sac syndrome”, including various developmental effects such as reduced growth, crania-facial malformations, yolk sac and pericardial edema, and subcutaneous hemorrhaging, generally associated with planar halogenated aromatic hydrocarbons. The pathways by which PAHs disturb individual development in fish are complex and seem to be dependent on the structure of the compound itself (Incardona et al., 2006; Billiard et al., 2006). For tricyclic aromatic hydrocarbons such as phenanthrene, embryonic cardiac dysfunction is mainly observed and seems to be mediated in an aryl hydrocarbon receptor (AHR)- and CYP1A-independent manner, by direct action on cardiac ion channels (Incardona et al., 2005). On the other hand, tetracyclic aromatic hydrocarbons such as benz[a]anthracene appear to display their embryotoxicity through a classical AHR pathway (Incardona et al., 2006). In this latter case, ligation to the AHR could result in an increase in the transcription level of a pro-apoptotic gene as demonstrated recently for 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (Detmar et al., 2006).

In parallel to embryotoxicity, genotoxic effects, as measured by DNA strand breaks and the oxidized DNA base 8-oxodGuo, were observed following oyster embryo to BaP exposure, confirming the ability of early life stages to bioactivate PAH (Fong et al., 1993). The genotoxicity and the carcinogenicity of BaP have been well described in humans and rodents (Akcha et al., 2004; Xue and Warshawsky, 2005) and similar pathways of bioactivation have been proposed in marine organisms (van der Oost et al., 2003). Bioactivation of BaP to electrophilic metabolites resulted in DNA adduct formation as already demonstrated in mussels (Canova et al., 1998; Akcha et al., 2000b). BaP can also

be oxidized to prooxidant metabolites such as quinones and *o*-quinones responsible for a redox-cycling production of reactive oxygen species (Sjölin and Livingstone, 1997). The resulting oxidative stress damages the macromolecules such as the DNA. The formation of the oxidized DNA base, 8-oxodGuo has been reported in bivalves following BaP contamination via the water column or the trophic supply (Canova et al., 1998; Akcha et al., 2000a; Machella et al., 2004). DNA strand breaks can also be produced in response to oxidative stress as already demonstrated *in vivo* following exposure of flounders, oysters and mussels to BaP via the sediment, the water column or by trophic transfer (Nasci et al., 1999; Taban et al., 2004). An increase in the level of DNA strand breaks in shrimp embryos was also reported by Hook and Lee (2004) following a 12 h exposure to 0.2 μ M BaP.

In the present paper, DNA strand breaks appear more sensitive than 8-oxodGuo to BaP exposure, with both lesions significantly increasing from a concentration of 0.2 and 20 nM, respectively. This difference in sensitivity could be explained by the measurement of DNA strand breakage by alkaline comet assay that also takes into account the presence of abasic and other alkali-labile sites that can result from the incomplete repair of DNA damage such as adducts by excision repair systems.

4.2. EE2

As an endocrine disruptor, EE2 interferes with the normal physiological functions related to reproduction, justifying studies of its potential developmental toxicity. The morphological disorders of the reproductive tract associated with EE2 exposure and other environmental xenoestrogens have been closely studied in recent years (Porte et al., 2006; Goksoyr, 2006). Nevertheless, there remains a paucity of literature ascertaining the embryotoxic effect of EE2. A negative effect on embryo development of *Oryzias latipes* was reported by Papoulias et al. (2000) from concentrations ranging from 0.5 to 2.5 ng per egg. A marked embryotoxic effect from 0.1 mM was also reported *in vitro* for rodent embryos by Beyer and Juchau (1988). Embryotoxic effects were also reported for its natural hormonal counterpart, 17 β -estradiol, to which fish at early life stages were exposed over a 12-week period and subsequently shown to suffer malformations and incomplete ossification from a concentration of 10 nM (Iguchi et al., 2001). In the present paper, no embryotoxic effect of EE2 was observed for oyster embryos within the range of tested concentrations (0.02–1.7 nM).

EE2 is known to be a strong promoter of hepatocarcinogenesis due to its effects on cell proliferation. The significance of direct and indirect genotoxicity of EE2 metabolites has also been proposed in carcinogenesis, thus justifying the interest in studying EE2 genotoxicity. Following exposure of human lymphocytes to EE2 (3.4–300 μ M) with or without S9 metabolic activation, an increase in sister chromatid exchange and chromosomal aberrations was reported (Hundal et al., 1997; Siddique et al., 2005). In rat testicular cells, EE2 exposure resulted in an increase in the level of the oxidized base, 8-oxodGuo, reaching a maximum at a concentration of 10 nM, the formation of this oxidative DNA lesion following a bell-shaped

concentration–response relationship (Wellejus and Loft, 2002; Wellejus et al., 2004). Base oxidation was also demonstrated *in vivo* in female rats orally exposed to EE2 (0.075 or 0.75 mg/day) (Ogawa et al., 1995). In the latter study, the decrease in 8-oxodGuo observed after the combined administration of antioxidant vitamins underlined the significance of oxidative stress in the induced genotoxicity. In the rat, the formation of hepatic DNA adducts was also detected by the application of the ³²P post-labeling technique in parallel to the observation of hyperplastic nodules in the liver (Shimomura et al., 1992).

Similarities were found between the metabolism of PAH hydroquinones and catechol estrogens produced by the hydroxylation of the aromatic A ring of estradiol and estrone at positions C2 and C4 (Penning, 1993). The 2,3 and 3,4 catechol estrogens can produce highly reactive quinone metabolites involved in the *in vitro* formation of stable and depurinating DNA adducts (Stack et al., 1996, 1998; Cavalieri and Rogan, 1998; Debrauwer et al., 2002; Jouanin et al., 2002; Belous et al., 2007). Following reduction, these quinones can also lead to the redox-cycling production of highly reactive radical semi-quinones that can covalently bind to the DNA (Akanni and Abul-Hajj, 1997; Cavalieri et al., 2006). Redox-cycling reactions also generate reactive oxygen species (ROS) involved in oxidative damage to cellular macromolecules such as the DNA (Yager, 2000; Hiraku et al., 2001).

In the present study, the absence of embryotoxicity for EE2 could be explained by the low concentrations tested (max 1.7 nM), that remain well below the effective concentration measured by Beyer and Juchau in rodents (0.1 mM). In fish, malformations were induced for an EE2 concentration within the same range (10 nM). However, the fish were exposed for 12 weeks compared to only 16 h for the oyster embryos used in this experiment.

It is possible that the range of tested concentrations was too low for the expression of potential EE2 genotoxicity.

4.3. Endosulfan (ES)

ES is known as a xenoestrogen and is potentially toxic during the development of exposed organisms. As for EE2, there is a paucity of literature ascertaining its embryotoxicity and teratogenicity, and this is exclusively reported in rodents (Gupta et al., 1978; Singh et al., in press).

Oxidative DNA damage has been associated with ES exposure. In yeast, rodent, and human cells, ES was shown to cause oxidative stress, resulting in a dose-dependent increase in DNA strand breaks (Sohn et al., 2004; Bajpayee et al., 2006). Following a 96 h exposure to 1.23 nM, ES was shown to increase the frequency of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of juveniles of *Sparus aurata* in a dose-dependent manner (Neuparth et al., 2006). The induction of micronuclei has already been reported in amphipods following 96 h exposure to concentrations ranging from 6 to 25 nM (Lajmanovich et al., 2005).

In mammals, ES is metabolized into endosulfan sulfate and to endosulfan ether, the latter being further transformed to endosulfan ether, hydroxyether and lactone (Bajpayee et

al., 2006). The genotoxicity of ES and its metabolites appears to be mediated via the production of oxyradicals. However, ES has also been shown to form DNA adducts in primary rat hepatocytes and human liver hepatoblastoma cells, indicating the biotransformation of the parent compound into electrophilic metabolites (Dubois et al., 1996).

In the present paper, the embryotoxicity and the genotoxicity of ES was confirmed for oyster embryos at concentrations from 300 and 150 nM, respectively. These concentrations may be considered rather high in the light of available bibliographic data but should be interpreted upon consideration of the short duration of the exposure period.

4.4. The statistical relationship between embryotoxicity and genotoxicity

A positive correlation was demonstrated between embryotoxicity and genotoxicity when DNA strand break levels were considered as DNA damage. Despite the fact that a cause/effect relationship cannot be established, a statistical link is demonstrated between these two modes of toxicity.

A large number of research papers highlight the significance of genotoxicity in the pathophysiology of reproduction in human and other vertebrates such as fish (Agarwal et al., 2003, 2006; Zhou et al., 2006). There is much less data concerning the potential link between genotoxicity and embryotoxicity. As suggested by Wells et al. (1997), embryotoxicity is thought to result from the bioactivation of pro-teratogens to reactive metabolites for the cellular macromolecules. The formation of DNA and protein adducts is proposed as a crucial event for teratogenesis initiation. Oxidative damage to these macromolecules is also considered a key event in the molecular mechanisms of embryotoxicity and teratogenicity. The specific target genes or proteins, however, remain unknown.

It is important to note that in the present paper we did not observe a correlation between comet and 8-oxodGuo data and between embryotoxicity and 8-oxodGuo data. As already mentioned, it is possible that DNA adduct formation represents an important pathway of BaP and ES genotoxicity. In this case, the comet assay may be more appropriate for a global measurement of DNA damage.

5. Conclusion

Following an exposure of oyster embryos to EE2, no embryotoxicity and genotoxicity was observed for the range of concentrations tested (0.02–1.7 nM). An exposure of oyster embryos to BaP and ES resulted in embryotoxicity as measured by the percentage of abnormal D-shell larvae. These environmental pollutants also displayed genotoxic effects as measured by oxidative DNA damage, in terms of DNA strand breaks, alkali labile sites and 8-oxodGuo. These results confirm the ability of the oyster to biotransform these xenobiotics from early life stages. Bioactivation is thought to result in the induction of an oxidative stress involved in the measured oxidative DNA damage. DNA adduct formation is expected to occur for the selected exposure conditions.

The positive correlation observed between oyster embryotoxicity and the comet data tends to confirm the significance of genotoxicity in the molecular mechanisms of BaP and ES embryotoxicity. The genotoxicity of chemical pollutants would therefore have an indirect effect on population size and as a consequence on population dynamics.

For BaP, toxic effects are observed from a concentration of 0.2 nM that is situated within the same range as the highest concentrations recorded in the aquatic environment, suggesting a risk for oyster recruitment in highly polluted coastal areas.

References

- Agarwal, A., Saleh, R.A., Bedaiwy, M.A., 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* 79, 829–843.
- Agarwal, A., Said, T.M., Bedaiwy, M.A., Banerjee, J., Alvarez, J.G., 2006. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil. Steril.* 86, 503–512.
- Akanni, A., Abul-Hajj, Y.J., 1997. Estrogen-nucleic acid adducts: reaction of 3,4-estrone-*o*-quinone radical anion with deoxyribonucleosides. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 760–766.
- Akcha, F., Ruiz, S., Zamperon, C., Venier, P., Burgeot, T., Cadet, J., Narbonne, J.F., 2000a. Benzo[*a*]pyrene-induced DNA damage in *Mytilus galloprovincialis*: measurement of bulky DNA adducts and DNA oxidative damage in terms of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine formation. *Biomarkers* 5, 355–367.
- Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T., Narbonne, J.-F., 2000b. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[*a*]pyrene-contaminated mussels. *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 49, 269–287.
- Akcha, F., Vincent Hubert, F., Pfohl-Leszkowicz, A., 2003. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 534, 21–32.
- Akcha, F., Leday, G., Pfohl-Leszkowicz, A., 2004. Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage. In: Jha, N.A. (Ed.), *Genotoxicological Studies in Aquatic Organisms*. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 552, 197–207.
- Aleem, A., Malik, A., 2005. Genotoxicity of the Yamuna River water at Okhla (Delhi), India. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 404–412.
- Anderson, S.L., Wild, G.C., 1994. Linking genotoxic responses and reproductive success in ecotoxicology. *Environ. Health Perspect.* 102, 9–12.
- Bajpayee, M., Pandey, A.K., Zaidi, S., Musarrat, J., Parmar, D., Mathur, N., Seth, P.K., Dhawan, A., 2006. DNA damage and mutagenicity induced by endosulfan and its metabolites. *Environ. Mol. Mutagen.* 47, 682–692.
- Belous, A.R., Hachey, D.L., Dawling, S., Roodi, N., Parl, F.F., 2007. Cytochrome P450 1B1-mediated estrogen metabolism results in estrogen-deoxyribonucleoside adduct formation. *Cancer Res.* 67, 812–817.
- Beyer, B.K., Juchau, M.R., 1988. Contrasting effects of estradiol-17[β] and 17[α]-ethinyl estradiol-17[β] on cultured whole embryos. *J. Steroid Biochem.* 29, 629–634.
- Billiard, S.M., Timme-Laragy, A.R., Wassenberg, D.M., Cockman, C., Di Giulio, R.T., 2006. The role of the aryl hydrocarbon receptor pathway in mediating synergistic developmental toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to zebrafish. *Toxicol. Sci.* 92, 526–536.
- Bulayeva, N.N., Watson, C.S., 2004. Xenoestrogen-induced ERK-1 and ERK-2 activation via multiple membrane-initiated signaling pathways. *Environ. Health Perspect.* 112, 1481–1487.
- Canova, S., Degan, P., Peters, L.D., Livingstone, D.R., Voltan, R., Venier, P., 1998. Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[*a*]pyrene. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 399, 17–30.

- Cavaliere, E., Chakravarti, D., Guttenplan, J., Hart, E., Ingle, J., Jankowiak, R., Muti, P., Rogan, E., Russo, J., Santen, R., Sutter, T., 2006. Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: Implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention. *Biochim. Biophys. Acta* 1766, 63–78.
- Cavaliere, E.L., Rogan, E.G., 1998. Role of aromatic hydrocarbons in disclosing how catecholestrogens initiate cancer. *Adv. Pharmacol.* 42, 837–840.
- Chapman, P.M., Morgan, J.D., 1983. Sediment bioassays with oyster larvae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 438–444.
- Debrauwer, L., Rathahao, E., Couve, C., Poulain, S., Pouyet, C., Jouanin, I., Paris, A., 2002. Oligonucleotide covalent modifications by estrogen quinones evidenced by use of liquid chromatography coupled to negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 976, 123–134.
- Detmar, J., Rabaglino, T., Taniuchi, Y., Oh, J., Acton, B.M., Benito, A., Nunez, G., Jurisicova, A., 2006. Embryonic loss due to exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons is mediated by Bax. *Apoptosis* 11, 1413–1425.
- Dubois, M., Pfohl-Leszkowicz, A., De Waziers, I., Kremers, P., 1996. Selective induction of the CYP3A family by endosulfan and DNA-adduct formation in different hepatic and hepatoma cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 1, 249–256.
- Fong, A.T., Dashwood, R.H., Cheng, R., Mathews, C., Ford, B., Hendricks, J.D., Bailey, G.S., 1993. Carcinogenicity, metabolism and Ki-ras proto-oncogene activation by 7, 12-dimethylbenz[*a*] anthracene in rainbow trout embryos. *Carcinogen* 14, 629–635.
- Geffard, O., Budzinski, H., His, E., 2002. The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin. *Ecotoxicology* 11, 403–416.
- Geffard, O., Geffard, A., His, E., Budzinski, H., 2003. Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 481–490.
- Goksoyr, A., 2006. Endocrine disruptors in the marine environment: mechanisms of toxicity and their influence on reproductive processes in fish. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 69, 175–184.
- Gupta, P.K., Chandra, S.V., Saxena, D.K., 1978. Teratogenic and embryotoxic effects of endosulfan in rats. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 42, 150–152.
- Gutjahr-Gobell, R.E., Zarogian, G.E., Borsay Horowitz, D.J., Gleason, T.R., Mills, L.J., 2006. Individual effects of estrogens on a marine fish, Cunner (*Tautoglabrus adspersus*), extrapolated to the population level. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 244–252.
- Helbock, H.J., Beckman, K.B., Shigenaga, M.K., Walter, P.B., Woodall, A.A., Yeo, H.C., Ames, B.N., 1998. DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 288–293.
- Hiraku, Y., Yamashita, N., Nishiguchi, M., Kawanishi, S., 2001. Catechol estrogens induce oxidative DNA damage and estradiol enhances cell proliferation. *Int. J. Cancer* 92, 333–337.
- His, E., Seaman, M.N.L., Beiras, R., 1997. A simplification the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. *Water Res.* 31, 351–355.
- Hook, S.E., Lee, R.F., 2004. Interactive effects of UV, benzo[*alpha*] pyrene, and cadmium on DNA damage and repair in embryos of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*. *Mar. Environ. Res.* 58, 735–739.
- Hundal, B.S., Dhillon, V.S., Sidhu, I.S., 1997. Genotoxic potential of estrogens. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 389, 173–181.
- Iguchi, T., Watanabe, H., Katsu, Y., 2001. Developmental effects of estrogenic agents on mice, fish, and frogs: a mini-review. *Horm. Behav.* 40, 248–251.
- Incardona, J.P., Carls, M.G., Teraoka, H., Sloan, C.A., Collier, T.K., Scholz, N.L., 2005. Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development. *Environ. Health Perspect.* 113, 1755–1762.
- Incardona, J.P., Day, H.L., Collier, T.K., Scholz, N.L., 2006. Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217, 308–321.
- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A.P., Tyler, C.R., 2004. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat. Toxicol.* 66, 207–222.
- Jouanin, I., Debrauwer, L., Fauglas, G., Paris, A., Rathahao, E., 2002. Adduction of catechol estrogens to nucleosides. *Steroids* 67, 1091–1099.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211.
- Lajmanovich, R.C., Cabagna, M., Peltzer, P.M., Stringhini, G.A., Attademo, A.M., 2005. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 587, 67–72.
- Machella, N., Regoli, F., Cambria, A., Santella, R.M., 2004. Oxidative damage to DNA: an immunohistochemical approach for detection of 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosine in marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 58, 725–729.
- Matthiessen, P., Law, R.J., 2002. Contaminants and their effects on estuarine and coastal organisms in the United Kingdom in the late twentieth century. *Environ. Pollut.* 120, 739–757.
- Miller, D.H., Ankley, G.T., 2004. Modeling impacts on populations: fat-head minnow (*Pimephales promelas*) exposure to the endocrine disruptor 17[beta]-trenbolone as a case study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 1–9.
- Nasci, C., Da Ros, L., Campesan, G., Van Vleet, E.S., Salizzato, M., Spemi, L., Pavoni, B., 1999. Clam transplantation and stress-related biomarkers as useful tools for assessing water quality in coastal environments. *Mar. Pollut. Bull.* 39, 255–260.
- Neuparth, T., Bickham, J.W., Theodorakis, C.W., Costa, F.O., Costa, M.H., 2006. Endosulfan-induced genotoxicity detected in the gilthead seabream, *Sparus aurata* L., by means of flow cytometry and micronuclei assays. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76, 242–248.
- Ogawa, T., Higashi, S., Kawarada, Y., Mizumoto, R., 1995. Role of reactive oxygen in synthetic estrogen induction of hepatocellular carcinomas in rats and preventive effect of vitamins. *Carcinogenesis* 16, 831–836.
- Papoulias, D.M., Noltie, D.B., Tillitt, D.E., 2000. An *in vivo* model fish system to test chemical effects on sexual differentiation and development: exposure to ethinyl estradiol. *Aquat. Toxicol.* 48, 37–50.
- Penning, T.M., 1993. Dihydrodiol dehydrogenase and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism. *Chem. Biol. Interact.* 89, 1–34.
- Pillai, M.C., Vines, C.A., Wikramanayake, A.H., Cherr, G.N., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons disrupt axial development in sea urchin embryos through a [beta]-catenin dependent pathway. *Toxicology* 186, 93–108.
- Porte, C., Janer, G., Lorusso, L.C., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., Fossi, M.C., Canesi, L., 2006. Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 143, 303–315.
- Quiniou, F., His, E., Delesmont, R., Caisey, X., 2005. Bio-indicateurs de la toxicité potentielle de milieux aqueux: bio-essai “développement embryolaire de bivalve”, Méthodes d’analyse en milieu marin. Ed. Ifremer. 24 p.
- Shahidul Islam, M., Tanaka, M., 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 624–649.
- Shimomura, M., Higashi, S., Mizumoto, R., 1992. 32P-postlabeling analysis of DNA adducts in rats during estrogen-induced hepatocarcinogenesis and effect of tamoxifen on DNA adduct level. *J. Cancer Res.* 83, 438–444.
- Siddique, Y.H., Beg, T., Afzal, M., 2005. Genotoxic potential of ethinylestradiol in cultured mammalian cells. *Chem. Biol. Interact.* 151, 133–141.
- Singh, N.D., Sharma, A.K., Dwivedi, P., Patil, R.D., Kumar, M. Citrinin and endosulfan induced maternal toxicity in pregnant Wistar rats: pathomorphological study. *J. Appl. Toxicol.*, in press.
- Sjölin, A.M., Livingstone, D.R., 1997. Redox cycling of aromatic hydrocarbon quinones catalysed by digestive gland microsomes of the common mussel (*Mytilus edulis* L.). *Aquat. Toxicol.* 38, 83–99.
- Sohn, H.-Y., Kwon, C.-S., Kwon, G.-S., Lee, J.-B., Kim, E., 2004. Induction of oxidative stress by endosulfan and protective effect of lipid-soluble antioxidants.

- idants against endosulfan-induced oxidative damage. *Toxicol. Lett.* 151, 357–365.
- Stack, D.E., Byun, J., Gross, M.L., Rogan, E.G., Cavalieri, E.L., 1996. Molecular characteristics of catechol estrogen quinones in reactions with deoxyribonucleosides. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 851–859.
- Stack, D.E., Cavalieri, E.L., Rogan, E.G., 1998. Catecholestrogens as procarcinogens: depurinating adducts and tumor initiation. *Adv. Pharmacol.* 42, 833–836.
- Taban, I.C., Bechmann, R.K., Torgrimsen, S., Baussant, T., Sanni, S., 2004. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay. *Mar. Environ. Res.* 58, 701–705.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Wassenberg, D.M., Di Giulio, R.T., 2004. Synergistic embryotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon aryl hydrocarbon receptor agonists with Cytochrome P4501A inhibitors in *Fundulus heteroclitus*. *Environ. Health Perspect.* 112, 1658–1664.
- Wellejus, A., Bornholdt, J., Vogel, U.B., Risom, L., Wiger, R., Loft, S., 2004. Cell-specific oxidative DNA damage induced by estrogen in rat testicular cells in vitro. *Toxicol. Lett.* 150, 317–323.
- Wellejus, A., Loft, S., 2002. Receptor-mediated ethinylestradiol-induced oxidative DNA damage in rat testicular cells. *FASEB J.* 16, 195–201.
- Wells, P.G., Kim, P.M., Laposo, R.R., Nicol, C.J., Parmana, T., Winn, L.M., 1997. Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 396, 65–78.
- Xue, W., Warshawsky, D., 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206, 73–93.
- Yager, J.D., 2000. Chapter 3: Endogenous Estrogens as Carcinogens Through Metabolic Activation. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 27, 67–73.
- Zhou, B., Liu, W., Siu, W.H.L., O'Toole, D., Lam, P.K.S., Wu, R.S.S., 2006. Exposure of spermatozoa to duroquinone may impair reproduction of the common carp (*Cyprinus carpio*) through oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 77, 136–142.

Nouveau chapitre de la thèse 2009



Association Bernard Gregory
www.abg.asso.fr



*Valorisation des compétences des docteurs
«un nouveau chapitre de la thèse ®»*

Nathalie Wessel

Université de Nantes Ecole doctorale VENAM

(Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer)

Organisme de rattachement : Ifremer

Mentor : Mme Sophie Bellec

Les hydrocarbures : leur devenir et leurs effets toxiques sur l'ADN de la sole



Présentation orale : le 9 juillet 2009

Sujet académique de la thèse : Etude des voies de bioactivation des hydrocarbures aromatiques polycycliques chez la sole commune (*Solea solea*) : profil métabolique et génotoxicité.

Directeur de thèse : Dr Thierry Burgeot

Co-directeur de thèse : Dr Richard Cosson

Responsable scientifique : Dr Farida Akcha

Date probable de soutenance de la thèse : Décembre 2009

1. Cadre général et enjeux de la thèse

1.1 Présentation

Le sujet de ma thèse porte sur l'identification des voies de transformation de certains hydrocarbures et sur l'étude de leurs effets génotoxiques. De nos jours, la pression anthropique sur le milieu marin est forte, tout particulièrement pour les milieux côtiers et estuariens, qui sont la zone principale de déversement de nombreux polluants chimiques. Avec plus de mille nouvelles substances chimiques synthétisées par an, et la production à grande échelle de plus de 30 000 polluants, notre environnement est en danger constant. Ces substances engendrent des effets irréversibles sur les organismes vivants, de l'échelle moléculaire à celle de l'écosystème, induisant un impact non négligeable sur la dynamique des populations (Cf schéma 1). Il est donc nécessaire de connaître ces effets afin de mieux appréhender les dégâts causés par l'Homme au sein de son environnement.

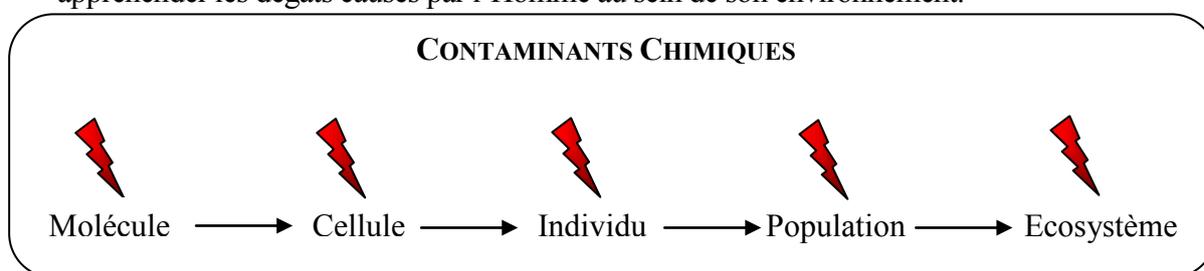


Schéma 1 : Effet en chaîne des polluants chimiques à différentes échelles.

Parmi les polluants chimiques retrouvés dans le milieu marin se trouvent la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), connus pour leur pouvoir mutagène, génotoxique et cancérigène. Ces molécules, dont les concentrations sont en constante augmentation dans certaines zones comme la baie de Seine, sont très peu solubles dans l'eau. Une fois dans le milieu marin, elles vont donc se fixer sur les particules en suspension, et ainsi être ingéré par les organismes marins. Après ingestion, du fait de leur hydrophobie, ces molécules ne pourront être excrétées dans leur forme initiale. Elles sont donc transformées en molécules hydrosolubles pouvant être excrétées par voies biliaire et urinaire. C'est au cours de cette transformation que des molécules intermédiaires, les métabolites, sont formées dont certaines sont réactives et vont altérer l'ADN (= génotoxicité). On parle alors de bioactivation. Certains mécanismes de réparation existent mais lorsqu'ils sont incomplets, ils conduisent à des perturbations physiologiques, ou à des mutations au sein de l'ADN, pouvant mener à des cancers, et à la mort de l'organisme.

Dans ce contexte, il est apparu nécessaire d'évaluer les risques que représentent ces molécules pour la santé de la flore et de la faune marines, et pour cela d'étudier leur devenir et leurs effets chez les organismes marins. Les origines de la présence des HAP dans l'environnement sont multiples. Naturellement présents dans les combustibles fossiles, ils sont formés lors de combustions incomplètes (éruptions, feux de forêts). Ils sont également synthétisés par les plantes, les bactéries et les algues. Leur présence dans l'environnement résulte principalement des activités anthropiques : raffinage du pétrole, utilisation du goudron, du charbon, du kérosène, revêtements routiers, fumée de cigarette, huiles moteur, carburants...

Parmi les nombreux HAP existants, deux ont été sélectionnés dans le cadre de ce projet :

- le benzo[a]pyrene (BaP) qui est un contaminant génotoxique modèle. Ses mécanismes de bioactivation ainsi que ces effets sont bien connus chez les vertébrés supérieurs.
- le fluoranthène (Fluo) qui est un des HAP les plus abondants dans le milieu marin, et dans l'alimentation humaine. Cependant, ses mécanismes de bioactivation sont nettement moins bien connus et ses effets sont assez controversés.

La sole commune (*Solea solea*) a été choisie comme espèce d'étude principalement car c'est une espèce particulièrement sensible à la pollution chimique. En effet, la sole mène un mode de vie benthique, c'est à dire qu'elle vit sur le fond, elle est donc constamment au contact des sédiments emprisonnant de nombreux polluants. De plus, les zones de nurserie de cette espèce se situent en milieu côtier et estuarien, zones principales de déversement des polluants. Son cycle de vie étant bien connu, il est possible de réaliser des expérimentations en milieu contrôlé. Enfin, c'est une espèce fortement consommée, représentant un intérêt économique non négligeable.

Le but de ma thèse est donc d'étudier le devenir et les effets génotoxiques du BaP et du Fluo chez la sole.

Ce travail s'articule donc autour de deux axes :

Caractériser les métabolites produits au cours de la bioactivation des HAP

Identifier les métabolites responsables des dommages à l'ADN

Afin d'étudier la métabolisation des HAP, des expositions ont été réalisées *in vitro* sur des microsomes de sole, qui sont des fractions cellulaires contenant les enzymes de transformation des HAP. Pour l'étude des effets génotoxiques induits par les HAP, des expositions *in vitro* de cellules de foies de soles, appelées hépatocytes, ont été réalisées, ainsi que des expositions de soles *in vivo* par l'utilisation de granulés contaminés artificiellement.

Cette thèse s'inscrit dans le programme Sole Bémol, qui a pour but d'étudier et de modéliser les effets de différents contaminants chimiques sur la croissance et la reproduction des juvéniles de sole. Les résultats obtenus au cours de ma thèse seront intégrés à ce modèle.

1.2 Contexte de la thèse

J'ai effectué cette thèse au laboratoire d'écotoxicologie du centre Ifremer de Nantes. Ce centre compte environ 200 personnes, travaillant dans des domaines variés (Ecotoxicologie, Biogéochimie, Halieutique, Microbiologie...). Les principaux axes de recherche du laboratoire visent à étudier le stress environnemental issu des perturbations chimiques chroniques sur les organismes marins (phytoplancton, mollusques bivalves, poissons...), de l'échelle moléculaire à l'échelle physiologique.

Durant ma thèse, ce laboratoire comprenait trois chercheurs titulaires, un chercheur contractuel, et un technicien titulaire. Chaque année, plusieurs stagiaires et CDD (post-doc,

techniciens) ont également activement participé aux activités de recherche du laboratoire. Ma thèse a été dirigée par le Dr. Thierry Burgeot, directeur du laboratoire, co-dirigée par le Dr Richard Cosson, chercheur au laboratoire Mer, Molécules, Santé, et le Dr Farida Akcha, chercheur titulaire au laboratoire d'écotoxicologie, en a été l'encadrante principale et la responsable scientifique.

De nombreuses collaborations scientifiques sont mises en œuvre au sein du laboratoire. Dans le cadre de ma thèse, j'ai eu l'occasion de collaborer avec le laboratoire de physico et toxico-chimie de l'Université de Bordeaux 1, ainsi qu'avec l'Unité Mixte de Recherche « Xénobiotiques » de l'INRA, basée à Toulouse. Afin d'acquérir de nouvelles techniques scientifiques, j'ai également été amenée à travailler avec le laboratoire d'optimisation des régulations physiologiques de l'Université de Bretagne Occidentale de Brest. Une dizaine d'équipes françaises issues de diverses unités de recherche (Ifremer, CNRS, INRA, Universités) sont impliquées dans le cadre du programme Sole Bémol.

1.3 Mon implication dans ce contexte

Etant depuis toujours très attirée par l'environnement marin, il m'est apparu évident de travailler dans ce domaine. De plus, je souhaitais effectuer un travail alliant de nombreux aspects, comme les études de terrain, le travail en laboratoire et la communication. J'ai donc choisi naturellement la voie de la recherche. Au cours de mes études, après un DEUG de biologie à l'université de Nantes, je me suis spécialisée dans le milieu marin. J'ai pour cela effectué une licence de biologie des organismes, suivie d'un master Sciences de la mer et du littoral, mention sciences biologiques marines, à l'Université de Bretagne Occidentale (UBO) de Brest. L'avenir de notre environnement me préoccupant, j'ai décidé de me spécialiser en écotoxicologie. C'est au cours de stages de licence et Master 1, effectués au Laboratoire de l'Environnement Marin (LEMAR) de l'UBO de Brest que j'ai acquis les bases de la recherche. J'ai ensuite effectué mon stage de Master 2 au laboratoire d'Ecotoxicologie de l'Ifremer, sachant qu'un projet de thèse était en cours, bien que la bourse n'ait pas encore été accordée. Je n'ai donc pas eu l'occasion de contribuer à l'élaboration du sujet initial de la thèse. Cependant, durant les trois années de thèse, mes encadrants et moi-même avons régulièrement organisé des réunions afin de faire le bilan des avancées et de recadrer éventuellement les objectifs. Tout au cours de ma thèse, mon encadrante m'a fortement épaulée, tout en me laissant une liberté de décision et d'action nécessaires.

2. Déroulement, gestion et coût du projet

2.1 Préparation et cadrage du projet

Le sujet de ma thèse a été élaboré par le Dr. Farida Akcha. Des compétences en chimie étaient nécessaires pour le dosage des métabolites. Le laboratoire de physico et toxico-chimie de l'université de Bordeaux 1 possède des compétences de haut niveau dans ce domaine, et a

récemment développé de nouvelles méthodes de haute précision permettant ce dosage. Une collaboration a donc été établie avec cette équipe. Il était initialement prévu que je sois accueillie dans ce laboratoire pendant plusieurs mois. Afin de pouvoir avancer sur plusieurs parties de ma thèse en même temps, il est apparu plus judicieux que j'y passe seulement quelques jours et que le reste de notre collaboration se fasse ensuite par échanges de matériels et données.

Afin de pouvoir identifier la totalité des métabolites de HAP formés, nous avons prévu des expositions aux contaminants radio-marqués. Pour cela, le laboratoire ne possédait ni les compétences scientifiques, ni les installations nécessaires à la manipulation de radio-éléments. Une collaboration a donc été initiée avec l'UMR xénobiotiques de l'INRA de Toulouse. Cette équipe dispose du plateau technique nécessaire à la réalisation de ce travail, ainsi que les compétences en chimie analytique. J'ai donc été accueillie durant trois semaines dans ce laboratoire.

Concernant la caractérisation des adduits (molécules formées par la liaison de métabolites avec l'ADN) à l'ADN, la méthode étant en cours de développement à l'UMR xénobiotiques de l'INRA de Toulouse, nous avons donc du mettre en place une nouvelle collaboration avec le laboratoire « lésions des acides nucléiques » du CEA de Grenoble. Afin d'obtenir des premiers résultats quantitatifs sur l'éventuelle formation de ces adduits suite à des expositions aux HAP, nous avons également fait appel à la société ADn'Tox du Groupe Régional d'Etudes sur le Cancer, à Caen dans le cadre d'un contrat de prestation de services.

Parmi les expérimentations réalisées au cours de ma thèse, je devais effectuer des cultures de cellules de foie de sole. Les techniques permettant d'isoler ces cellules et de les mettre en culture n'étaient pas acquises au laboratoire. J'ai donc été accueillie, avec mon encadrante, pendant 3 jours au laboratoire d'optimisation des régulations physiologiques de l'Université de Bretagne Occidentale de Brest, afin d'apprendre ces techniques. A la suite de cette collaboration, j'ai rédigé une publication scientifique.

2.2 Conduite du Projet

Au cours de ces trois années, des réunions semestrielles ont été organisées avec les différentes équipes impliquées dans ce projet. J'ai réalisé des bilans mensuels avec mon encadrante. Ces réunions et entretiens ont permis de recadrer et planifier mon travail au fur et à mesure des avancements. Le planning du déroulement de ma thèse est résumé dans le tableau 1 ci-dessous.

Etapes	Année 1		Année 2		Année 3	
	Semestre 1	Semestre 2	Semestre 1	Semestre 2	Semestre 1	Semestre 2
Mise au point de la méthode de dosage d'une base oxydée de l'ADN	X					
Exposition <i>in vitro</i> de microsomes de sole pour l'analyse des métabolites formés	X LPTC	X LPTC / INRA	X LPTC / INRA			
Exposition <i>in vitro</i> d'hépatocytes de soles; mesure des dommages à l'ADN		X UBO		X		X
Exposition <i>in vivo</i> de soles; mesure des dommages à l'ADN		X	X	X	X	X
Exposition <i>in vitro</i> de microsomes de sole pour l'analyse des adduits à l'ADN formés					X GRECAN / LAN	X GRECAN / LAN
Analyse des échantillons		X	X	X	X	X
Bibliographie	X	X	X	X	X	X
Rédaction de publications scientifiques		X			X	X
Rédaction du manuscrit						X

Tableau 1 : conduite du projet durant les trois années de thèse, et collaboration effectuées (LPTC : Laboratoire de Physico-ToxicoChimie de l'Université de Bordeaux 1 ; INRA : UMR xénobiotiques de l'INRA de Toulouse ; UBO : laboratoire d'optimisation des régulations physiologiques de l'Université de Bretagne Occidentale de Brest ; GRECAN : Groupe régional d'études sur le cancer ; LAN : Laboratoire « lésions des acides nucléiques »).

Au vu des résultats obtenus au cours de mes travaux, j'ai rédigé plusieurs publications qui seront soumises dans des revues internationales à comité de lecture. De plus, j'ai eu l'occasion de participer activement à plusieurs congrès nationaux ou internationaux :

- octobre 2006 : Union des océanographes de France, Nantes, France : Présentation orale
- septembre 2007 : 34th aquatic toxicity workshop, Halifax, Canada: Présentation orale
- mai 2008: European meeting of the Society of EcoToxicology And Chemistry, Varsovie, Pologne: Poster
- mai 2009 : 15th Primary Response in Marine Organisms, Bordeaux, France : Présentation orale et poster
- juin 2009 : ECOBIM, Anse Saint Jean, Quebec : Présentation orale

– septembre 2009 : 22th Meeting of the International Society for Polycyclic Aromatic Compounds, Charleston, SC, USA: presentation orale

2.3 Evaluation et prise en charge du coût du projet

Cette thèse a été cofinancée par l'Ifremer et par la région « Pays de la Loire ». Le programme Sole BEMol qui a participé à l'achat de fournitures de laboratoire est quant à lui financé par l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR). Le coût de ma thèse est résumé dans le tableau 2 ci-après. Parmi les analyses réalisées, certaines font appel à la biologie moléculaire, nécessitant l'achat de réactifs coûteux, c'est pourquoi les frais liés à l'achat de fournitures expérimentales sont élevés. Durant ma thèse, j'ai du passé trois semaines à Toulouse. De plus, les expérimentations *in vivo* se sont déroulées à Brest. Je devais donc y aller régulièrement pour effectuer mes prélèvements. Ceci explique le coût élevé des frais de mission en France.

Tableau 2 : Evaluation du coût de ma thèse

Nature de la dépense	Détails *		Coûts totaux (euros TTC)			
			Nombre d'unités	Coût unitaire moyen	Quote-part utilisation	Total
1	Ressources Humaines					
1.1	Doctorant	Salaire brut Charges	36	1675	100	60300
1.2	Encadrant 1	Salaire brut Charges	36	6788	1%	2443.68
1.3	Prime Encadrement					
1.4	Encadrant 2	Salaire brut Charges	36	4967	15%	26821.8
1.5	Prime Encadrement					
1.6	Autre personnel (hors sous-traitance)	Salaire brut Charges	36	4967	0.5%	894.06
1.7	Sous-traitance		1	5298.7	90%	4768.83
	Sous-total Ressources Humaines					95228.37
2	Consommables					
2.1	Fournitures expérimentales			25624	100	25624
2.2	Fournitures de bureau					
2.3	Autres achats			6217	100	6217
	Sous-total Consommables					31840
3	Infrastructures					
3.1	Entretien, gardiennage, secrétariat		36	117.25	100	4221
3.2	Loyers des locaux	Loyer brut Charges locatives	36	603	100	21708
3.3	Electricité, eau, chauffage, ... (si non inclus dans les charges locatives)		36	268	100	9648
3.4	Autres					
	Sous-total Infrastructures					
4	Matériel (amortissements)					
4.1	Matériel d'expérimentation (dont les ordinateurs et logiciels spécialisés)	Taux d'amortissement 6 mois (1/6)	1	3040	30%	152
4.2	Ordinateur de bureau	Taux d'amortissement	1	158	100	158
4.3	Logiciels de bureau	Taux d'amortissement				
4.4	Autre	Taux d'amortissement				
	Sous-total Matériel					310
5	Déplacements					
5.1	Missions en France	Transport Hébergement + autres frais		3145	100%	3145
5.2	Missions à l'étranger	Transport Hébergement + autres frais				
5.3	Congrès en France	Transport Hébergement + autres frais	1	543.25	100%	543.25
5.4	Congrès à l'étranger	Transport Hébergement + autres frais	3	1875.9	100%	5627.68
	Sous-total Déplacements					9315.93
6	Formation					
6.1	Formations		10	179.7	100	1797
6.2	Autres frais (Inscription à l'Université, Sécurité Sociale étudiante, etc.)		4	350	100	1400
	Sous-total Formation					3197
7	Documentation et communication					
7.1	Affranchissements, Internet, téléphone		36	67	100	2412
7.2	Publicité, communication, impressions	Direct Sous-traitance agence	3	100	100%	300
7.3	Documentation (périodiques, livres, bases de données, bibliothèque, etc.)					
7.4	Autres					
	Sous-total Documentation et communication					2712
8	Charges financières (intérêts des emprunts)					
	Sous-total Charges financières					
9	Charges exceptionnelles					
	Sous-total Charges exceptionnelles					
10	TOTAL					142604

3. Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles

3.1 Compétences scientifiques

Au cours de ma thèse, j'ai pu acquérir un panel de compétences scientifiques dans différents domaines :

– Laboratoire : échantillonnage *in vivo*, dissections, mise en place d'expérimentations *in vitro*, extractions et expositions de microsomes, isolation, mise en culture et expositions d'hépatocytes de soles, dosage de protéines, mesure de l'activité d'une enzyme, l'EROD, mesure du niveau de cassures de brins de l'ADN (Test des Comètes), mise au point de la mesure d'une base oxydée de l'ADN (HPLC/UV/ECD). Pour cela, j'ai acquis ou approfondi des connaissances sur l'utilisation d'appareillages spécifiques tels que l'HPLC, la radio-HPLC, la hotte à flux laminaire, l'ultracentrifugeuse, le microscope à fluorescence...

– Terrain : j'ai eu l'occasion de participer à plusieurs campagnes de prélèvement *in situ*, durant lesquelles de nombreux prélèvements étaient effectués pour différentes équipes. Pour cela j'ai embarqué durant plusieurs jours sur un navire scientifique.

– Traitement des données : utilisation de logiciels de statistiques (Statistica, Statgraphics) et tableurs (Excel, Graphpad), traitement et interprétation des données.

– Communication : rédaction de publications scientifiques en anglais, présentations de communications orales et par poster lors de congrès nationaux et internationaux, présentation de l'avancement de mes travaux lors de réunions organisées entre les différentes équipes impliquées dans ma thèse ou entre les différents partenaires impliqués dans le programme Sole Bémol. De plus, j'ai rédigé chaque année un rapport succinct d'avancement de mes travaux. L'aspect communication de ma thèse a également été une compétence personnelle que j'ai su mettre à profit dans le cadre des nombreux échanges.

3.2 Compétences transversales

Etant dans un laboratoire à effectif réduit et en surcharge de travail, j'ai été autonome et j'ai géré mon temps et la planification de mes expérimentations en laboratoire. J'ai activement participé à l'organisation du laboratoire en termes de gestion des stocks, commandes, gestion de la propreté et du rangement du laboratoire.

Ma thèse faisant partie d'un programme de recherche impliquant une trentaine de personnes, le travail d'équipe a été important. De plus, étant donné les nombreuses collaborations effectuées, j'ai su m'adapter à chaque équipe, malgré les différences de fonctionnement. J'ai donc eu l'occasion de participer au montage et au fonctionnement d'un réseau scientifique.

Travaillant au niveau moléculaire, j'ai dû faire preuve d'une rigueur technique lors de mes expérimentations. Ma rigueur scientifique a également été un atout lors de l'interprétation des

résultats que j'ai obtenu au cours de ma thèse. Mes capacités de communication m'ont permis de valoriser au mieux les résultats obtenus.

Face à un problème que je ne pouvais résoudre seule, mes capacités relationnelles m'ont toujours permis de trouver l'aide nécessaire afin de trouver une solution adaptée. Cela m'a parfois amenée à contacter des chercheurs français ou étrangers, et m'a permis d'élargir mon réseau de connaissances (exemple : difficulté d'utilisation et de stockage de composés instables). Cela m'a notamment permis d'obtenir une bourse de la part d'un laboratoire québécois pour venir participer à un colloque au Québec.

J'ai également participé à l'encadrement de cinq stagiaires de différents niveaux (apprentissage de techniques analytiques, aide au traitement statistique des données, à la rédaction de rapports, et à la préparation d'oraux). J'ai pour cela mis en avant mes capacités pédagogiques.

4. Résultats et impacts de ma thèse

4.1 Impacts professionnels

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis d'acquérir une meilleure connaissance du devenir des HAP, une fois absorbés par les poissons marins. Les effets engendrés proviennent des métabolites formés. Les dosages de certains des métabolites formés ont permis de quantifier leur importance relative. De plus, des expositions spécifiques à plusieurs de ces métabolites ont permis de démontrer *in vitro* le pouvoir génotoxique de chacun. Le BaP, connu pour être l'un des HAP ayant le plus fort pouvoir génotoxique, est régulièrement utilisé comme traceur dans le milieu marin et dans l'alimentation humaine, alors que la fluoranthène est présent en quantité plus importante. Les résultats de ma thèse ont permis de démontrer que le fluoranthène possède également un pouvoir génotoxique, lorsque les expositions sont effectuées à des concentrations plus importantes que le BaP. Il serait donc judicieux de combiner les dosages de ces deux HAP, et de leurs métabolites respectifs afin d'évaluer l'impact génotoxique du milieu ou de l'alimentation.

4.2 Impacts personnels

Cette thèse m'a permis d'acquérir de nombreuses compétences scientifiques et personnelles. Le cadre particulièrement propice de ma thèse m'a permis de m'épanouir dans mon environnement professionnel, et de me positionner aujourd'hui non plus en tant qu'étudiante, mais en tant que jeune chercheuse.

Les collaborations auxquelles j'ai participé m'ont donné une vision objective de la recherche publique en France, et ont conforté mon désir d'obtenir un poste de chercheur dans le domaine public ou mixte. Pour cela, je souhaiterais donc effectuer au moins un post-doctorat en France ou à l'étranger, afin d'acquérir de nouvelles compétences, et pouvoir prétendre à un

poste de chercheur dans un laboratoire public par la suite. Cependant, d'autres pistes professionnelles telles que les associations à but non lucratif telles que le Centre de Documentation, de Recherche et d'Expérimentations sur les Pollutions Accidentelles des Eaux (CEDRE) sont envisageables.

Enfin, j'envisage l'éventualité de créer ma propre entreprise de prestation de services en analyses ayant attrait à l'écotoxicologie. Pour cela, il est donc également indispensable que j'effectue des séjours dans plusieurs laboratoires afin de développer au maximum mon panel de compétences. De plus, ces expériences pourront me permettre d'accroître mon réseau de connaissances.

Etude des voies de bioactivation du benzo[a]pyrène et du fluoranthène chez la sole commune (*solea solea*) : profil métabolique et génotoxicité

Cette thèse avait pour but d'étudier la biotransformation et les effets génotoxiques de deux HAP d'intérêt, le benzo[a]pyrène (BaP) et le fluoranthène (Fluo), chez la sole commune *Solea solea* qui est une espèce benthique sensible à la pollution chimique. L'utilisation de modèles *in vitro*, et l'application de différentes techniques de chimie analytique ont permis de démontrer que, comme chez les vertébrés supérieurs, les dihydrodiols et les phénols sont les métabolites du BaP et du Fluo formés majoritairement par les enzymes hépatiques de soles. *In vitro*, le potentiel génotoxique du BaP et du Fluo a été démontré chez la sole, par la production d'adduits et de dommages oxydatifs à l'ADN. Le Fluo présente une génotoxicité 50 fois plus faible que celle du BaP. Dans le cas du BaP, trois adduits formés chez la sole après activation microsomale ont pu être caractérisés par spectrométrie de masse. Comme chez les vertébrés supérieurs, les adduits formés sont issus de la voie d'activation des diol-époxydes. Les effets génotoxiques d'un mélange équimolaire de HAP (BaP, Fluo, Pyr) ont été confirmés *in vivo*, à l'échelle de l'organisme. Une corrélation a été observée entre le niveau de métabolites biliaires de HAP et le niveau de dommages oxydatifs à l'ADN. Les résultats de cette thèse ont démontré la capacité des enzymes hépatiques de soles à métaboliser le BaP et le Fluo par des voies similaires à celles décrites chez les vertébrés supérieurs. En effet, leur métabolisation se fait par la production de métabolites électrophiles capables de se lier à l'ADN. Certains métabolites peuvent quant à eux générer des espèces réactives de l'oxygène responsables de dommages oxydatifs à l'ADN.

Mots clés : Écotoxicologie ; Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques ; *Solea solea* ; Métabolisme ; Génotoxicité

Study of the bioactivation pathways of benzo[a]pyrene and fluoranthene on the common sole (*solea solea*): metabolic profile and genotoxicity

The aim of this Ph'D was to study the biotransformation and the genotoxicity of two PAH of interest, namely the benzo[a]pyrene (BaP) and the fluoranthene (Fluo), in the common sole *Solea solea*, which is a benthic species sensitive to chemical pollution. The use of *in vitro* exposure models and the application of two different chemical analytical techniques allowed demonstrating that, as in higher vertebrates, the dihydrodiols and the phenols of BaP and Fluo are the major metabolites produced by sole liver enzymes. *In vitro*, the genotoxic potential of BaP and Fluo was demonstrated in sole, by the production of DNA adducts and oxidative DNA damage. The genotoxicity of Fluo appeared to be 50 fold less important than the genotoxicity of BaP. In the case of BaP, three adducts produced in sole following microsomal activation have been identified by mass spectrometry. As in higher vertebrates, these adducts are produced through the diol-epoxide activation pathway. The genotoxicity of an equimolar mixture of PAHs (BaP, Fluo, Pyr) was confirmed *in vivo* at the individual scale. A correlation was observed between the level of biliary PAH metabolites and the level of oxidative DNA damage. These results showed the ability of sole liver enzymes to metabolise the BaP and the Fluo through similar pathways to those described in higher vertebrates. Indeed, their *in vitro* and *in vivo* metabolisation occurs through the production of electrophilic metabolites, able to bind to DNA. Several metabolites are able to generate reactive oxygen species causing oxidative DNA damage.

Keywords: Ecotoxicology, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Solea solea*, Metabolism, Genotoxicity

Discipline : physiologie, biologie des organismes, populations, interactions

N° :
(Ne rien inscrire, attribué par la bibliothèque)