

N° d'ordre : 2186

# THESE

Présentée à

## L'UNIVERSITE BORDEAUX I

Par **Farida AKCHA**

Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR

Spécialité : Ecotoxicologie

---

**ETUDE DE LA FORMATION D'ADDUITS ET DE 8-OXODGUO A  
L'ADN DE MOULE, *MYTILUS SP* : PERSPECTIVES D'UTILISATION  
DANS LE MILIEU MARIN EN TANT QUE BIOMARQUEURS DE  
GENOTOXICITE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES  
POLYCYCLIQUES**

---

Soutenue le 14 janvier 2000

Après avis de :

MM **A. Pfohl-Leszkowicz**, Professeur, ENSAT Toulouse  
**F. Leboulenger**, Professeur, Université du Havre

**Rapporteurs**

Devant la commission d'examen formée de :

MM **P. Garrigues**, Directeur de Recherches, Université de Bordeaux I  
**A. Pfohl-Leszkowicz**, Professeur, ENSAT Toulouse  
**F. Leboulenger**, Professeur, Université du Havre  
**J-F. Narbonne**, Professeur, Université de Bordeaux I  
**T. Burgeot**, Chercheur, IFREMER Nantes  
**L. D. Peters**, Chercheur, Plymouth Marine Laboratory, U. K.

**Président**  
**Rapporteur**  
**Rapporteur**  
**Examineurs**



## REMERCIEMENTS

A l'issu de ces trois années de thèse, je tiens tout d'abord à remercier l'**IFREMER** et la **Région Aquitaine** pour avoir financé ce projet.

Mes premiers remerciements vont également à **Thierry Burgeot** du Centre IFREMER de Nantes qui, malgré la distance qui nous séparait, a assuré l'encadrement de cette thèse en tant que responsable scientifique. Cela fait maintenant 6 ans que nous nous connaissons aussi j'espère vivement que l'aboutissement du travail effectué ensemble est à la hauteur de la confiance et de la sympathie que tu as exprimé à mon égard. Je suis également reconnaissante à **Hélène Budzinski** pour m'avoir proposé son aide au laboratoire et pour avoir toujours trouvé le temps et les mots pour me conseiller et me rassurer dans les moments difficiles. Nos petites péripéties de la mission BIOMAR IV resteront pour moi la meilleure illustration de la complicité que j'ai pu avoir avec toi au cours de ces années de thèse.

En tant que directeur de thèse et directeur du laboratoire, je remercie respectivement **Jean-François Narbonne** et **Philippe Garrigues** pour m'avoir donné les moyens de mener à bout ce projet et de m'avoir fait confiance en me permettant de présenter mes résultats au cours de congrès internationaux.

Je ne saurais oublier **Xavier Michel** en tant que co-initiateur de ce sujet de thèse ainsi que **Jean-Christophe Garcin**, **Pascal Mora**, **Patrice Ville** et **Christine Sandoz** qui m'ont proposé leur aide à mon arrivée au laboratoire. Merci également à **Marine**, **Christelle**, **Michèle**, **Philippe**, **Daniel**, **Liliane** et **Laurent** ainsi qu'à tous les membres du LPTC.

Depuis mon premier stage en 1992 au Centre IFREMER de Nantes, de nombreuses personnes ont contribué à l'aboutissement de ce projet professionnel. Parmi elles, je citerai **Albert Buatois**, toute l'équipe de la station marine d'Endoume et du Centre d'Océanologie de Marseille en particulier **Thérèse** et **Joël Le Campion**, **François Galgani**, **Christophe Minier**, ainsi que **Paola Venier**, **Annie Leszkowicz** et **Jean Cadet** pour leur participation directe à ce travail de thèse. Je ne saurais oublier le soutien de toute ma famille et de mes amis : **Karine**, **Virgile**, **Béatrice**, **Séverine**, **Elisa**, **Myriam**, **Alex**, **Christian**, ...

Cette thèse est dédiée à **mes parents** ainsi qu'à **Lomig** : « Tu as vécu cette thèse tout autant que moi à travers mes joies et mes moments de déprime. Mille mercis pour m'avoir soutenu !. A travers toi je remercie également les **équipages** des **NO L'Europe**, **Alkor** et **Georges Petit** : les missions en mer resteront toujours pour moi des moments inoubliables ».

## VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE

La majorité du travail effectué au cours de cette thèse a été publiée ou a fait l'objet de communications orales en langue anglaise au cours de congrès internationaux.

### Publications scientifiques:

F. Akcha, T. Burgeot, P. Venier, J-F. Narbonne (1999). Relationship between kinetics of benzo[a]pyrene bioaccumulation and DNA binding in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62 : 455-462.

F. Akcha, C. Izuel, P. Venier, H. Budzinski, T. Burgeot, J-F. Narbonne (1999). Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in B[a]P-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* (sous presse).

F. Akcha, S. Ruiz, C. Zamperon, P. Venier, T. Burgeot, J. Cadet, J-F. Narbonne. Benzo[a]pyrene-induced DNA damage in *Mytilus galloprovincialis*. Measurement of bulky DNA adducts and DNA oxidative damage in term of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Soumis pour publication dans Biomarkers*.

F. Akcha, T. Burgeot, A. Pfohl-Leszkowicz, H. Budzinski, J-F. Narbonne. Induction and elimination of bulky B[a]P-related DNA adducts and 8-oxodGuo in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed *in vivo* to B[a]P-contaminated feed. *Soumis pour publication dans Mar. Ecol. Progr. Ser.*

### Participation à des congrès internationaux:

- 1997 Présentation orale lors du Workshop BIOMAR III (17-20 avril, Ischia, Italy).  
F. Akcha, C. Clerandau, M. Daubèze, T. Burgeot, J-F Narbonne. Time-course of some biochemical markers in *Mytilus galloprovincialis* exposed in mesocosm to 3-methylcholantrene and triphenyltin.
- 1997 Poster présenté lors du Congrès de l' « International Society of Polycyclic Aromatic Compounds », ISPAC (4-8 novembre, Charlotte, USA).  
F. Akcha, T. Burgeot, P. Venier, J-F Narbonne. Relationship between kinetics of benzo[a]pyrene bioaccumulation and DNA binding in the mussel *Mytilus galloprovincialis*.
- 1998 Présentation orale lors du Congrès de la « Society of Environmental Toxicology and Chemistry », SETAC (14-18 avril, Bordeaux, France).  
F. Akcha, C. Izuel, P. Venier, H. Budzinski, T. Burgeot, J-F Narbonne. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in B[a]P-contaminated mussel, *Mytilus galloprovincialis*.
- 1999 Présentation orale lors du Congrès de l' « International Society of Polycyclic Aromatic Compounds », ISPAC (25-29 octobre, Bordeaux, France). Benzo[a]pyrene-induced DNA damage in *Mytilus galloprovincialis*: Formation and persistence of bulky DNA adducts and oxidative DNA damage relative to 8-oxodGuo.

# SOMMAIRE

<b>Introduction</b>	1
<b>PREMIERE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	5
<b>CHAPITRE 1 : Les adduits à l'ADN</b>	6
<i>Les différentes voies d'activation du Benzo[a]pyrène en adduits à l'ADN</i>	7
I. La voie des diol-époxydes	7
I.1. Activation du B[a]P en B[a]P diol-époxyde-10-N2dG	7
I.2. Adduits stables et adduits dépurinés	9
I.3. Les mécanismes de détoxication possibles des B[a]P diol-époxydes	10
II. La voie des O-quinones	10
II.1. La dihydrodiol-deshydrogénase	10
II.2. Toxicité des O-quinones	12
II.3. La formation de O-quinones est-elle une voie de détoxication des B[a]P diol-époxydes ?	12
III. La voie du radical cation	13
III.1. Les hypothèses de base de la voie du radical cation	13
III.2. Rôle du cytochrome P450 dans la voie du radical cation : études <i>in vitro</i>	14
III.3. La voie du radical cation <i>in vivo</i>	15
III.3.1 Synthèse d'adduits B[a]P modèles	
III.3.2. Résultats des investigations conduites <i>in vivo</i> sur la formation du radical cation	
IV. La voie des esters benzyliques du B[a]P	19
<i>Signification biologique des adduits à l'ADN</i>	21
I. Les étapes de la cancérogenèse chimique	21
II. Les «gènes de cancer »	22
II.1. Les proto-oncogènes	22
II.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs	23
III. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, inducteurs d'adduits à l'ADN	23
III.1. La formation d'adduits à l'ADN : événement clef de la mutagénicité et de la cancérogénicité des HAP	23
III.1.1 Mutagénicité des adduits B[a]P stables	
III.1.2. Mutagénicité des adduits B[a]P dépurinés	
III.2. Mutations engendrées par les adduits HAP dans les «gènes de cancer »	29
III.2.1 Le gène suppresseur de tumeurs, p53	29
III.2.2 Les oncogènes <i>ras</i>	30
<i>Les adduits à l'ADN : biomarqueur potentiel d'exposition et d'effets des HAP pour la biosurveillance de l'environnement marin</i>	32
I. Niveau de contamination du milieu marin et observation de cancer chez les organismes exposés	32
II. Les adduits à l'ADN chez les poissons	33
II.1. Les systèmes de biotransformation	33
II.2. Les résultats clefs des études de terrain et de laboratoire sur la mesure des adduits HAP chez les poissons	34

II.3. Persistance des adduits à l'ADN	34
III. Les adduits à l'ADN chez la moule : bilan des connaissances	36
III.1. Existence d'un cytochrome P450 chez <i>Mytilus sp</i>	36
III.1.1. Evidences biochimiques de l'existence d'un cytochrome P450 chez la moule	
III.1.2. Evidences moléculaires de gènes <i>CYP</i> chez la moule	
III.2. Métabolisme du B[a]P chez la moule	41
III.2.1. Métabolisme <i>in vitro</i>	
III.2.2. Métabolisme du B[a]P <i>in vivo</i>	
IV. La mesure des adduits à l'ADN chez <i>Mytilus sp</i> : bilan des connaissances	43
IV.1. Formation d'adduits à l'ADN <i>in vitro</i>	43
IV.2. Formation d'adduits à l'ADN <i>in vivo</i>	45
IV.3. Etudes <i>in situ</i>	45
<b>CHAPITRE 2 : Les dommages oxydatifs à l'ADN</b>	<b>49</b>
I. Les espèces réactives de l'oxygène	50
I.1. L'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ )	50
I.2. L'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ )	50
I.3. L'hydrogène peroxyde ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	52
I.4. Le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\cdot$ )	53
I.5. Les radicaux alkyles, $\text{R}^\cdot$ , alkoxydes, $\text{RO}^\cdot$ , peroxydes, $\text{ROO}^\cdot$ et les hydroperoxydes, $\text{ROOH}$	53
I.6. Le peroxydite, l'ozone et les oxydes d'azote	53
II. Les défenses antioxydantes	54
II.1. Les défenses antioxydantes non enzymatiques	54
II.1.1. Les vitamines A, C et E	
II.1.2. Le glutathion	
II.2. Les défenses antioxydantes enzymatiques	54
II.2.1. La superoxyde dismutase (SOD)	
II.2.2. La catalase (CAT)	
II.2.3. Les glutathion-péroxydases	
II.2.4. La DT-diaphorase (NAD(P)H :quinone oxydoréductase)	
III. Les dommages oxydatifs aux macromolécules cellulaires	56
III.1. Dommage aux lipides et aux protéines	56
III.2. Dommages à l'ADN	58
III.2.1. Réaction d' $\text{OH}^\cdot$ avec l'ADN	
III.2.2. Réaction de l'hydrogène peroxyde et de l'oxygène singulet avec l'ADN	
III.2.3. Mesure des bases oxydées	
III.3. Systèmes de réparation des bases oxydées de l'ADN	60
IV. Signification biologique des dommages oxydatifs à l'ADN	60
V. Mesure des bases oxydées chez les organismes marins : biomarqueur potentiel du stress oxydatif	63
VI. Bilan des connaissances chez <i>Mytilus sp</i>	63
VI.1. Production d'espèces réactives de l'oxygène chez la moule	63
VI.2. Induction de la production d'espèces réactives de l'oxygène <i>in vitro</i> chez la moule	64
VI.3. Production d'espèces réactives de l'oxygène <i>in vivo</i> chez la moule	66
<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE</b>	<b>70</b>

<b>DEUXIEME PARTIE : RESULTATS</b>	74
<b>CHAPITRE 1: Mise en place d'un système d'exposition par la voie trophique au benzo[a]pyrène pour l'espèce sentinelle, <i>Mytilus sp</i> et validation du modèle d'exposition pour l'étude de la formation d'adduits du B[a]P à l'ADN</b>	75
<i>Développement d'un système d'exposition par la voie trophique au B[a]P pour l'espèce sentinelle <i>Mytilus sp</i></i>	76
I. Principes de base du modèle d'exposition	76
II. Choix de la nourriture	77
II.1. Modèle d'exposition	78
II.2. Résultats	78
II.2.1. Analyse statistique	
II.2.2. Données brutes	
II.2.3. Interprétation des résultats	
<i>Validation du modèle d'exposition pour l'étude de la formation des adduits du B[a]P à l'ADN chez <i>Mytilus sp</i></i>	83
I. Objectifs du travail	83
II. Matériel et méthode	84
III. Résultats	84
<u>Article numéro 1</u>	87
F. Akcha, T. Burgeot, P. Venier, J-F. Narbonne (1999). Relationship between kinetics of benzo[a]pyrene bioaccumulation and DNA binding in the mussel <i>Mytilus galloprovincialis</i> . <i>Bull. Environ. Contam. Toxicol.</i> , 62 : 455-462.	
<b>CHAPITRE 2 : Mesure des adduits du B[a]P à l'ADN de glande digestive de moule par la technique de post-marquage au <sup>32</sup>P</b>	96
I. Objectifs	97
II. Matériel et méthode	97
III. Résultats	102
<u>Article numéro 2</u>	104
F. Akcha, C. Izuel, P. Venier, H. Budzinski, T. Burgeot, J-F. Narbonne (1999). Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in B[a]P-contaminated mussels, <i>Mytilus galloprovincialis</i> . <i>Aquat. Toxicol.</i> (sous presse).	
<b>CHAPITRE 3 : Induction de la 8-oxodGuo et d'adduits à l'ADN de branchies de moule après exposition au B[a]P: mesure par CLHP-DE et post-marquage au <sup>32</sup>P</b>	156

I. Objectifs du travail	157
II. Matériel et méthode	157
III. Résultats	157
<u>Article numéro 3</u>	160

F. Akcha, S. Ruiz, C. Zamperon, P. Venier, T. Burgeot, J. Cadet, J-F. Narbonne (1999). Benzo[a]pyrene-induced DNA damage in *Mytilus galloprovincialis*. Measurement of bulky DNA adducts and DNA oxidative damage in term of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Soumis pour publication dans Biomarkers*.

**CHAPITRE 4 : Cinétique de formation et d'élimination des adduits du B[a]P à l'ADN et de la 8-oxodGuo** 192

I. Objectifs	193
I. Matériel et méthodes	193
II. Résultats	193
<u>Article numéro 4</u>	195

F. Akcha, T. Burgeot, A. Pfohl-Leszkowicz, H. Budzinski, J-F. Narbonne (1999). Induction and elimination of bulky B[a]P-related DNA adducts and 8-oxodGuo in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed *in vivo* to B[a]P-contaminated feed. *Soumis pour publication dans Marine Ecology Progress Series*.

**CHAPITRE 5 : Etudes de terrain en Méditerranée 1) Mesure de la 8-oxodGuo dans les branchies de *Mytilus galloprovincialis* (BIOMAR) 2) Mesure des adduits à l'ADN de branchies de *Mytilus galloprovincialis* (RINBIO)** 229

***Mission BIOMAR IV (3-31 mars 1998). Mesure du niveau de 8-oxodGuo à l'ADN de branchies de moules collectées au cours de la mission BIOMAR*** 230

I. Objectifs généraux du programme BIOMAR	230
II. Présentation des sites d'échantillonnage	230
III. Matériel et Méthodes	230
IV. Résultats	235
IV.1. Comparaison des niveaux de 8-oxodGuo des différents sites d'échantillonnage	235
IV.2. Réponse des différents biomarqueurs	236
V. Discussion	238

***Mission RINBIO 1998. Mesure des adduits à l'ADN de branchies de *Mytilus galloprovincialis**** 240

I. Objectifs généraux du programme Rinbio	240
II. Présentation des sites d'échantillonnage étudiés	240
III. Matériel et méthodes	240
IV. Résultats	243
III.1. Résultats des dosages chimiques	243
III.2. Dosage des adduits stables à l'ADN par la méthode de post-marquage au <sup>32</sup> P	243



III.2.1. Analyse qualitative	
III.2.2. Analyse quantitative	
V. Discussion	248
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	250
<b>LISTE DES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	256
<b>Annexe I :</b> La technique de post-marquage au $^{32}\text{P}$	284
<b>Annexe II :</b> Dosage de la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo)	293
<b>Annexe III :</b> Mise au point d'un protocole d'« Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction » (AP-PCR) pour l'espèce sentinelle <i>Mytilus sp.</i> Perspectives d'utilisation en biosurveillance de l'environnement marin	304
<b>Annexe IV :</b> Mesure des dommages oxydatifs à l'ADN via l'utilisation des enzymes de réparation de l'ADN	311

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>3-MC :</b>	3-méthylcholanthrène
<b>8-oxodGuo :</b>	8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine
<b>AChE :</b>	Acetylthiocholine estérase
<b>AGPI :</b>	Acide gras polyinsaturé
<b>AHCH :</b>	Alpha hexachloro-cyclohexane
<b>B[a]P :</b>	Benzo[a]pyrène
<b>BPDE :</b>	Benzo[a]pyrène diol-époxyde
<b>BPH :</b>	Benzo[a]pyrène hydroxylase
<b>BPQ :</b>	Benzo[a]pyrène-7,8-dione
<b>CAT :</b>	Catalase
<b>CG :</b>	Chromatographie gazeuse
<b>CLHP :</b>	Chromatographie liquide haute performance
<b>CYP :</b>	cytochrome (gène)
<b>CYP :</b>	cytochrome (protéine)
<b>DD :</b>	Dihydrodiol deshydrogénase
<b>DDD :</b>	Dichloro-diphényle-dichloroéthane
<b>DDT :</b>	Dichloro-diphényle-trichloroéthane
<b>DE :</b>	Détection électrochimique
<b>DRZ :</b>	« Diagonal radioactive zone »
<b>DTD :</b>	DT-diaphorase
<b>EH :</b>	Epoxyde hydrolase
<b>ERO :</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>GST :</b>	Glutathion-S-transférase
<b>HAP :</b>	Hydrocarbure aromatique polycyclique
<b>Kb :</b>	kilobase
<b>KDa :</b>	kilodalton
<b>MDA :</b>	Malondialdéhyde
<b>MFO :</b>	« Mixed function oxidase »
<b>NADH :</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
<b>NADPH :</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
<b>PCB :</b>	Polychlorobiphényles
<b>RAL :</b>	« Relative adduct labeling »
<b>SM :</b>	Spectrométrie de masse
<b>SOD :</b>	Superoxyde dismutase

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b> Cancérogénicité comparative de quelques HAP parentaux ou de leurs métabolites pour la peau de souris et la glande mammaire de rat (Cavalieri et Rogan, 1992)	24
<b>Tableau 2 :</b> Activités « Mixed Function Oxidases » (MFO) rapportées chez <i>Mytilus sp</i> (d'après Livingstone, 1991)	37
<b>Tableau 3 :</b> Observation <i>in situ</i> et au laboratoire de l'induction des activités BPH et NADPH cytochrome c réductase chez <i>Mytilus sp</i>	38
<b>Tableau 4 :</b> Evidences biochimiques et moléculaires de la présence de gènes <i>CYP</i> chez <i>Mytilus sp</i>	40
<b>Tableau 5 :</b> Métabolites du B[a]P <i>in vitro</i> chez <i>Mytilus sp</i>	42
<b>Tableau 6 :</b> Métabolites du B[a]P produits <i>in vivo</i> chez la moule. Détermination du profil des métabolites conjugués à l'acide glucuronique et au sulfate (Michel et al., 1995)	44
<b>Tableau 7 :</b> Liaison covalente des métabolites du B[a]P à l'ADN et aux protéines de la glande digestive de moule (Marsh et al., 1992)	44
<b>Tableau 8 :</b> Niveaux d'adduits mesurés après exposition au B[a]P (0, 0,5, 5, 50, 100, 500, 1000 ppb) (d'après Canova et al., 1998)	46
<b>Tableau 9 :</b> Principales enzymes de réparation des bases oxydées de l'ADN chez <i>E. coli</i> et <i>S. cerevisiae</i>	61
<b>Tableau 10 :</b> Les défenses antioxydantes chez <i>Mytilus sp</i>	66
<b>Tableau 11 :</b> Production de cassures de brins à l'ADN chez la moule par l'exposition au laboratoire à des composés génotoxiques (d'après Mitchelmore et Chipman, 1998)	68
<b>Tableau 12 :</b> Informations disponibles sur la composition du Marine Liquify et du Liquizell	77
<b>Tableau 13 :</b> Résultats de l'analyse statistique concernant l'étude de l'effet du temps d'alimentation sur le poids individuel humide et sec de chaque groupe	80
<b>Tableau 14 :</b> Résultats du dosage du MDA et des mesures d'activité des différents biomarqueurs enzymatiques	236
<b>Tableau 15 :</b> Matrice de corrélation entre la 8-oxodGuo et les différents marqueurs biochimiques	237
<b>Tableau 16 :</b> Teneurs en contaminants chimiques des moules des stations RINBIO	243
<b>Tableau 17 :</b> Classification hiérarchique des stations RINBIO	244
<b>Tableau 18 :</b> Distribution des différents adduits entre stations	247

**Tableau 19 :** Recherche de corrélation entre les niveaux d'adduits à l'ADN et le niveau de contamination des animaux

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> Chronologie du niveau d'observation des effets induits par les polluants et de l'utilisation des biomarqueurs (d'après Burgeot, 1994)	3
<b>Figure 2 :</b> Régions structurales du B[a]P (Penning, 1993)	7
<b>Figure 3 :</b> Voie d'activation du B[a]P en diol-époxydes (d'après Penning, 1993)	8
<b>Figure 4 :</b> Stéréosélectivité du métabolisme du B[a]P : stéréoisomères du 7,8-BPDE (d'après Shaw et Connell, 1994)	9
<b>Figure 5 :</b> Métabolisme de la B[a]P-7,8-dione par la dihydrodiol-deshydrogénase (d'après Flowers-Geary et al., 1995, Flowers et al., 1996)	11
<b>Figure 6 :</b> Activation du B[a]P par la voie du radical cation (d'après Cavalieri et Rogan, 1992)	14
<b>Figure 7 :</b> Adduits formés par l'oxydation électrochimique du B[a]P en présence de dG et de dA (Ramakrishna et al., 1992)	16
<b>Figure 8 :</b> Profil des adduits obtenus par réaction du 7,8-BPDE avec la dG et la dA (Ramakrishna et al., 1992)	17
<b>Figure 9 :</b> Adduits stables et dépurinés de la voie du radical cation et de la voie des diol-époxydes identifiés <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> chez les rongeurs (d'après Devanesan et al., 1992)	18
<b>Figure 10 :</b> Voie des esters benzyliques du B[a]P	20
<b>Figure 11 :</b> Les différentes étapes de la cancérogenèse chimique (d'après Klaunig et al., 1994)	22
<b>Figure 12 :</b> Mécanisme de réparation de l'ADN par excision de nucléotides (NER)	26
<b>Figure 13 :</b> Exemple de mutation G→T induite par la présence d'un site apurinique : cas de l'adduit dépuriné B[a]P-6-N7Gua	27
<b>Figure 14 :</b> Mécanisme de réparation de l'ADN par excision de base (BER)	28
<b>Figure 15 :</b> Réduction séquentielle de l'oxygène moléculaire en espèces radicalaires	51
<b>Figure 16 :</b> Cycle catalytique du cytochrome P450 (Eastabrook, 1978)	51
<b>Figure 17 :</b> Localisation cellulaire des défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques	55
<b>Figure 18 :</b> Formation de malondialdéhyde lors de la peroxydation de lipides poly-insaturés contenant au moins deux double-liaisons (d'après Roberfroid et Calderon, 1995)	57

<b>Figure 19</b> : Principaux produits de réaction du radical hydroxyle avec la dAdo, la dGuo, la dCyd et la Thd (d'après Cadet et al., 1997b)	59
<b>Figure 20</b> : Principaux produits d'oxydation de la 2'-desoxyguanosine par l'oxygène singulet : obtention de la 8-oxodGuo et des deux diastéréoisomères 4R* et 4S* du 4,8-dihydro-4-hydroxy-8-oxo-2'-desoxyguanosine (Ravanat et Cadet, 1995)	62
<b>Figure 21</b> : La moule, <i>Mytilus</i> sp : taxonomie et anatomie (Photographies G & M-T Thébaud)	73
<b>Figure 22</b> : Evolution au cours du temps du poids individuel moyen (humide et sec) des moules de chacun des 5 groupes d'expérimentation. * : significatif à $p < 0.05$	79
<b>Figure 23</b> : Granulométrie laser de la solution nutritive de Marine Liquifry	23
<b>Figure 24</b> : Protocole d'extraction d'ADN de moule selon Venier et Canova (1996)	85
<b>Figure 25</b> : Observation au microscope électronique du copépode <i>Mytilicola intestinalis</i> (Canestri-Trotti et al., 1998)	98
<b>Figure 26</b> : Préparation de la fraction cellulaire S9 de branchies de moule	99
<b>Figure 27</b> : Préparation des différentes fractions subcellulaires de glande digestive de moule	99
<b>Figure 28</b> : Dosage colorimétrique de l'activité Glutathion-S-transférase (GST) soluble (d'après la méthode de Habig et al., 1974)	100
<b>Figure 29</b> : Dosage de l'activité catalase dans la glande digestive de moule (d'après Claiborne, 1985)	100
<b>Figure 30</b> : Dosage de l'activité DT-diaphorase dans la glande digestive de moule (d'après Benson et al., 1980)	101
<b>Figure 31</b> : Dosage de l'activité acetylthiocholine esterase (d'après Galgani et Bocquené, 1988)	101
<b>Figure 32</b> : Dosage de l'activité Benzo[a]pyrène hydroxylase (adapté par Burgeot d'après Michel et al., 1993)	102
<b>Figure 33</b> : Profil chromatographique type des différentes bases de l'ADN et de la 8-oxodGuo	158
<b>Figure 34</b> : Carte d'échantillonnage de la campagne BIOMAR IV (Burgeot, 1999)	231
<b>Figure 35</b> : Protocole de dosage du MDA induit (A)et non induit (B) chez la moule	234
<b>Figure 36</b> : Mesure des niveaux de 8-oxodGuo à l'ADN de branchies des moules échantillonnées lors de la campagne BIOMAR IV	235

<b>Figure 37</b> : Résultats des analyses discriminantes	237
<b>Figure 38</b> : Localisation des stations Rinbio	241
<b>Figure 39</b> : Classification hiérarchique des stations Rinbio en fonction de leur degré de contamination globale (Agrégation d'après la mesure des distances euclidiennes par la méthode du saut minimum)	244
<b>Figure 40</b> : Profils des adduits à l'ADN des stations 5A, 6B, 11A, 7A, 15A et 16B	245
<b>Figure 41</b> : Profils des adduits à l'ADN des stations 19A, 20A, 21A, 22B et 29B	246
<b>Figure 42</b> : Niveaux d'adduits mesurés au sein des différentes stations	248





# **INTRODUCTION**



La pollution chimique de l'environnement marin n'a cessé d'augmenter avec l'urbanisation et l'industrialisation croissante des zones côtières. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polychlorobiphényles (PCB), les pesticides et les métaux lourds d'origines industrielles, agricoles et domestiques sont parmi les polluants majoritairement rencontrés dans le milieu aquatique (La Rocca et al., 1996, Cossa et al., 1994, Botello et al., 1997).

Dans le cas des hydrocarbures et de leurs dérivés, les rejets sont estimés de l'ordre du million de tonnes par an pour l'océan global (UNEP, 1990), les zones côtières étant particulièrement concernées (28%). En raison de leur caractère hydrophobe, ces polluants sont présents à faible concentration dans la phase dissoute et sont, avant sédimentation, le plus souvent adsorbés sur les particules en suspension dans l'eau (Narbonne et al. 1992). Leur biodisponibilité pour les organismes vivants et leur persistance dans le milieu marin (Neff, 1984, Frithjof et Walday, 1996, Penry et Weston, 1998) présentent de multiples risques parmi lesquels une contamination de la chaîne alimentaire, une perte de biodiversité notamment au niveau des zones côtières très productives et concentrant la majorité de la faune et de la flore marine, et à terme un risque de déstabilisation des écosystèmes marins. En effet, nombreux sont ceux qui après bioaccumulation ont été identifiés comme agents toxiques, voire génotoxiques et cancérigènes, pour plusieurs systèmes biologiques (Cavaliere et Rogan, 1992, Gardner, 1993, Piechotta et al. 1999, Terzaghi et al., 1998). Dans le but de mettre en place une législation efficace visant à protéger l'environnement marin, il est donc nécessaire de développer des outils utiles à la surveillance et à l'estimation de l'impact des polluants sur l'écosystème.

Le dosage seul de ces contaminants dans les différents compartiments de l'écosystème marin (colonne d'eau, sédiment, organismes) étant insuffisant à l'évaluation des risques biologiques, de nombreux travaux et réflexions ont abouti au concept de la biosurveillance : détermination des changements biologiques engendrés *in situ* par la présence de polluants au sein même des organismes. Sur le terrain, elle se traduit par la réalisation de programmes pluridisciplinaires reposant sur les analyses chimiques du milieu et la mesure de biomarqueurs : 'changements moléculaires, biochimiques, histologiques ou physiologiques chez des organismes susceptibles d'être utilisés pour estimer soit l'exposition à des contaminants présents dans leur milieu, soit les effets induits par la pollution' (Michel et al., 1998). On distingue différents types de biomarqueurs permettant la détection, plus ou moins précoce, à différents niveaux d'organisation cellulaire, de la présence (biomarqueurs d'exposition) et des effets (biomarqueurs d'effets) induits par les polluants chimiques (Figure 1) (Amiard et al., 1998). Ces biomarqueurs sont mesurés sur des espèces dites sentinelles telles que la moule *Mytilus sp* (Viarengo et Canesi, 1991), qui en raison de ses particularités bio-écologiques (organisme sessile, filtreur, abondant, de large répartition géographique) et ses possibilités de transplantation, est l'organisme clef de réseaux de surveillance tels que le « Mussel Watch Program » (Goldberg, 1975) et le réseau national d'observation (RNO) (Claisse et al., 1992). Pour cet organisme, de nombreux biomarqueurs enzymatiques d'exposition ont déjà été proposés et appliqués dans des études de terrain (Michel et al., 1994, Livingstone et al., 1995, Solé et al., 1996, 1998). Ce n'est que plus récemment que des biomarqueurs de génotoxicité ont été étudiés comme indicateurs précoces des effets engendrés par les polluants au niveau de l'ADN (Bolognesi et al., 1996, Chipman et Marsh, 1991).

Le sujet de cette thèse s'inscrit dans le cadre du développement de biomarqueurs de génotoxicité pour l'espèce sentinelle *Mytilus sp*. Les résultats prometteurs obtenus chez l'homme, les rongeurs et les poissons sur l'utilisation possible de la formation d'adduits et de bases oxydées à l'ADN comme biomarqueurs de génotoxicité (Shigenaga et Ames, 1991, La et Swenberg, 1996) ont suscité l'investigation de ces types de dommages à l'ADN chez ce

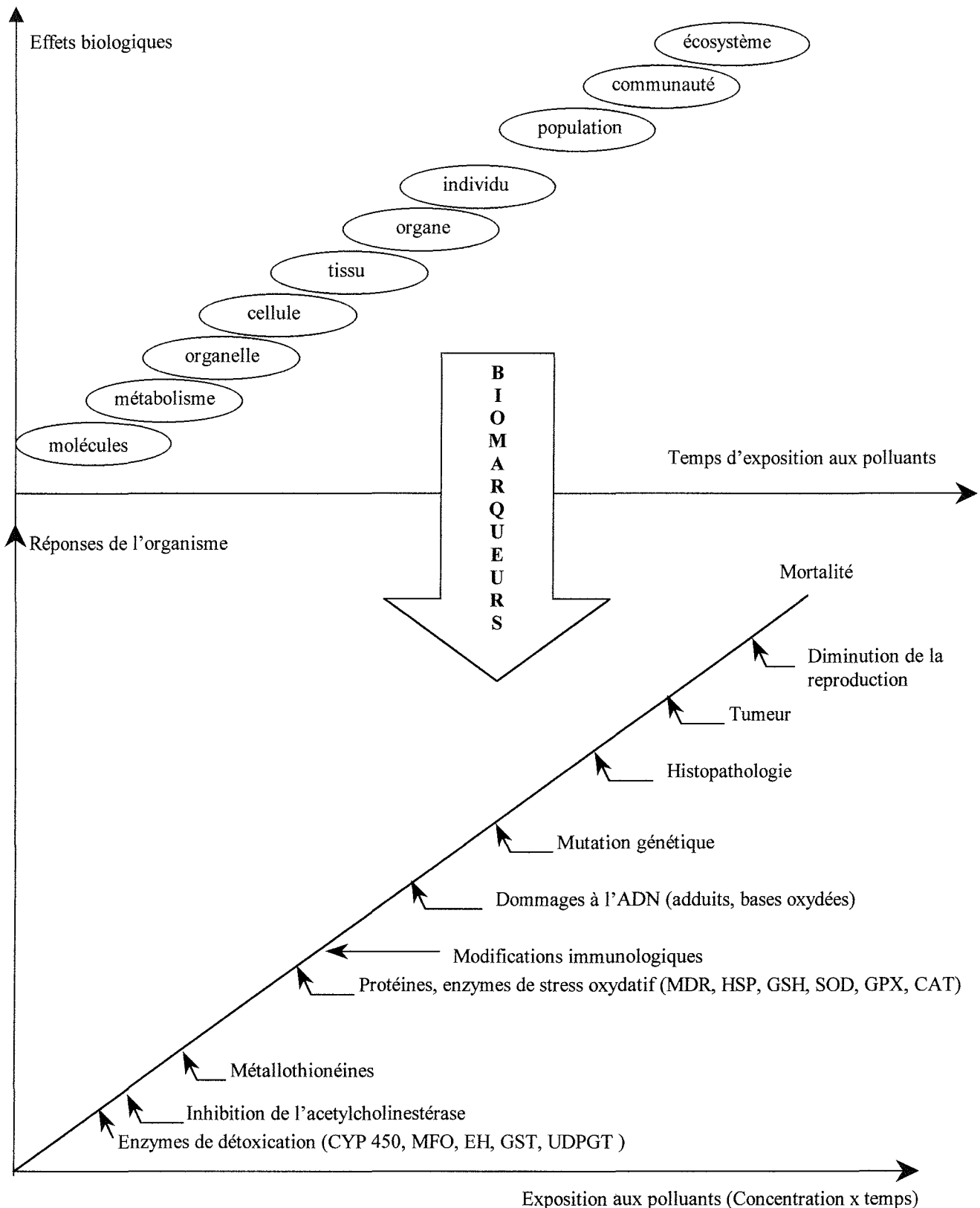


Figure 1 : Chronologie du niveau d'observation des effets induits par les polluants et de l'utilisation des biomarqueurs (d'après Burgeot, 1994). CYP 450 : cytochrome P450, MFO : oxydases à fonctions multiples, EH : époxyde hydrolase, GST, Glutathion-S-transférase, UDPGT : uridine diphosphoglucosyle transférase, MXR : protéines de résistance multiple aux xénobiotiques, HSP : protéines de choc thermique, GSH : glutathion, SOD : superoxyde dismutase, GPX : glutathion peroxydase, CAT : catalase.

bivalve marin. La formation de ces lésions à l'ADN a été étudiée pour le benzo[a]pyrène (B[a]P), HAP modèle pour les études de cancérogenèse chimique (Phillips, 1983).

Après une revue synthétique des données bibliographiques disponibles sur les adduits et les bases oxydées de l'ADN, les objectifs du travail de thèse seront clairement définis. Dans la seconde partie de ce manuscrit, les résultats obtenus au laboratoire et sur le terrain seront présentés et feront l'objet d'une conclusion générale.



**PREMIERE PARTIE**  
**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**





**CHAPITRE 1**  
**LES ADDUITS A L'ADN**



## LES ADDUITS A L'ADN

### Les différentes voies d'activation du benzo[a]pyrène en adduits à l'ADN

L'hypothèse de base de la cancérogenèse chimique développée par Miller et Miller (1981) repose sur la formation d'une liaison covalente entre le cancérigène chimique et les macromolécules cellulaires dont l'ADN. Cette liaison constituerait ainsi l'étape critique de l'initiation de la cancérogenèse chimique.

La plupart des polluants dont les HAP sont des procancérogènes qui nécessitent une activation métabolique en espèces électrophiles pour se lier de façon covalente aux groupements nucléophiles des macromolécules cellulaires. L'activation métabolique des HAP en adduits à l'ADN est ainsi considérée comme l'événement crucial de la cancérogenèse induite par cette classe de polluants. Différentes voies d'activation du B[a]P en adduits à l'ADN ont ainsi été identifiées chez les vertébrés.

#### I. La voie des diol-époxydes

##### I. 1. Activation du B[a]P en B[a]P diol-époxyde-10-N2dG

C'est la voie la plus connue d'activation des HAP en adduits à l'ADN (Sims et al., 1974, Conney, 1982, Grover, 1986). Elle est basée sur la formation de diol-époxydes, identifiés très tôt comme les métabolites cancérogènes ultimes des HAP. Dans le cas du B[a]P, la voie des diol-époxydes a été démontrée pour la première fois *in vitro* et *in vivo* après exposition au B[a]P de microsomes de foie de rats induits au 3-méthylcholanthrène (3-MC) et de cultures cellulaires de hamsters (Sims et al., 1974).

Les diol-époxydes sont issus de l'oxydation du B[a]P par le cytochrome P450 et tout particulièrement par les isoformes P450IA1 et P450IA2 (Hall et al., 1989, Murray et Reidy, 1990). Ils sont produits en région Baie, région anguleuse délimitée par le carbone en position C 10 et le C 11 de la molécule de B[a]P (Figure 2). Leur formation est initiée par l'oxydation du B[a]P en B[a]P-oxydes par le cytochrome P450. Par hydratation catalysée par l'époxyde hydrolase (EH), ces B[a]P-oxydes conduisent à la formation de B[a]P-dihydrodiols. Ces derniers métabolites sont ensuite oxydés par le cytochrome P450 en leurs B[a]P diol-époxydes (BPDE) correspondants (Figure 3).

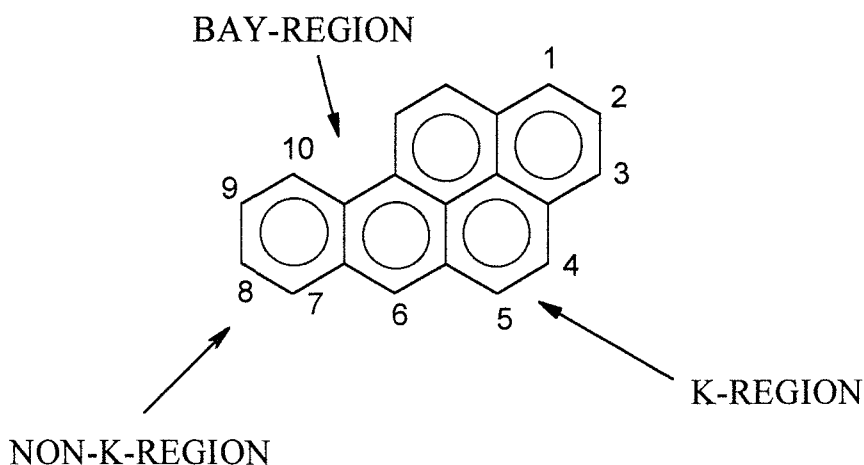


Figure 2 : Régions structurales du B[a]P (Penning, 1993).

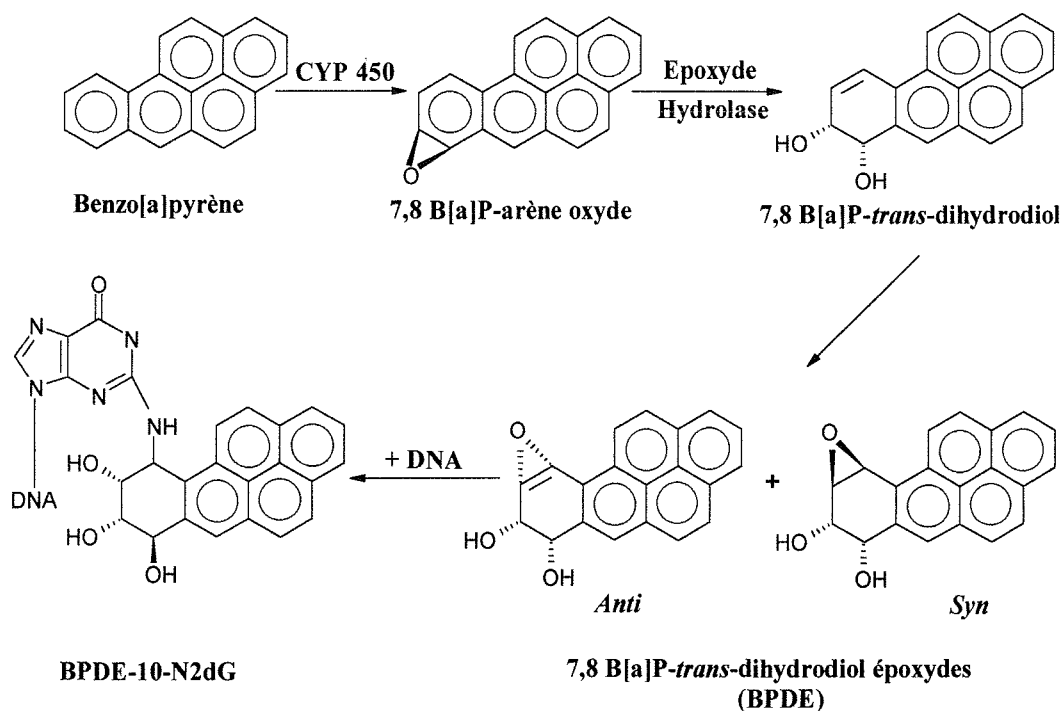


Figure 3 : Voie d'activation du B[a]P en diol-époxydes (d'après Penning, 1993).

Parmi les métabolites issus de la biotransformation du B[a]P sous l'action des monooxygénases du cytochrome P450, trois B[a]P-dihydrodiols ont été identifiées chez les mammifères: les 9-10, 7-8 et 4-5 B[a]P-diols (Gelboin, 1980). La ( $\pm$ )-7,8-B[a]P-diol est néanmoins formée de façon prédominante de par la stéréo- et la régio-sélectivité du cytochrome P450 et de l'EH (Takker et al., 1977, Mallet et al., 1991, Adams et al., 1995). Parmi les B[a]P-diols, elle est la seule à être métabolisée en un diol-époxyde pouvant conduire à la formation d'adduits du B[a]P chez les vertébrés. Le 7,8-BPDE peut exister sous la forme *syn* et *anti*, chaque forme présentant deux énantiomères *cis* et *trans* possibles (Figure 4). La forme *anti*, produite en quantité plus importante que la forme *syn*, se lie de façon prédominante à l'ADN, l'énantiomère *trans* étant le plus réactif (Hall et Grover, 1990). Par réaction avec l'ADN, ce diol-époxyde conduit à la formation de l'adduit majoritairement formé par cette voie d'activation métabolique, le BPDE-10-N2dG (Figure 3). Cet adduit résulte de la liaison covalente de la (+)-7R,8S-dihydroxy-9S,10R-époxy-7,8,9,10, tétrahydrobenzo[a]pyrène en C10 avec le groupe N2 de la désoxyguanosine (Jeffrey et al., 1976, Stowers et Andersson, 1985). Cet adduit a été isolé pour la première fois par Chromatographie liquide haute Performance (CLHP), couplée à des détecteurs UV et à radioactivité, son identification ayant été réalisée par co-chromatographie avec des adduits BPDE standards (Sims et al., 1974). La méthode de post-marquage au  $^{32}\text{P}$  a par la suite été très utilisée pour l'analyse de ce type d'adduits à l'ADN (Annexe I).

La réactivité du 7,8 BPDE ayant été observée comme étant minimale voire nulle avec les autres bases de l'ADN, le BPDE-10-N2dG a été longtemps le seul adduit du B[a]P à avoir été associé à la voie des diol-époxydes. Cette voie d'activation a, en effet, été longtemps considérée comme la voie d'activation exclusive des HAP (Hall et Grover, 1990). L'avancée des connaissances sur la théorie du radical cation (Cavaliere et Rogan, 1992, 1995) a néanmoins permis de compléter le profil des adduits obtenus par cette voie d'activation des HAP.

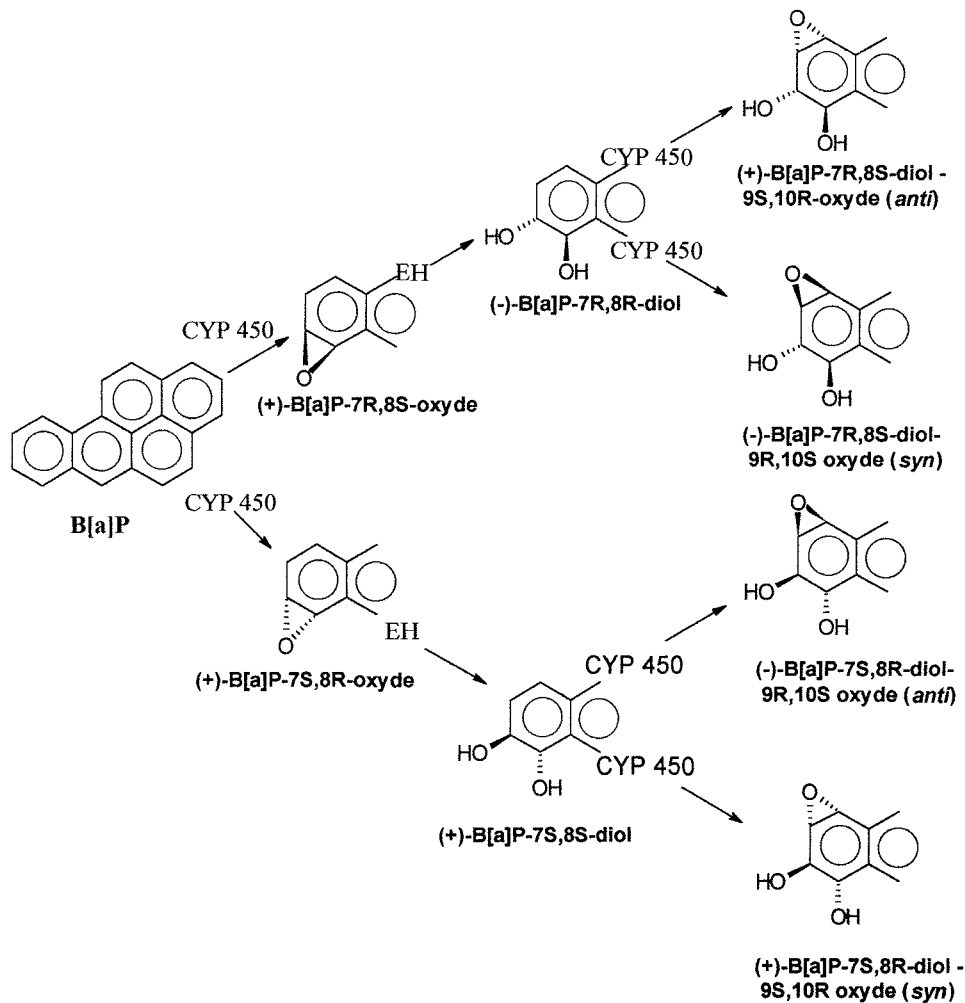


Figure 4 : Stéréosélectivité du métabolisme du B[a]P : stéréoisomères du 7,8-BPDE (d'après Shaw et Connell, 1994).

## I. 2. Adduits stables et adduits dépurinés

La théorie du radical cation (paragraphe III) a permis de mettre en évidence l'existence de deux types d'adduits à l'ADN : les adduits dépurinés et les adduits stables. Les adduits stables, liés de façon covalente, restent solidement ancrés à la double hélice de l'ADN lors des procédures d'extraction classique du matériel génomique. La formation d'adduits dépurinés fragilise quant à elle la molécule d'ADN et provoque, lors de l'extraction, une cassure de la liaison N-glycosidique. Il en résulte la perte complète du désoxyribose et la formation d'un site abasique. Lors de la précipitation de l'ADN, ces adduits dépurinés sont ainsi récupérés dans le surnageant et non pas dans le culot comme pour les adduits stables.

L'analyse de ces adduits dépurinés a été essentiellement développée lors de l'étude de la voie du radical cation. Elle a ainsi permis de mettre en évidence chez les rongeurs, la formation *in vitro* et *in vivo* de deux adduits dépurinés par la voie des diol-époxydes : le BPDE-10-N7Ade et le BPDE-10-N7Gua (Chen et al., 1996).

### I. 3. Les mécanismes de détoxication possibles des BPDE

Quelques voies de détoxication ont été identifiées pour chacun des métabolites du B[a]P produits par la voie des diol-époxydes. Il a ainsi été démontré que les B[a]P-oxydes étaient des substrats des glutathion-S-transférases (GST). Ces enzymes sont capables, par conjugaison des B[a]P-oxydes avec le glutathion, d'augmenter leur hydrosolubilité et de faciliter ainsi leur excrétion (Hall et Grover, 1990). De la même façon, la conjugaison des B[a]P-dihydrodiols à l'acide glucuronique et à l'acide sulfurique par des glucuronyltransférases et des sulfotransférases, limite la quantité de BPDE formée en éliminant leurs composés précurseurs (Stowers et Anderson, 1985).

Des mécanismes de détoxication des BPDE ont également été identifiés. Les BPDE sont eux-mêmes substrats des GST cytosoliques et peuvent donc être excrétés par conjugaison au glutathion avant de se fixer à l'ADN (Funk et al., 1995). Ces métabolites ultimes peuvent également, par réaction non enzymatique, être hydrolysés de façon spontanée en B[a]P-tétraols, facilement excrétés par l'organisme (Stowers et Anderson, 1985, Shaw et Connell, 1994).

On pourrait ajouter à ces mécanismes de détoxication, la voie de formation des B[a]P O-quinones qui a été proposée comme une voie d'activation des HAP alternative à la formation des BPDE.

## II. La voie des O-quinones

La formation de O-quinones a récemment été proposée comme une voie d'activation possible des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Elle met en jeu une enzyme spécifique, la dihydrodiol deshydrogénase (DD), dont l'activité métabolique constitue une voie alternative à la formation des diol-époxydes (Penning, 1993).

### II.1. La dihydrodiol deshydrogénase

Plusieurs études *in vitro* ont démontré chez le rat la capacité métabolique de la DD hépatique à oxyder les *trans*-dihydrodiols du benzo[a]pyrène, chrysène, 5-méthylchrysène, benz[a]anthracène, 7,12-diméthylbenz[a]anthracène en HAP O-quinones (Smithgall et al., 1986, 1988). Sous l'action de la DD, les HAP *trans*-dihydrodiols sont oxydés en hydroquinones qui, par autooxydation, conduisent à la formation des HAP O-quinones correspondantes. Dans le cas du benzo[a]pyrène, l'incubation de la ( $\pm$ )-*trans*-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrène (7,8 B[a]P-diols) avec des fractions subcellulaires de foie de rat conduit ainsi, via la formation de catéchol, à la benzo[a]pyrène-7,8-dione (BPQ) (Shou et al., 1993, Flowers-Geary et al., 1995) (Figure 5). Parmi les *trans*-B(a)P diols (9,10 7,8, et 4,5 B[a]P-diols), la 7,8 B[a]P-diols est la seule à avoir été identifiée comme substrat de la DD (Penning, 1993). La BPQ est donc la seule B[a]P O-quinone décrite dans la littérature. Il convient donc de bien la différencier des quinones produites lors du métabolisme du B[a]P par le P450 : 1,3 3,6 et 6,12 B[a]P-diones.

Il a été démontré que l'incubation de la 7,8 B[a]P-diols avec des hépatocytes de rat isolés, conduit à la formation de BPQ et de B[a]P-tétraols (produits d'hydrolyse spontanée des BPDE en milieux aqueux) en quantités similaires, démontrant ainsi une implication égale de la DD et du CYP1A1 au métabolisme de la 7,8 B[a]P-diols (Flowers-Geary et al., 1995). Les *trans*-dihydrodiols étant les précurseurs des BPDE, la formation de O-quinones constitue donc un mécanisme de détoxication possible des BPDE. Les O-quinones produites ne sont néanmoins pas inactives.

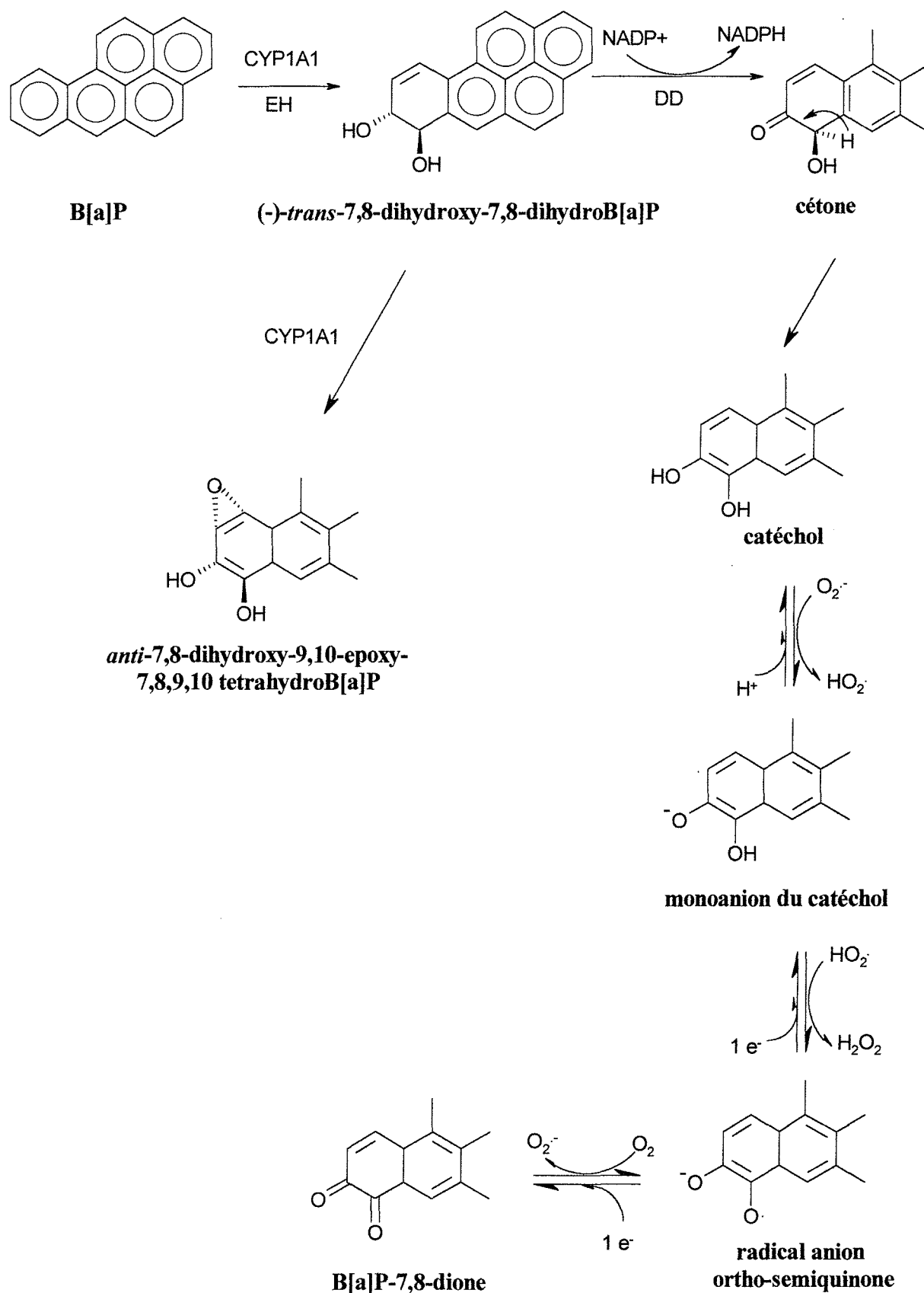


Figure 5 : Métabolisme de la B[a]P-7,8-dione par la dihydrodiol-deshydrogénase (d'après Flowers-Geary et al., 1995, Flowers et al., 1996).

## II. 2. Toxicité des O-quinones

L'autooxydation de l'hydroquinone en O-quinone s'accompagne de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de radicaux anions semi-quinones très réactifs. Une fois formée la O-quinone peut entrer dans des cycles redox après réduction à un électron par les réductases microsomales, NADPH-cytochrome P450 réductase et NADH-cytochrome b5 réductase, et régénérer ainsi l'hydroquinone correspondante (Flowers-Geary et al., 1992). Cette réduction à un électron s'accompagne à chaque cycle de la production d'ERO et de radicaux anions semi-quinones supplémentaires.

La formation de tels radicaux a été démontrée comme étant responsable de la cytotoxicité des HAP O-quinones chez le rat, en raison de l'observation, *in vitro*, d'une diminution significative de la viabilité cellulaire avec le temps d'incubation et la dose de BPQ (Flowers et al., 1996).

La réactivité des O-quinones avec les nucléophiles cellulaires et en particulier avec l'ADN contribue, quant à elle, à l'expression de leur génotoxicité. Bien qu'en quantité inférieure à celle des adduits BPDE, l'incubation de BPQ avec des hépatocytes de rat a démontré la formation d'adduits BPQ stables à l'ADN (Flowers et al., 1996). Shou et al (1993) ont également mis en évidence *in vitro* que la formation d'adduits BPQ à de l'ADN de thymus de veau présentait une réactivité préférentielle pour la désoxyguanosine, la formation d'adduits BPQ résultant d'une réaction d'addition entre le C10 de la BPQ et le groupe N2 de la désoxyguanosine. Alors que la formation d'adduits à l'ADN par les radicaux semi-quinones des 3,6 1,6 et 6,12 B[a]P-diones a clairement été démontrée (Nagata et al., 1978), la formation d'adduits à l'ADN par les radicaux semi-quinones BPQ n'a pas encore été étudiée.

La réalisation de tests d'Ames, a démontré également la mutagénicité de la BPQ pour les souches de *Salmonella typhimurium*, TA97 et TA98, TA 100, et TA102 et TA104. Ces souches sont respectivement sensibles aux mutations par substitution de paires de bases, aux mutations ponctuelles et aux dommages oxydatifs. Bien que mutagène pour l'ensemble de ces souches, la BPQ présente néanmoins un caractère mutagène plus faible que celui des BPDE (Flowers et al., 1996).

## II.3. La formation de O-quinones est elle une voie de détoxification des BPDE ?

Dans la mesure où les métabolites qu'elle génère présente un caractère mutagène et une réactivité à l'ADN plus faible que les BPDE, l'action de la DD peut être considérée comme un mécanisme de détoxification possible des HAP *trans*-dihydrodiols. Néanmoins, lors du métabolisme de la BPQ par des hépatocytes de rat, une augmentation significative de la formation du radical anion superoxyde ( $O_2^-$ ) a clairement été démontrée comme étant responsable d'une fragmentation intensive de l'ADN (Flowers et al., 1996). La cytotoxicité de la BPQ semble donc être liée à la production de ROS qui accompagne sa formation.  $O_2^-$  peut en effet conduire via la réaction d'Haber-Weiss, à la formation de radicaux hydroxyles (OH) très réactifs (cf page 52). Outre l'oxydation des bases et des sucres de la molécule d'ADN, ces radicaux peuvent agir comme une véritable nucléase chimique et provoquer ainsi des cassures simples et doubles brins de la molécule d'ADN qui lorsqu'elles ne sont pas réparées sont létales pour la cellule. La voie des O-quinones ne constitue donc pas à proprement parler une voie de détoxification des HAP *trans*-dihydrodiols. C'est d'abord une voie d'activation à part entière des HAP. Cependant, plutôt que la formation d'adduits stables, ce sont surtout les dommages oxydatifs et en particulier les cassures de brins que peuvent engendrer les O-quinones aux acides nucléiques qui sont les plus préjudiciables pour l'intégrité des systèmes biologiques testés.

Très peu de mécanismes de détoxification de ces hydroquinones/O-quinones ont été identifiés.



Pour les hydroquinones, la formation possible de conjugués avec le glutathion ou la L-cystéine via des réactions d'addition, permet la formation de conjugués hydrosolubles pouvant être facilement excrétés. Un rôle pour la DT-Diaphorase a également été démontré. Alors que cette enzyme est capable de catalyser une réduction à deux électrons de la ménadione en hydroquinone, sans formation d'ERO et de radicaux anions semi-quinones, aucune des PAH O-quinones testées par Penning (1993) n'a été identifiée comme substrat de cette enzyme, excepté la 1,2-dione du naphthalène.

Il est important de souligner que les études présentées ici ont été conduites *in vitro*. La réalité et la signification biologique de ces O-quinones *in vivo* restent donc à être démontrées. Il est néanmoins intéressant de noter que de fortes similitudes ont été observées entre le métabolisme des HAP hydroquinones et celui des catéchols d'oestrogènes issus de l'hydroxylation de l'oestradiol et de l'oestrone (Penning, 1993). Tout comme les HAP *trans*-dihydrodiols, les 2,3 et 3,4 catéchols d'oestrogène peuvent former des O-quinones très réactives pour l'ADN. La formation d'adduits à l'ADN stables par l'oestrogène-2,3-quinone et l'oestrogène-3,4-quinone ainsi que la formation d'adduits à l'ADN dépurinés par l'oestrogène-3,4-quinone ont été démontrées *in vitro* (Stack et al., 1996, 1998, Cavalieri et Rogan, 1998). Pour cette dernière, la formation d'adduits dépurinés est majoritaire et est considérée comme l'événement crucial de l'initiation de tumeurs par cette classe de composés (Cavalieri et Rogan, 1998). Tout comme pour les HAP O-quinones, ces oestrogène-quinones peuvent entrer dans des cycles redox après réduction par la NADPH cytochrome P450 réductase et générer la formation de radicaux anions semi-quinones très réactifs. La formation d'adduits par les radicaux anions oestrogène-3,4-quinone a ainsi été récemment démontré *in vitro* (Akanni et Abul-Hajj, 1997). Comme pour les oestrogènes, la voie des O-quinones pourrait donc bien représenter une voie d'activation importante des HAP.

### III. La voie du radical cation

La théorie du radical cation a été particulièrement développée par l'équipe du professeur E. L. Cavalieri (Université du Nebraska, USA). Elle est basée sur la formation d'un radical cation après oxydation à un électron des HAP par le cytochrome P450. Cette théorie, très remise en cause à ces débuts, est aujourd'hui considérée comme la voie prédominante de la formation des adduits HAP à l'ADN chez les vertébrés (Cavalieri et Rogan, 1992). De nombreuses études réalisées avec le B[a]P ont en effet légitimé cette voie d'activation des HAP.

#### III. 1. Les hypothèses de base de la voie du radical cation

La capacité métabolique du cytochrome P450 à catalyser l'oxydation à un électron du B[a]P était jusqu'alors inconnue, le cytochrome P450 ayant été identifié comme catalysant exclusivement des réactions d'oxydation à deux électrons des HAP. Plusieurs observations tendaient néanmoins à démontrer le rôle du P450 dans l'oxydation à un électron du B[a]P, lui associant ainsi une activité semblable à celle des peroxydases.

L'oxydation à un électron a été proposée comme l'étape initiale de l'oxydation par le P450 de nombreux composés dont le B[a]P (Figure 6). La démonstration en a été faite pour ce dernier via l'étude des mécanismes de transfert d'oxygène impliqués dans la formation métabolique des B[a]P quinones et phénols (Cavalieri et al., 1988). Par fluoro-substitution du B[a]P, il a ainsi été clairement démontré que les B[a]P quinones avaient pour précurseur initial, un radical cation, 6-BP<sup>+</sup>, issu de l'oxydation à un électron du B[a]P par le P450. Le 6-BP<sup>+</sup> ainsi formé était rapidement oxydé en un ion carbonium qui, par réaction avec l'eau et autooxydation, formait les 1,6-, 3,6- et 6,12-B[a]P quinones. La capacité du 6-BP<sup>+</sup>, très électrophile, à se lier de façon covalente à l'ADN a par la suite été étudiée *in vitro*. Il a été

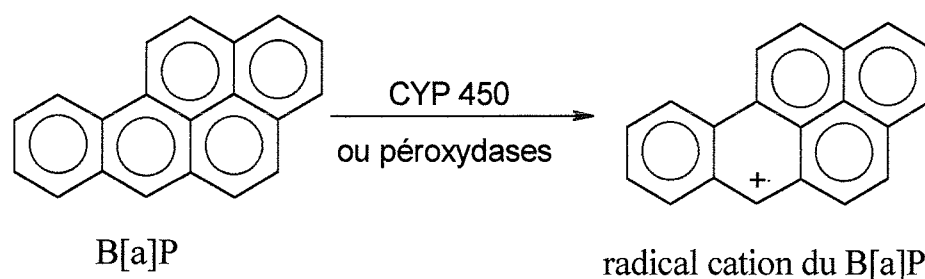


Figure 6 : Activation du B[a]P par la voie du radical cation (d'après Cavalieri et Rogan, 1992).

ainsi démontré que les produits d'oxydation à un électron du B[a]P, obtenus par la voie électrochimique ou enzymatique (peroxydase de radis noir), conduisait, par réaction avec la désoxyguanosine (dG), à la formation d'adduits stables et dépurinés du B[a]P radical cation (Rogan et al., 1988). Le premier adduit dépuriné ainsi observé fut le 7-(benzo[a]pyrène-6-yl)guanine (B[a]P-6-N7Gua), résultant de la réaction du radical cation en C6 avec le N7 de la guanine. Cet adduit est dit dépuriné car sa formation déstabilise la liaison glycosidique, provoquant ainsi la perte complète du désoxyribose lors des procédures d'extraction classique de l'ADN. Il devenait donc tout à fait possible pour le P450 de générer un profil d'adduits similaire à celui des peroxydases, légitimant ainsi la possibilité d'une voie d'activation des HAP autre que celle des diol-époxydes.

### III. 2. Rôle du cytochrome P450 dans la voie du radical cation : études *in vitro*

La première implication directe du cytochrome P450 dans la formation d'adduits dépurinés B[a]P à l'ADN, a été démontrée par Cavalieri et al. (1990a). Dans cette étude, le dosage des adduits stables et dépurinés du B[a]P a été réalisé après incubation *in vitro* de [<sup>3</sup>H]B[a]P avec des microsomes et des cellules de foie de rats, induits ou non au 3-méthylcholanthrene (3-MC). L'analyse de l'adduit dépuriné, B[a]P-N7Gua, a été conduite par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) couplée à des détecteurs UV et à radioactivité, son identité structurale ayant été vérifiée par FAB MS/MS (Fast Atom Bombardment combined with tandem Mass Spectrometry) ou FLNS (Fluorescence Line Narrow Spectrometry). Les adduits stables ont été mesurés par scintillation liquide et post-marquage au <sup>32</sup>P. Il a été démontré dans cette étude, pour les deux systèmes d'activation testés, que le métabolisme du [<sup>3</sup>H]B[a]P conduisait chez le rat à la formation d'adduits stables du B[a]P et à l'adduit dépuriné, B[a]P-6-N7Gua. L'implication du cytochrome P450 a quant à elle été démontrée par l'addition dans le mélange réactionnelle d'un inhibiteur spécifique du P450, l'hydrobromure 2-[(4,6-dichloro-o-biphenyl)-oxy]éthylamine (DPFA), dont l'addition provoqua une inhibition de la formation des adduits ainsi observés.

Il est important de noter ici que la théorie du radical cation avait été remise en cause en raison de l'improbabilité des radicaux cations formés dans le réticulum endoplasmique à atteindre l'ADN nucléaire : leur caractère électrophile et donc très instable pouvant être à l'origine de leur réactivité avec de nombreuses macromolécules cellulaires. La découverte de monooxygénases dans la membrane nucléaire (Khandwala et Kasper, 1973) et la formation *in vitro* d'adduits dépurinés dans des hépatocytes de rat (Cavalieri et al., 1990a) ont permis de valider *in vitro* la théorie du radical cation.

L'avancée des recherches sur la voie du radical cation a permis par la suite d'identifier *in vitro* de nouveaux adduits du B[a]P radical cation et du BPDE dans des microsomes (Devanesan et al., 1992, Chen et al., 1996) et des cellules (Devanesan et al., 1996) de foie de rats induits au

3-MC. Les adduits dépurinés, B[a]P-6-N7Ade > B[a]P-6-N7Gua ≥ B[a]P-6-C8Gua, ont ainsi été identifiés dans les deux systèmes étudiés (Figure 9). Outre la formation de l'adduit stable majoritaire, BPDE-10-N<sup>2</sup>dG, deux adduits dépurinés issus de la voie des diol-époxydes, BPDE-10-N7Ade et BPDE-10-N7Gua, ont également été identifiés (Figure 9), bien qu'en faible quantité dans les microsomes et les cellules de foie de rat (Devanesan et al., 1992, 1996, Chen et al., 1996). Dans ces études, la part respective de chacune de ces deux voies d'activation dans la formation d'adduits à l'ADN a été quantifiée. Ainsi, il a été démontré dans les microsomes et dans les noyaux de foie de rat que près de 80% des adduits totaux formés *in vitro* sont des adduits dépurinables, formés pour la grande majorité par la voie du radical cation B[a]P-6-N7Ade (38-58%) > B[a]P-6-N7Gua (10-20%) > B[a]P-6-C8Gua (5-14%) > BPDE-10-N7Ade (0.2-0.5%) > BPDE-10-N7Gua (0.2%). Les adduits stables, 20% des adduits totaux, sont en majorité constitués de l'adduit, BPDE-10-N<sup>2</sup>dG (15%) > adduits non identifiés (5%), la voie des diol-époxydes étant la voie dominante de la formation des adduits B[a]P stables.

Ces études montrent clairement l'importance de la voie du radical cation dans l'activation des HAP en adduits à l'ADN. Elles mettent également en évidence la formation possible d'adduits dépurinés par la voie des diol-époxydes, ce type d'adduits ayant été exclusivement associé jusqu'alors à la voie du radical cation. La voie des diol-époxydes reste néanmoins la voie majoritaire de formation d'adduits B[a]P stables à l'ADN.

### III. 3. La voie du radical cation *in vivo*

De nombreuses études menées par la suite sont venues préciser les connaissances sur cette voie d'activation des HAP. Il était important de démontrer *in vivo* son existence et son importance relative dans l'activation des HAP en adduits à l'ADN. L'identification et la synthèse d'adduits B[a]P de référence, issus des deux voies d'activation métabolique que sont la voie des diol-époxydes et la voie du radical cation, étaient donc nécessaires à l'identification préalable des adduits formés *in vivo* chez les organismes exposés.

#### III. 3. 1. Synthèse d'adduits B[a]P modèles

Tous les adduits BPDE et B[a]P radical cations pouvant être potentiellement formés *in vivo* ont donc été préalablement synthétisés *in vitro* (Ramakrishna et al., 1992). Les adduits issus de l'oxydation à un électron du B[a]P ont été produits par l'incubation des produits d'oxydation électrochimique du B[a]P avec les désoxyribonucléosides, dG, dA, dT et dC. Après séparation par CLHP et détection UV, les adduits ainsi formés ont été structurellement identifiés par résonance magnétique nucléaire (RMN) et FAB MS/MS. Les adduits diol-époxydes ont été obtenus par réaction du BPDE avec la dG et la dA, puis séparés et caractérisés comme précédemment. Le résultat de ces investigations est résumé figure 7 et figure 8.

L'oxydation électrochimique du BP en présence de dG et de dA conduit à la formation de six adduits: les adduits dépurinés, B[a]P-6-C8Gua, B[a]P-6-N7Gua et B[a]P-6-N7Ade, et les adduits stables, B[a]P-6-C8dG, B[a]P-6-N3dG et B[a]P-6-N<sup>2</sup>dG.

La réaction du BPDE avec dG conduit quant à elle à la formation d'un adduit dépuriné, BPDE-10-N7Gua et de B[a]P tétraols. Dans ce cas, l'absence de détection de l'adduit stable majoritaire, BPDE-10-N<sup>2</sup>dG, dans le mélange réactionnel est liée à son hydrolyse spontanée en B[a]P tétraols. Avec dA, seul l'adduit dépuriné, BPDE-10-N7Ade, a été identifié. Aucun adduit n'a été isolé après réaction avec la dC et la dT.

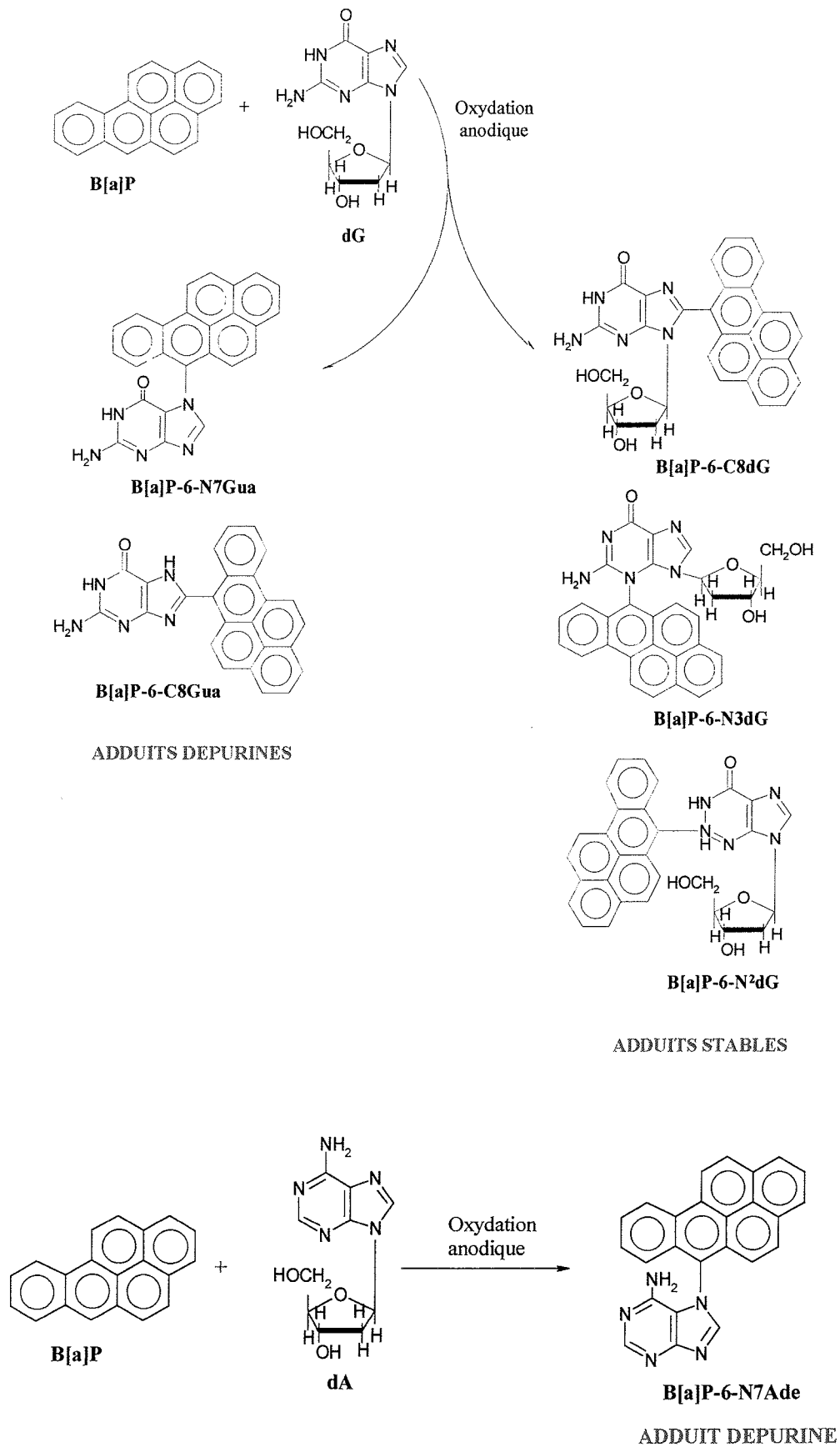


Figure 7 : Adduits formés par l'oxydation électrochimique du B[a]P en présence de dG et de dA (Ramakrishna et al., 1992).

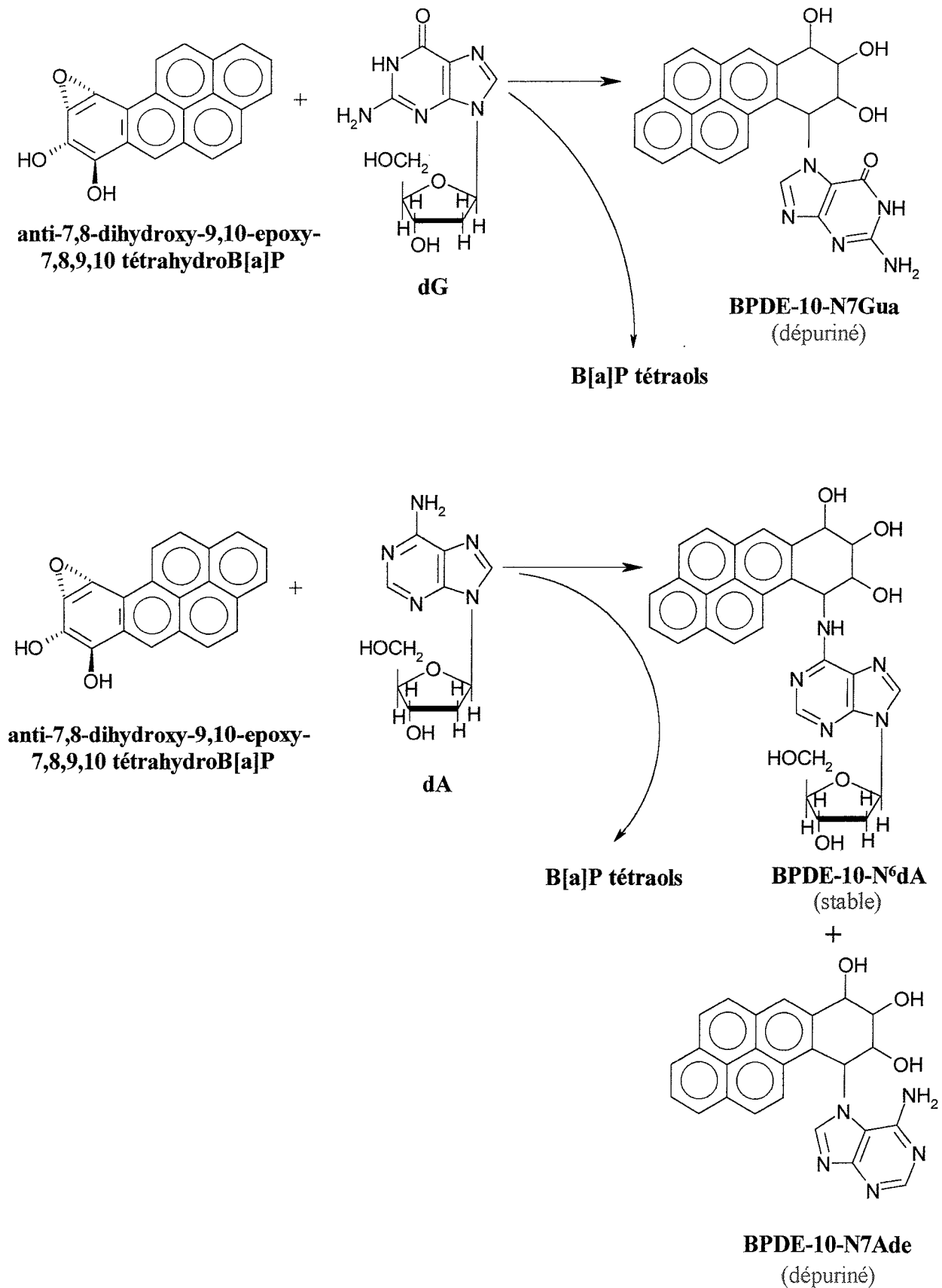


Figure 8 : Profil des adduits obtenus par réaction du 7,8 BPDE avec la dG et la dA (Ramakrishna et al, 1992).

III. 3. 2 Résultats des investigations conduites *in vivo* sur la formation du radical cation

La formation d'adduits du B[a]P radical cation a été étudiée *in vivo* sur de la peau de souris et dans la glande mammaire de rat (Figure 9). L'application de B[a]P sur de la peau de souris a été suivie, après 4 heures d'exposition, du dosage des adduits stables et dépurinés du B[a]P (Chen et al., 1996). Les adduits dépurinés ainsi formés, B[a]P-6-C8Gua (34%), B[a]P-6-N7Ade (22%), B[a]P-6-N7Gua (10%), BPDE-10-N7Ade (3%) et BPDE-10-N7Gua (2%), constituent 71 % des adduits totaux dont 66% sont issus de la voie du radical cation. Les adduits stables ne comptent que pour 28% du total : 22% pour l'adduit diol-époxyde stable, BPDE-10-N2dG et 6% pour les adduits non identifiés. Ces résultats confirment les résultats de Rogan et al (1993). L'injection de B[a]P dans la glande mammaire de rat a fait également l'objet du dosage des adduits à l'ADN, 24 heures après injection (Todorovic et al., 1997). Seulement deux adduits dépurinés ont été identifiés dans ce tissu, le B[a]P-6-C8Gua et le B[a]P-6-N7Ade. Les adduits stables sont constitués essentiellement de BPDE-10-N2dG qui représente 64 % des adduits stables totaux, et de 3 autres adduits stables non identifiés.

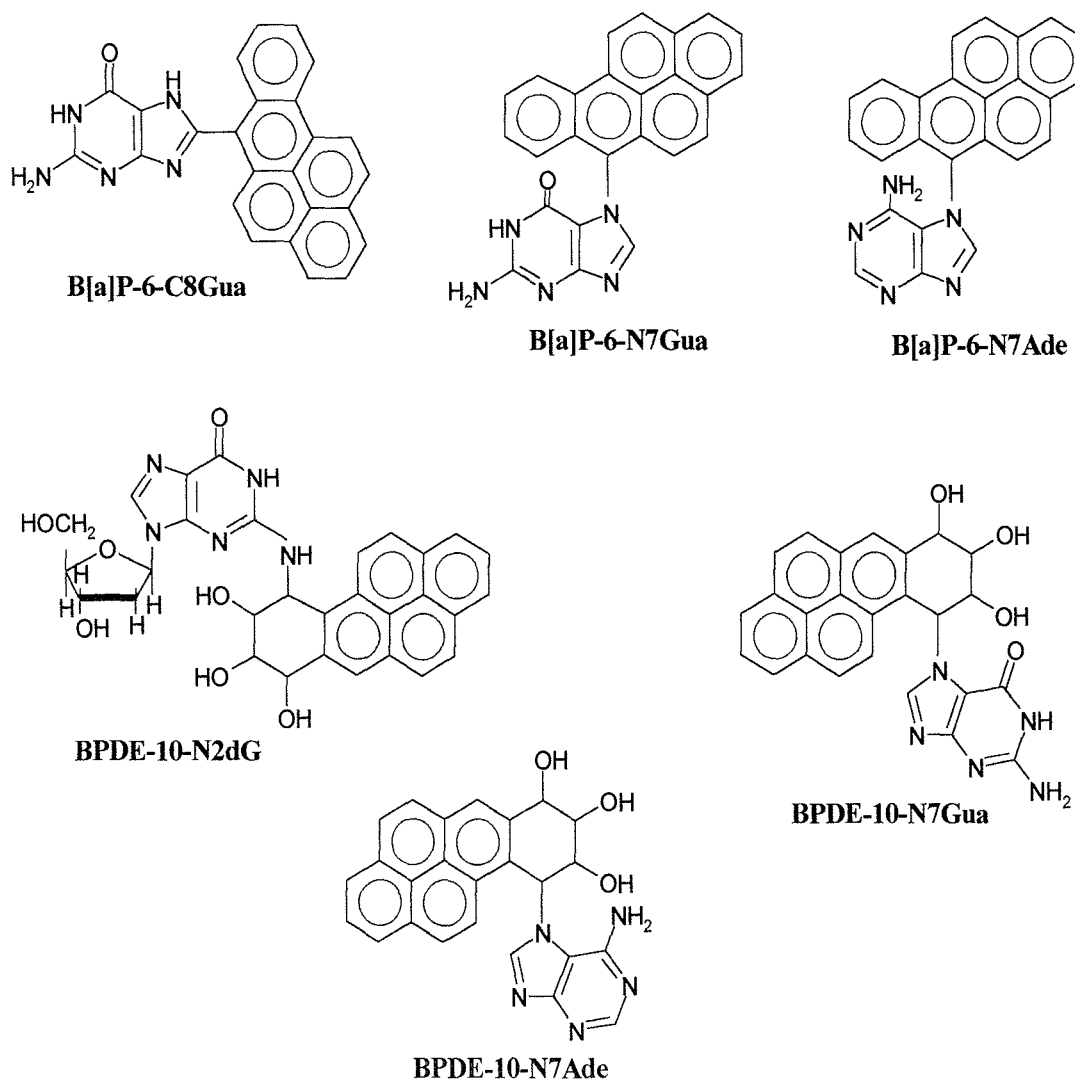


Figure 9 : Adduits stables et dépurinés de la voie du radical cation et de la voie des diol-époxydes identifiés *in vitro* et *in vivo* chez les rongeurs (d'après Devanesan et al., 1992).

En conclusion de l'ensemble des études présentées, la voie du radical cation apparaît donc comme la voie prédominante, *in vitro* et *in vivo*, d'adduits à l'ADN chez les vertébrés. Deux types d'adduits ont ainsi été identifiés : les adduits dépurinés et les adduits stables à l'ADN. *In vivo*, des différences dans le profil des adduits stables et dépurinés formés peuvent être observées entre tissus, néanmoins les observations suivantes ont toujours été vérifiées :

- 1) Les adduits dépurinés sont formés dans leur grande majorité par la voie du radical cation et constituent jusqu'à plus de 70% des adduits totaux à l'ADN
- 2) Les adduits stables sont produits en quantité plus faible et sont majoritairement formés par la voie des diol-époxydes. On peut noter ici qu'aucune identification d'adduits stables issus de la voie du radical cation n'a clairement été décrite *in vivo* et *in vitro*.

#### IV. La voie des esters benzyliques du B[a]P

Cette voie d'activation des HAP non substitués est la moins documentée de toutes. Elle a été proposée par Flesher et Sydnor en 1973. Elle est basée sur des réactions enzymatiques de substitution des HAP, résultant en la production d'esters benzyliques réactifs pour l'ADN. Cette voie d'activation des HAP peut-être résumée en trois étapes, chacune d'entre elles constituant une réaction de substitution distincte des HAP ou de leurs métabolites ainsi formés (Stansbury et al., 1994). La première étape consiste en une bioalkylation de la molécule de HAP, résultant d'une substitution méthyle de sa position de plus forte densité électronique. Dans le cas du B[a]P, cette substitution s'effectue en C6 et conduit ainsi à la formation d'un métabolite 6-méthyle B[a]P (Flesher et al., 1990). Il a été démontré chez le rat que cette bioalkylation était catalysée *in vivo* par une méthyltransférase S-adenosyl-L-méthionine dépendante (Flesher et al., 1983). Dans une deuxième étape, le groupe méthyle ainsi formé est oxydé pour former un groupe hydroxyméthyle. Il a été montré pour plusieurs hydrocarbures aromatiques que le métabolite hydroxyméthyle ainsi formé était capable de se lier *in vitro* à l'ADN en présence d'ATP (Rogan et al., 1980). L'esterification de la chaîne hydroxyle conduit par la suite, via le transfert d'un acétate ou d'un sulfate, à la formation d'un ester benzylique pouvant former des adduits stables à l'ADN (Okuda et al., 1989). Cette voie d'activation des HAP est illustrée dans le cas du B[a]P, Figure 10.

Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* chez le rat et la souris que l'activation du B[a]P et de ses dérivés méthyle et hydroxyméthyle conduit à la formation de deux adduits aralkyl-B[a]P de l'ADN (Suhr et al., 1989, Rogan et al., 1983). Les adduits aralkyles ainsi formés sont les N<sup>2</sup>-(benzo[a]pyrène-6-ylmethyl)-désoxyguanosine et le N<sup>6</sup>-(benzo[a]pyrène-6-ylmethyl)-désoxyadénosine, le premier étant l'adduit aralkyle majoritairement formé.

Il est important de noter ici qu'après méthylation, le métabolite méthyle-HAP ainsi formé peut être métabolisé aussi bien par la voie du radical cation que par la voie des diol-époxydes, produisant quelque soit la voie empruntée les mêmes adduits aralkyles B[a]P (Stansbury et al., 1994). La part de ces adduits aralkyles dans la formation des adduits stables du B[a]P est encore mal connue.

**L'activation du B[a]P en adduits à l'ADN met en jeu quatre voies d'activation distinctes, à savoir la voie des diol-époxydes, la voie du radical cation, la voie des O-quinones et la voie des esters benzyliques. Seules les deux premières voies d'activation ont été suffisamment étudiées pour être définitivement acceptées par la communauté scientifique. Parmi la multitude d'adduits du B[a]P, effectivement ou potentiellement formés par ces voies d'activation, les adduits diol-époxydes ont été les plus mesurés par la technique de post-marquage au <sup>32</sup>P. Bien que très répandue, cette technique est limitée à l'analyse des adduits stables des HAP. La démonstration par Cavalieri et al. de**

l'existence et de la prédominance des adduits dépurinés *in vitro* et *in vivo* montre que l'étude des adduits à l'ADN dits stables ne porte que sur 1/5 des adduits totaux produits. La diversification des techniques de mesure des adduits à l'ADN et un effort d'identification apparaît donc nécessaire à l'élucidation de leur signification biologique.

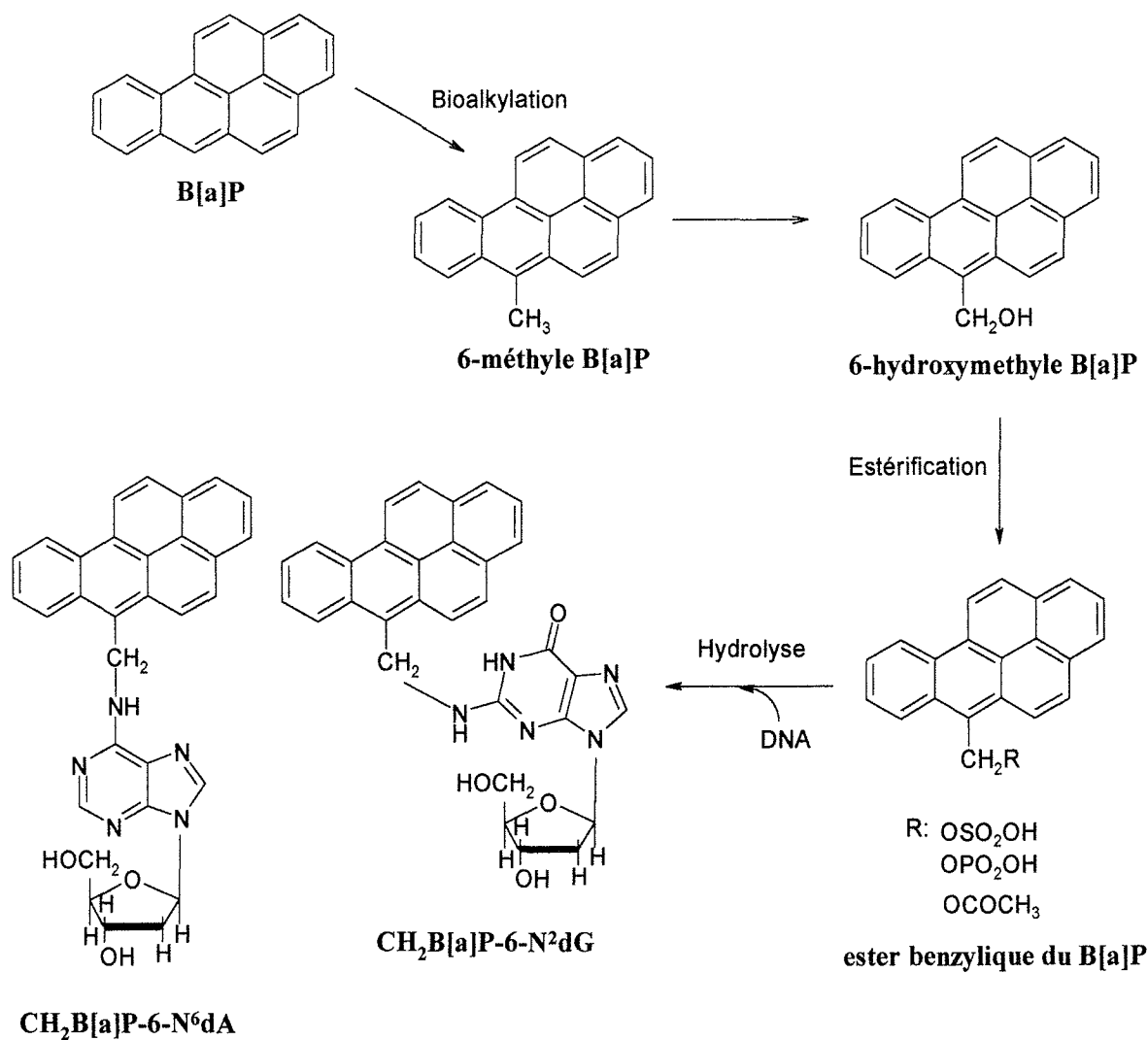


Figure 10: Voie des esters benzyliques du B[a]P (d'après Stansbury et al., 1994).



## Signification biologique des adduits à l'ADN

### I. Les étapes de la cancérogenèse chimique

La cancérogenèse qualifie l'ensemble des processus impliqués dans le développement du cancer. On la qualifie de chimique lorsqu'elle est induite par le métabolisme ou non, de composés exogènes, souvent des xénobiotiques, par l'organisme exposé. Trois étapes distinctes ont ainsi été identifiées dans le processus du cancer : l'initiation, la promotion et la progression (Figure 11) (Barrett, 1992).

La phase d'initiation est due à une altération du matériel génétique de la cellule résultant soit de la fixation covalente de molécules chimiques à l'ADN, soit d'une modification de la structure de ce dernier par des cancérogènes chimiques ou physiques (cassures simples et double brins, formation de sites apuriniques et apyrimidiniques, pontages inter et intra-brins). La formation d'adduits à l'ADN est considérée dans le cas des HAP comme un événement clef de l'initiation de la cancérogenèse chimique (Miller, 1970, Miller et Miller, 1981). Cette altération du matériel génétique peut conduire, lorsqu'elle n'est pas réparée ou mal réparée par les systèmes de réparation de l'ADN, à une mutation stable après deux ou plusieurs réplifications cellulaires. La phase d'initiation peut-être induite par une seule dose. Considérée comme irréversible, son efficacité dépend néanmoins de plusieurs facteurs dont les mécanismes d'activation et de détoxification des procancérogènes, l'efficacité des systèmes de réparation de l'ADN et le renouvellement cellulaire. L'initiation n'est cependant pas suffisante pour induire une transformation tumorale.

La deuxième étape est la phase de promotion tumorale pendant laquelle les cellules initiées qui présentent le génotype altéré, vont se multiplier et exprimer le phénotype modifié. Cette multiplication cellulaire est initiée sous l'action de facteurs exogènes ou endogènes, appelés promoteurs. Ces promoteurs, rapportés comme étant peu voire non cancérogènes, sont capables d'augmenter les effets du cancérogène lorsqu'ils sont administrés postérieurement et de façon prolongée. Leur action est issue d'une prolifération de la population de cellules initiées par stimulation de la synthèse d'ADN et de l'expression des gènes. Il en résulte la formation d'un foyer prénéoplasique puis d'une tumeur bénigne. La phase de promotion est réversible, les cellules cancéreuses pouvant régresser après destruction par des réactions immunologiques (Pitot, 1990).

La dernière étape est l'étape de progression caractérisée par l'évolution des tumeurs bénignes vers un phénotype malin irréversible. Le phénotype des cellules néoplasiques est très modifié. Les changements observés portent sur leurs caractéristiques de croissance, leurs réponses aux substances régulatrices de croissance, leur capacité à former des métastases et leurs activités biochimiques. L'acquisition d'un caractère immortel, permet aux cellules de progresser vers la malignité par perte ou inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs et/ou activation de protooncogènes. Cette prolifération importante et anarchique de cellules anormales conduit par dissémination dans l'organisme à l'envahissement et à la destruction des tissus.

Le cancer apparaît donc comme une maladie de la différenciation cellulaire dont les mécanismes moléculaires sont aussi bien génétiques qu'épigénétiques. L'avancée des recherches sur les virus cancérogènes a révélé l'existence de «gènes de cancer» dans le patrimoine génétique des cellules saines de n'importe quel individu (Dulbecco, 1982). Ces gènes classés en deux catégories, les gènes suppresseurs de tumeurs et les proto-oncogènes, sont responsables du contrôle de la multiplication et de la différenciation cellulaire.

## II. Les «gènes de cancer»

Il est actuellement bien établi que des événements génétiques, plus précisément des mutations génétiques ou chromosomiques, interviennent dans la cancérogenèse. Deux classes de gènes constituent des cibles critiques pour ces mutations :

- Les proto-oncogènes : ce sont des gènes qui, après mutations, peuvent présenter des altérations de structure et/ou un dysfonctionnement de leur régulation, facilitant ainsi la prolifération cellulaire et la formation de tumeurs. Ces gènes ont un rôle positif dans le processus de développement du cancer lorsqu'ils sont mutés.
- Les gènes suppresseurs de tumeurs : à l'opposé des précédents, ils ont un effet négatif en bloquant la transformation cellulaire et en conditionnant le retour des cellules vers un état normal. Néanmoins, leur perte ou leur inactivation par mutations favorise le développement du cancer.

### II. 1. Les proto-oncogènes

Les proto-oncogènes sont des gènes qui dans les cellules normales jouent un rôle majeur dans le contrôle de la croissance et/ou de la différenciation cellulaire. Ils représentent un ensemble de gènes codant pour des éléments de transduction de signaux notamment des signaux mitogènes. Ils ont la capacité, lorsqu'ils sont activés, de devenir des oncogènes, c'est à dire des gènes capables de contribuer au passage des cellules d'un phénotype normal à un phénotype cancéreux. Le contrôle de la croissance, de la différenciation cellulaire et de la coordination intercellulaire ainsi perturbées conduit à une prolifération anarchique des cellules. Le nombre

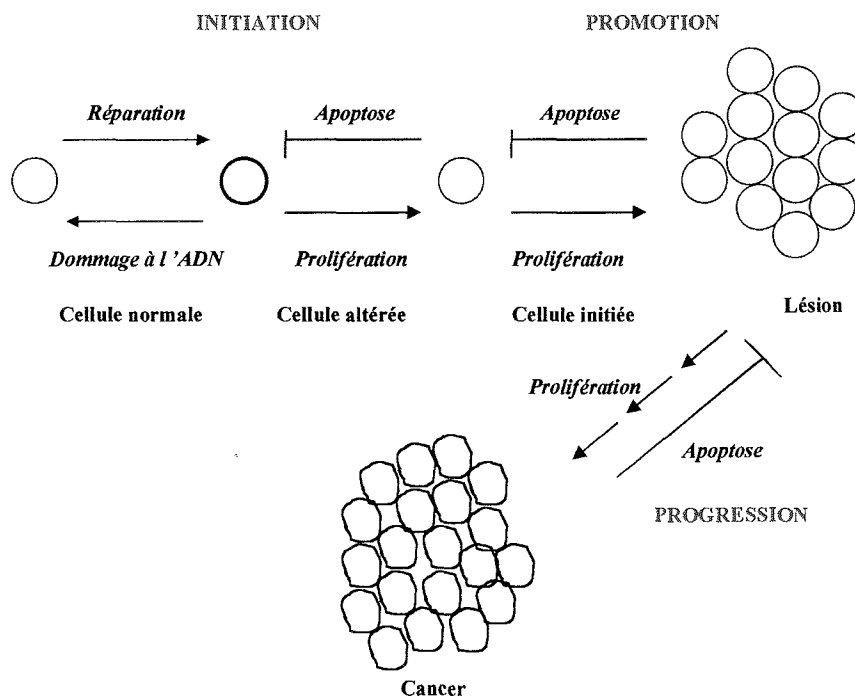


Figure 11 : Les différentes étapes de la cancérogenèse chimique (d'après Klaunig et al., 1998).

de proto-oncogènes potentiels d'une cellule de mammifère est estimé à plus de 300 mais des cibles préférentielles, comme les proto-oncogènes *ras*, ont été identifiées (Weinstein, 1987).

## II.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs

Ces gènes ont un rôle dans la répression de la prolifération cellulaire via la régulation du cycle cellulaire et de l'activité de certains gènes. Les protéines pour lesquelles ils codent peuvent avoir trois modes d'action différents. Elles peuvent bloquer le cycle cellulaire en fin de phase G1, juste avant la phase de synthèse de l'ADN. Elles peuvent également provoquer la différenciation des cellules anormales qui une fois différenciées ne peuvent plus se diviser. L'évolution des cellules anormales vers la sénescence ou l'apoptose est également attribuée à l'action des gènes suppresseurs de tumeurs.

Parmi ces gènes, le gène p53 a été très étudié. Il a été démontré *in vitro* que la protéine pour laquelle il code était capable de se lier à l'ADN, d'affecter sa transcription et de bloquer les cellules en phase G1 du cycle cellulaire (Levine et al., 1991, Lane, 1992). *In vivo*, les fonctions de cette protéine n'ont pas encore été élucidées, il semblerait néanmoins qu'en arrêtant la division cellulaire en phase G1, elle puisse augmenter le temps de réparation de l'ADN (Lane, 1992). Cette hypothèse semble être justifiée par l'observation d'une induction de l'expression du gène p53 dans des cellules exposées en culture à des cancérogènes chimiques et physiques connus pour leur capacité à endommager l'ADN (Lowe et al., 1993, Fritsche et al., 1993).

## III. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, inducteurs d'adduits à l'ADN

Les HAP ont été identifiés très tôt comme des substances procancérogènes chez les vertébrés, capables d'être métabolisés, dans l'organisme exposé, en espèces électrophiles pouvant se lier à l'ADN (tableau 1) (Flesher et Myers, 1991, Cavalieri et Rogan, 1992, Shaw et Connell, 1994). Parce que la formation d'adduits à l'ADN est considérée comme un événement initiateur du cancer, de nombreuses études ont tenté d'établir des corrélations entre le niveau d'adduits à l'ADN et l'apparition de tumeurs. Quelques-unes de ces études sont présentées ici.

### III.1. La formation d'adduits à l'ADN : événement clef de la mutagénicité et de la cancérogénicité des HAP

La mutagénicité des HAP a été très étudiée *in vitro* grâce à l'application du test d'Ames (Ames et al., 1973; MacCann et al., 1975, Sakai et al., 1985) et au développement de tests de mutagénicité sur culture cellulaire animale (Huberman et al., 1976). Quelques méthodes permettent aujourd'hui l'étude *in vivo* des mutations induites par des composés chimiques sur certains locus de rongeurs ou sur des marqueurs génétiques spécifiques de bactéries et d'animaux transgéniques (De Vries et al., 1997). L'avancée des connaissances sur l'activation métabolique des HAP en adduits à l'ADN a suscité l'investigation d'une relation de cause à effet entre la formation d'adduits et le pouvoir mutagène de ces polluants chimiques (Fahl et al., 1981).

#### III.1.1. Mutagénicité des adduits B[a]P stables

Le caractère mutagène des adduits stables produits par le métabolisme du B[a]P par la voie des diol-époxydes a particulièrement été étudié par l'équipe du professeur Loechler

Tableau 1 : Cancérogénicité comparative de quelques HAP parentaux ou de leurs métabolites pour la peau de souris et la glande mammaire de rat (Cavalieri et Rogan, 1992).

HAP testés	CANCEROGENICITE♣	
	Peau de souris	Glande mammaire de rat
dibenzo[ <i>a,l</i> ]pyrène-11,12-dihydrodiol	+++++	ND
5-methylchrysène	+++	-
dibenz[ <i>a,h</i> ]anthracène	+++	-
benz[ <i>a</i> ]anthracène	±	-
<b>benzo[<i>a</i>]pyrène-7,8-dihydrodiol</b>	++++	++
7-methylbenz[ <i>a</i> ]anthracène	+++	±
<b>8-fluorobenzo[<i>a</i>]pyrène</b>	+	+
<b>7-fluorobenzo[<i>a</i>]pyrène</b>	++	±
<b>10-fluorobenzo[<i>a</i>]pyrène</b>	-	+
4-fluoro-7,12-dimethylbenz[ <i>a</i> ]anthracène	+	++
dibenz[ <i>a,l</i> ]pyrène	+++++	+++++
<b>9-fluorobenzo[<i>a</i>]pyrène</b>	-	-
2-fluoro-7,12-dimethylbenz[ <i>a</i> ]anthracène	+	-
<b>benzo[<i>a</i>]pyrène</b>	++++	+++
7,12-dimethylbenz[ <i>a</i> ]anthracène	+++++	+++++
10-fluoro-3-methylcholanthrène	<b>ND</b>	++
8-fluoro-3-methylcholanthrène	<b>ND</b>	++
3-methylcholanthrène	++++	++++
<b>6-methylbenzo[<i>a</i>]pyrène</b>	+++	++
1,2,3,4-tetrahydro-7,12-dimethylbenz[ <i>a</i> ]anthracène	+++	+++++

♣ Extrêmement actif, +++++, très actif, +++++, actif, +++, modérément actif, ++, faiblement actif, +, très faiblement actif, ±, inactif, -, ND, non déterminée.

(Université de Boston, USA). Les mutations induites par le (+)-*anti*-BPDE ont été déterminées *in vivo* par transformation bactérienne, après adduction *in vitro*, du gène plasmidique supF d'*Escherichia coli*. Différents types de mutations ont ainsi été mis en évidence chez cet organisme dont 45% de mutations par substitution, 24% par inversion, 23% par insertion et 8% par délétion de paire de bases (Rodriguez et Loechler, 1993a, 1993b). Les mutations par substitution de paire de bases sont les mutations les plus fréquentes. Trois mutations ont ainsi été identifiées dans le gène sup F d'*E.coli*, GC → TA (57%), CC → AT (23%) et GC → CC (20%). La fréquence de chacune de ces mutations induites par le (+)-*anti*-BPDE a été démontrée comme étant dépendante de la séquence nucléotidique de l'ADN étudié (Loechler, 1995, Jelinsky et al., 1995, Shukla et al., 1999). Cette dernière semble déterminer la conformation de l'adduit dans la molécule d'ADN et ainsi son profil mutationnel. Les mécanismes qui aboutissent à ces mutations restent encore mal connus. On pense néanmoins que les adduits, lorsqu'ils ne sont pas ou mal réparés, conduisent, lors de la réplication de l'ADN, à l'apparition d'une mutation qui peut être fixée pendant la phase de

synthèse de ce dernier (Yang et al., 1982). Il a été démontré *in vitro* que la présence de l'adduit (+)-*anti*-BPDE pouvait entraîner une inhibition d'extension de la synthèse ainsi qu'une mauvaise lecture de l'ADN lors de sa réplication par l'ADN polymérase (Hruszkewycz et al., 1992). L'apparition de mutations dépend néanmoins de l'efficacité des systèmes de réparation de l'ADN et du temps de réparation qui leur sont impartis.

Plusieurs d'entre eux ont été identifiés dont les systèmes de réparation de l'ADN par excision de bases et de nucléotides (Base Excision Repair system et Nucleotide Excision Repair system, BER et NER respectivement) et le système de réparation des bases mal appariées de l'ADN (DNA mismatch repair system). On peut ajouter à ces mécanismes, l'activité exonucléasique 3' → 5' de l'ADN polymérase III qui peut exciser également les nucléotides mal appariés. Parmi ces mécanismes, le NER est reporté comme étant le mécanisme majoritaire de réparation des adduits stables (Figure 12). Des différences de réparation entre les adduits *trans* et *cis* du BPDE ont néanmoins été observées, l'adduit *trans* étant le plus efficacement réparé (Celotti et al., 1993). Ces différences de réparation ont été expliquées par l'importance de la structure tridimensionnelle de l'adduit dans la molécule d'ADN dont dépend l'accessibilité des enzymes de réparation (Jernström et Gräslund, 1994). Une autre étude a également démontré dans le gène humain de l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase (HPRT), une réparation préférentielle de l'ADN dans les régions transcrites de ce gène (Chen et al., 1991). Ce dernier résultat tendrait à restreindre le rôle des adduits stables du B[a]P dans la mutagenicité et la cancérogénicité de ce composé. Il a clairement été démontré néanmoins qu'une déficience en ces systèmes de réparation était responsable d'une augmentation de la fréquence mutationnelle et du risque de développement du cancer chez les rongeurs et l'homme (Sarasin, 1982, De Vries et al., 1997).

### III.1.2. Mutagenicité des adduits B[a]P dépurinés

Tout comme pour les adduits stables, la formation d'adduits dépurinés est également responsable de l'apparition de mutations. Ces mutations sont engendrées par une mauvaise réplication de l'ADN au niveau des sites abasiques produits lors de la perte des adduits dépurinés. Généralement ces sites abasiques, lorsqu'ils ne sont pas réparés, bloquent la progression des ADN et ARN polymérases, entraînant ainsi une perturbation de la réplication de l'ADN et de la transcription des gènes. Leur présence est en effet responsable de distorsions locales de la molécule d'ADN qui peuvent gêner l'activité des enzymes impliquées dans chacun de ces deux processus (Cuniassse et al., 1990). Dans certains cas, la présence d'un site apurinique non réparé peut néanmoins permettre une lecture de l'ADN endommagé par les ADN polymérases. La présence d'une telle lésion n'est néanmoins pas maîtrisée par les polymérases qui insèrent, par manque d'information, une base qui n'est pas toujours complémentaire de celle perdue par dépuration. Des erreurs de réplication ont ainsi été observées, *in vivo*, dans plus de 98 % des cas dans des cellules de singes transfectées avec un vecteur plasmidique porteur d'un site abasique unique (Gentil et al., 1992). Chaque site abasique peut donc résulter en une mutation génétique par substitution d'une base unique (Sagher et Strauss, 1983, Zhou et Doestch, 1993).

Le profil mutationnel de ces sites abasiques a été déterminé chez *E. coli* et chez des cellules de mammifères après induction de leur formation par chauffage de l'ADN. On note, d'une façon générale, que l'adénine est préférentiellement incorporée en face du site abasique chez les bactéries (Kunkel et al., 1983, Shaaper et al., 1983) alors que chez les cellules de mammifères les différentes bases de l'ADN sont insérées avec une fréquence similaire pour l'A (33%), la C (28%) et la T (26%), la G (~12%) étant insérée dans une moindre mesure

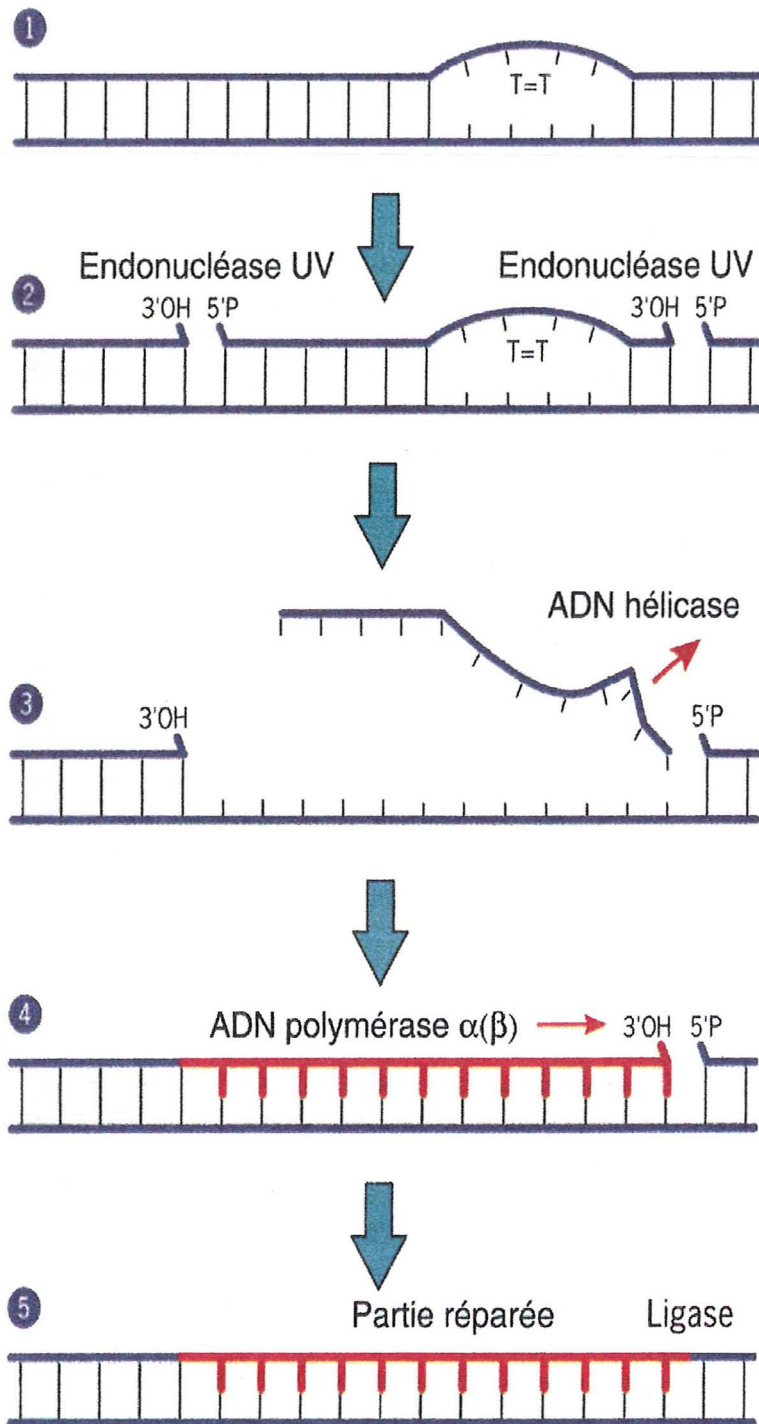


Figure 12: Mécanisme de réparation de l'ADN par excision de nucléotides (NER). 1: cas d'un fragment d'ADN contenant des dimères de pyrimidines, 2: incision par des endonucléases du brin d'ADN altéré de part et d'autre de la lésion, 3: clivage des liaisons hydrogène reliant l'oligonucléotide endommagé au brin complémentaire par une ADN hélicase, 4: remplissage de la brèche par une ADN polymérase, 5: soudage par une ADN ligase.

(Gentil et al., 1992). Comme nous l'avons vu précédemment dans le cas du B[a]P, les adduits HAP dépurinés se fixent préférentiellement sur la guanine. Il était donc intéressant de déterminer le type majoritaire de mutation que pouvait provoquer ce type d'adduits sur l'ADN. Chez *E. coli*, les ADN polymérases insèrent, par ordre préférentiel, en face de la guanine perdue, T (55 à 81%) > C (15 à 20%) ≥ A (4 à 25%) (Lawrence et al., 1990). Chez les cellules de mammifères, l'ordre d'insertion est différent avec A (41%) > T (37%) > C (22%) (Gentil et al., 1992). Ces erreurs de réplication conduisent donc à des mutations G → T et G → A lorsque A et T sont respectivement insérées en face de la G dépurinée (Figure 13).

Ils existent des systèmes de réparation efficaces de ce type de lésions à l'ADN. Chez des levures défectueuses en une enzyme de réparation de ces sites apuriniques, une forte augmentation de la fréquence des mutations induites par les agents alkylants a ainsi été observée (Ramotar et al., 1991). Ces lésions sont généralement réparées par le BER (Figure 14) dont deux voies de réparation ont été récemment identifiées, une voie rapide et une voie longue (Frosina et al., 1996). L'excision de la base modifiée est catalysée dans les deux cas par des ADN glycosylases spécifiques qui conduisent à la coupure de la liaison base-sucré. Dans le cas des adduits dépurinés HAP, l'excision de la base modifiée par les DNA glycosylases n'est pas toujours nécessaire, l'instabilité de ces adduits étant caractérisée par une dépurination spontanée. Sous l'action d'AP-endonucléases, la liaison sucré-phosphate est ensuite coupée en 3', conduisant ainsi à la formation d'un déoxyribose 5'-phosphate. Dans le

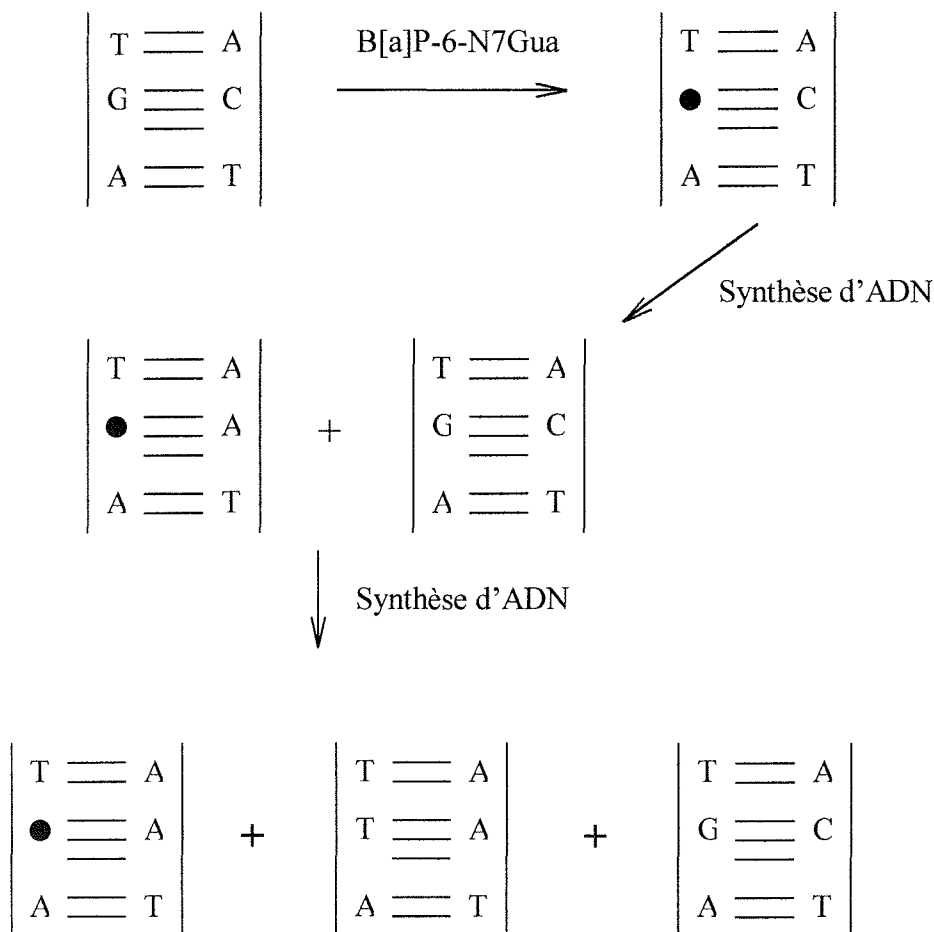


Figure 13: Exemple de mutation G → T induite par la présence d'un site apurinique : cas de l'adduit dépuriné B[a]P-6-N7Gua. ● : site apurinique.

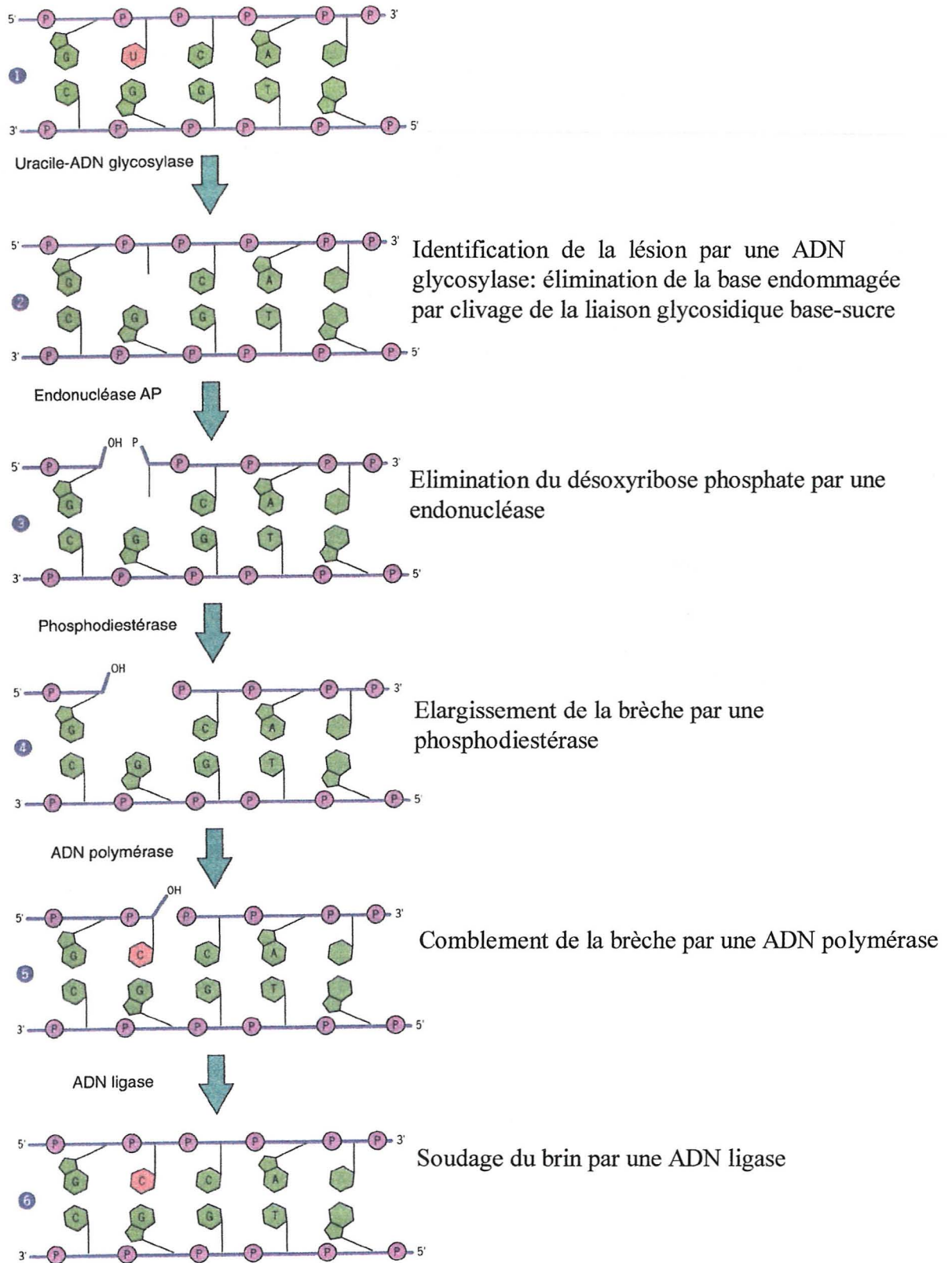


Figure 14: Mécanisme de réparation de l'ADN par excision de base (BER)



cas de la voie rapide, la brèche ainsi formée va être fidèlement réparée par les ADN polymérase I et  $\beta$ . La réparation sera donc limitée à un simple nucléotide. Dans le cas de la voie longue, la réparation concerne une séquence oligonucléotidique de 6 à 13 nucléotides incluant le site abasique. Une fois excisée cette séquence est fidèlement réparée par des ADN polymérase  $\delta$  et/ou  $\epsilon$  (Frosina et al., 1996).

### III.2. Mutations engendrées par les adduits HAP dans les «gènes de cancer»

Les HAP sont donc mutagènes de part leur capacité à former des adduits stables et dépurinés à l'ADN après activation métabolique. Les adduits B[a]P stables conduisent de façon majoritaire à la mutation par substitution de paire de bases GC  $\rightarrow$  TA, les adduits dépurinés à la mutation ponctuelle G  $\rightarrow$  T. De nombreuses études ont été réalisées en vue de vérifier l'hypothèse selon laquelle la cancérogénicité du HAP modèle, B[a]P, serait liée à sa capacité à induire des mutations dans les «gènes de cancer» (Bartsch, 1996). La spécificité mutationnelle des adduits du B[a]P dans le gène p53 et les gènes de la famille *ras* a donc été comparée au profil mutationnel retrouvé dans ces gènes chez les individus atteints de cancer. Ces études ont été réalisées chez des animaux de laboratoire dont le développement du cancer a été induit au B[a]P et chez des personnes cancéreuses pour lesquelles l'exposition à des HAP pouvait être suspectée comme un facteur étiologique de leur cancer.

#### III.2.1. Le gène suppresseur de tumeurs, p53

De nombreuses études ont démontré l'existence d'une relation entre la formation d'adduits à l'ADN et l'activité du gène p53 chez les mammifères. Bjelogrić et al. (1994) ont ainsi démontré pour la première fois *in vivo* sur de la peau de souris exposée au B[a]P, que l'augmentation de la synthèse de la protéine p53 était directement dépendante du niveau d'adduits BPDE à l'ADN. Par la suite, la démonstration du rôle du B[a]P dans un événement clef du processus du cancer, la prolifération cellulaire, a été obtenue chez des hamsters exposés à des particules de B[a]P-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Wolterbeek et al., 1995). Une corrélation entre le niveau d'adduits BPDE, l'induction de la prolifération cellulaire et l'expression de la protéine p53 a ainsi été démontrée dans les cellules trachéales des animaux exposés. L'exposition au B[a]P était ainsi suspectée pour provoquer la prolifération des cellules exposées via l'induction de mutations dans le gène p53.

La capacité des métabolites B[a]P-diol et B[a]P-diol-époxyde à induire des mutations dans le gène p53 a été démontrée *in vitro* sur des cellules humaines de patients atteints de la xérodémie pigmentée (maladie liée à une déficience des systèmes de réparation de l'ADN) (Quan et States, 1996). Cette étude a mis en évidence l'induction par le B[a]P de mutations G  $\rightarrow$  T prédominantes dans le gène p53. L'analyse des mutations induites sur plusieurs locus différents a également permis de mettre en évidence que les mutations n'étaient pas réparties de façon aléatoire sur les gènes étudiés mais dans des régions géniques bien particulières (« mutational hotspots ») dépendantes de la séquence, de la structure de la chromatine et de la dose appliquée. Parce que les mutations par substitution G  $\rightarrow$  T induites par le B[a]P sont caractéristiques des mutations retrouvées dans les cancers du poumon (Nigro et al., 1989, Hugsgafvel-Pursiainen et al., 1995), les résultats obtenus étaient pour lors d'une importance considérable pour la compréhension de la cancérogénèse chimique.

Puisieux et al. (1991) ont également démontré que les exons 5, 7 et 8 du gène p53, qui constituent les zones les plus sensibles à l'apparition de mutations dans le cas du cancer du poumon et du foie, étaient également pour 80% d'entre eux des cibles des BPDE. Dans cette étude, des mutations par substitutions de paire de base GC  $\rightarrow$  TA ont été majoritairement

associées à l'exposition au BPDE. Ces mutations représentent respectivement dans le cancer du poumon et le cancer du foie, 46% à 92% des mutations totales observées dans le gène p53. Il est intéressant de noter ici que des différences de profil mutationnel ont été observées chez l'homme dans ce gène en fonction du tissu cancéreux étudié.

Parce que les adduits B[a]P stables et dépurinés sont respectivement responsables de mutations GC → TA et G → T dans le gène p53, ces deux types d'adduits semblent avoir un rôle dans l'induction du cancer. La part respective de chacun de ces deux types d'adduits dans les mutations engendrées dans le gène p53 reste néanmoins mal connue. On rappellera néanmoins ici que les adduits dépurinés représentent plus de 80 % des adduits B[a]P totaux formés *in vitro* et *in vivo* chez les rongeurs.

### III.2.2. Les oncogènes *ras*

L'induction de tumeurs du poumon chez des souris par l'exposition au B[a]P a permis l'étude des mutations induites *in vivo* par le B[a]P dans l'oncogène *K-ras* (Reynolds et Anderson, 1991, Mass et al., 1993). Il a ainsi été démontré que le B[a]P pouvait induire dans ce gène différents types de mutation dans une zone bien spécifique, le codon 12. Les mutations observées dans ce codon, GGT → TGT (56%), GGT → GTT (25%) et GGT → GAT (19%), concernent toutes une mutation de la G. Plus de 80% d'entre elles constituent une mutation par substitution d'une base unique, G → T (Mass et al., 1993). Ce type de mutation dans l'oncogène *K-ras* est très représentée dans les adénocarcinomes du poumon chez l'homme puisqu'elle constitue jusqu'à 57 % des mutations totales du codon 12 (Hugsgafvel-Pursiainen et al., 1993). Des observations similaires ont été faites dans les codons 12, 13 et 61 d'un autre oncogène, l'oncogène *H-ras*, chez des patients atteints d'un cancer du larynx (Stern et al., 1993). Tout comme pour le gène p53, le spectre mutationnel induit par le B[a]P dans des zones spécifiques des oncogènes *K-* et *H-ras* présente des caractéristiques identiques à celles observées dans ces gènes lors d'études épidémiologiques.

De récentes études ont également démontré l'importance des adduits dépurinés dans les mutations induites par le B[a]P dans l'oncogène *H-ras* de papillomes (tumeurs bénignes de la peau) de souris (Colapietro et al., 1993, Chakravarti et al., 1995). Les modifications génétiques associées à ces tumeurs sont des mutations par substitution d'une base unique, GGA → GTA (25%), GGC → GTC (50-54%), CAA → CTA (15-20%), observées respectivement dans les 12<sup>ième</sup>, 13<sup>ième</sup> et 61<sup>ième</sup> codon de ce gène. Pour ce modèle animal, Chakravarti et al. (1995) ont étudié la relation qui pouvait exister, pour plusieurs HAP, entre les adduits à l'ADN, les adduits dépurinés et les mutations induites dans l'oncogène *H-ras*. Il a ainsi été observé une corrélation entre la formation d'adduits dépurinés et les mutations *H-ras* ainsi obtenues. Les adduits dépurinés du B[a]P, B[a]P-C8-Gua et B[a]P-N7-Gua (44% des adduits totaux formés), B[a]P-N7-Ade (30%) ont ainsi été respectivement associés à des mutations G → T et A → T. Pour ce même modèle animal, Chen et al. (1996) ont également démontré *in vivo* une corrélation entre l'initiation de tumeurs et le niveau d'adduits B[a]P dépurinés formés.

**L'ensemble des études présentées ici montre l'intérêt de la mesure des adduits HAP à l'ADN dans les études de bio-surveillance. Dans la mesure où leur formation constitue un événement crucial dans le développement du cancer, ils représentent un biomarqueur de génotoxicité potentielle de la cancérogenèse chimique induite par cette classe de polluants. L'activation métabolique des HAP en adduits à l'ADN étant très rapide, ils**

représentent également un biomarqueur d'exposition précoce à ces substances cancérigènes. On les qualifie donc plus généralement de biomarqueur potentiel d'exposition et d'effets des HAP.

Les adduits dépurinés semblent jouer un rôle important dans la cancérogenèse des HAP, d'autant plus qu'ils représentent la grande majorité des adduits formés. Leur mesure reste néanmoins limitée par la difficulté de synthèse d'adduits dépurinés standards et leur indisponibilité dans le commerce. Les données sur ces adduits sont donc encore très limitées. Leur étude, vraisemblablement plus étendue dans le futur, est très prometteuse pour la validation des adduits à l'ADN comme dosimètre d'exposition et de risque au développement du cancer.



## Les adduits à l'ADN : biomarqueur potentiel d'exposition et d'effets des HAP pour la biosurveillance de l'environnement marin.

### I. Niveau de contamination du milieu marin et observation de cancer chez les organismes exposés.

La présence de nombreux contaminants dans l'environnement marin, dont certains ont été identifiés comme cancérogènes pour l'homme et les rongeurs, a été à l'origine de leur suspicion dans de nombreuses pathologies et cancer, rencontrés de façon prédominante chez les organismes des zones polluées.

Une revue de Gardner (1993) récapitule les résultats de plusieurs études histopathologiques, réalisées chez les invertébrés marins, après exposition à de nombreux contaminants, dont les métaux lourds, les hydrocarbures aromatiques, les phénols et les composés nitrés. Les résultats des études de terrain et de laboratoire cités dans cet article mettent clairement en évidence une relation de cause à effet entre l'exposition à certains polluants et le développement de tumeurs et de pathologies chez les organismes exposés. Il en est le cas pour les mollusques lamélibranches lors de l'exposition, *in situ*, aux HAP et au pétrole brut. La marée noire associée au naufrage de l'Amoco Cadiz a ainsi été identifiée comme étant responsable de lésions histopathologiques chez l'huître (Berthou et al., 1987). Cette relation fut confirmée au laboratoire par l'induction de tumeurs après exposition de cet organisme à un sédiment contaminé aux HAP (Gardner et al., 1991) ou à une mixture de polluants (HAP, PCB, hydrocarbures chlorés, métaux lourds) (Gardner et al., 1992). Chez la moule, l'association de pathologies avec le degré de contamination du milieu a été démontrée *in situ* et au laboratoire. L'exposition *in situ* à un gradient de contamination au cuivre et à des huiles diesel d'origine industrielle, résulte en la formation de granulocytomas dans les tissus interstitiels des animaux exposés (Auffret, 1988). L'exposition au laboratoire à un sédiment contaminé aux HAP induit également l'apparition de tumeurs ainsi que de nombreuses pathologies des tissus de la reproduction chez *Mytilus edulis* (Yevich et al., 1987).

Chez les poissons, des études plus poussées ont permis d'étendre la théorie de la cancérogenèse chimique, préalablement développée chez les rongeurs et l'homme, aux organismes marins. Chez plusieurs espèces de poissons benthiques (limande, flet, sole anglaise) vivants dans des zones polluées, certaines lésions hépatiques dont des néoplasmes, des foyers préneoplasiques et des lésions dégénératives/nécrotiques ont été observées (Myers et al., 1994). *In situ*, une corrélation entre la formation de néoplasmes et la concentration en HAP du sédiment a également été démontrée chez ces poissons (Landahl et al., 1990, Myers et al., 1994). Cette relation a été confirmée au laboratoire par l'induction de ce type de lésions par l'exposition à certains HAP dont le B[a]P (Hendricks et al., 1985, Fong et al., 1993).

Aux Etats-Unis, un grand programme national (National Benthic Surveillance Project) de la NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) a permis dès le début des années 80, la collecte de nombreuses données histopathologiques concernant les poissons benthiques de la côte Pacifique (Stein et al., 1993, 1994, Myers et al., 1994). La mise en parallèle du résultat de ces examens histopathologiques avec le niveau de contamination du sédiment et du contenu stomacal en HAP et PCB a ainsi été réalisée pour plusieurs espèces de poisson, marines, saumâtres et dulçaquicoles. L'implication de la contamination de l'environnement dans l'étiologie des lésions observées fut ainsi confirmée par l'identification de plusieurs facteurs de risque dont la concentration du sédiment et du contenu stomacal en HAP, PCB, DDT et ses dérivés. Des différences de sensibilité à chacun de ces facteurs ont été observées en fonction de l'espèce, de l'âge des poissons étudiés (Myers et al., 1994) et de la présence

d'infections naturelles (Kirby et Hayes, 1992, Kirby et al., 1995). C'est la découverte parallèle de l'activation d'oncogènes k-ras dans les lésions néoplasiques de ces poissons qui a permis de valider un modèle de cancérogenèse chimique identique à celui des rongeurs et de l'homme (Wirgin et al., 1989, Mac Mahon et al., 1990, Fong et al., 1993).

L'avènement de la technique de post-marquage au  $^{32}\text{P}$  (Annexe I) et l'avancée des connaissances sur la signification biologique des adduits à l'ADN, ont suscité un grand intérêt pour l'utilisation de ce type de dommages dans les études de biosurveillance de l'environnement marin (Harvey et al., 1997, JAMP, 1998). En raison de la relation qui semble exister entre le niveau d'adduits HAP à l'ADN et l'induction de tumeurs, les adduits à l'ADN sont très vite devenus un biomarqueur de génotoxicité très prometteur de cette classe de polluants de l'environnement marin (Pfau, 1997).

## II. Les adduits à l'ADN chez les poissons

### II. 1. Les systèmes de biotransformation

Chez les poissons, l'existence de processus de biotransformation similaires à ceux des mammifères a été très documentée (James, 1987, Stegeman, 1989, Stegeman et al., 1990, Stegeman et Lech, 1991, Goksøyr et Förlin, 1992). Plusieurs isoformes du cytochrome P450 furent ainsi identifiées dont une isoforme présentant de grandes similarités immunologiques, catalytiques et de séquence avec la protéine CYP1A des mammifères (Goksøyr et Förlin, 1992). Comme chez les mammifères, le CYP1A de poisson peut être induit par les deux classes de polluants majoritairement rencontrés dans le milieu marin, les HAP et les PCB plans. Le CYP1A et les activités enzymatiques qui lui ont été associées ont donc été très étudiés chez les poissons dans le cadre notamment du développement de biomarqueurs d'exposition.

L'induction de la synthèse de protéines CYP1A avec l'exposition aux HAP, PCB et pesticides organochlorés a été observée, par immunodétection, *in situ* et au laboratoire, chez plusieurs espèces de poissons (Smolowitz et al., 1992, Van der Oost et al., 1993). Après exposition aux HAP et aux PCB, l'induction de nombreuses activités enzymatiques associées au CYP1A fut également observée. Une relation entre l'induction des activités MFO (EROD, PROD) et la concentration tissulaire en PCB fut ainsi démontrée *in situ* (Van der Oost et al., 1993). Au laboratoire, la bioaccumulation de PCB par la colonne d'eau ou le transfert trophique résulte chez *Zosteris ophiocephalus* en une induction des activités MFO dont la BPH (Nasci et al., 1991). Dans le cas des HAP, une corrélation entre l'activité EROD et le log de la concentration en HAP du sédiment a été démontrée *in situ* chez le serran (Narbonne et al., 1991). L'induction de l'activité AHH (aryl-hydroxylase) fut également observée chez des poissons issus de sites contaminés aux HAP (Collier et al., 1993). Au laboratoire, l'injection intrapéritonéale de B[a]P et l'exposition via la colonne d'eau à des huiles diesel résultent en une induction des activités B[a]PMO chez la carpe (Kurelec et al., 1991, Britvic et al., 1993).

Ces quelques études montrent que chez les poissons, le dosage des protéines CYP1A et la mesure de certaines activités enzymatiques de phase I constituent des biomarqueurs d'exposition potentiels aux HAP et PCB. Comme chez les mammifères, les poissons présentent des systèmes de biotransformation efficaces leur permettant le métabolisme des xénobiotiques présents dans leur environnement. L'activation du B[a]P en espèces électrophiles a été démontrée chez les poissons (Kurelec et al., 1991, Nishimoto et al., 1992, Schnitz et O'Connor, 1992) pour lesquels on suppose l'existence de voies d'activation en adduits à l'ADN aussi complexes que celles des mammifères (Maccubin, 1994).

## II. 2. Les résultats clefs des études de terrain et de laboratoire sur la mesure des adduits HAP chez les poissons.

L'application de la technique de post-marquage au  $^{32}\text{P}$  a permis la détection *in situ* de niveaux d'adduits à l'ADN plus élevés chez les poissons des sites contaminés que chez les poissons du/des site(s) de référence, ces derniers présentant parfois un niveau d'adduits inférieur à la limite de détection de cette technique (Van der Oost et al., 1994, Ericson et al., 1995, Burgeot et al., 1996). Ces observations ont été confirmées par la démonstration pour plusieurs espèces de poissons, benthiques, marines ou d'eaux douces, d'une corrélation entre le niveau d'adduits à l'ADN hépatique et la concentration du sédiment en HAP (Dunn et al., 1987, Stein et al., 1989, Collier et al., 1993, Van der Oost et al., 1994).

Au laboratoire, plusieurs études ont également démontré l'utilisation possible, chez les poissons, des adduits à l'ADN comme biomarqueur d'exposition aux HAP. L'injection intrapéritonéale de B[a]P (Varanasi et al., 1989a, Sikka et al., 1990, 1991) ou d'un extrait de sédiment contaminé aux HAP (Varanasi et al., 1989b, Reichert et al., 1991) induit la formation d'adduits à l'ADN chez le poisson-chat, la sole anglaise et le flet. Une étude de French et al. (1996) montre également que l'exposition de soles anglaises à un gradient de sédiment contaminé aux HAP induit la formation d'adduits à l'ADN hépatique de façon linéaire avec le temps d'exposition et la concentration en HAP du sédiment. Il est intéressant de noter que le profil des adduits HAP obtenus sur le terrain et au laboratoire chez les poissons présente de grandes similarités avec le profil induit par cette même classe de polluants chez les rongeurs (Maccubin, 1994). Varanasi et al (1989a) furent les premiers à démontrer *in vivo* la formation d'adduits *syn*- et *anti*-BPDE-10-N2dG chez les poissons, l'adduit BPDE-10-N2dG étant comme chez les rongeurs l'adduit stable majoritairement formé.

Chez les poissons, plusieurs facteurs déterminants pour le niveau d'adduits à l'ADN observé ont été identifiés dont l'existence de différences inter-espèces. Pour des conditions d'exposition identiques, des différences dans le niveau de fixation covalente du B[a]P à l'ADN ont ainsi été observées entre le flet et la sole anglaise (Varanasi et al., 1986). Ces différences entre espèces peuvent être expliquées par l'existence de différences dans les activités de biotransformation. En effet, l'induction de certaines isoformes du cytochrome P450 (CYP1A) et de leurs activités enzymatiques a une influence directe sur le niveau d'adduits formés (Ploch et al., 1998, Watson et al., 1998). Plusieurs études tendent néanmoins à démontrer que ces différences sont surtout liées à l'activité des enzymes de conjugaison (James et al., 1994).

Le calcul, pour plusieurs espèces de poissons, d'un indice de liaison du B[a]P à l'ADN ( $\text{pmol B[a]P/ mg ADN} / (\text{Dose, } \mu\text{mol/kg})$ ), a mis également en évidence au cours de plusieurs études, l'importance de plusieurs autres facteurs (James et al., 1995). Ainsi, le choix du tissu et de la voie d'exposition est déterminant pour le niveau d'adduits observé : la mesure des adduits dans le foie après injection intrapéritonéale conduit à l'observation d'un niveau d'adduits maximal. D'autres facteurs comme l'âge, le sexe, la température et l'alimentation mériteraient également d'être étudiés.

## II. 3. Persistance des adduits à l'ADN

Plusieurs études de laboratoire ont démontré le caractère persistant des adduits à l'ADN chez les poissons. Une étude sur la réparation des adduits B[a]P à l'ADN a démontré l'absence

d'une diminution du niveau d'adduits formés chez la sole anglaise, 60 jours après injection (Varanasi et al., 1989a). Chez le flet, l'injection unique d'un extrait de sédiment contaminé par les HAP a induit la formation d'adduits à l'ADN dont environ 30% étaient toujours présents 84 jours après l'exposition (Stein et al., 1993). Le résultat de ces études fut confirmé par la suite pour d'autres espèces (Sikka et al., 1991). L'explication du caractère persistant des adduits à l'ADN chez les poissons est difficile car la connaissance de leurs systèmes de réparation de l'ADN est limitée. Quelques données *in vitro* et *in vivo* ont néanmoins été obtenues par la mesure des irrégularités de synthèse de l'ADN (Unscheduled DNA synthesis, UDS), indicatrice des systèmes de réparation par excision.

L'existence d'une faible activité des systèmes de réparation de l'ADN a été mis en évidence, *in vitro*, dans des cellules hépatiques, intestinales et stomacales de truite arc-en-ciel après exposition à des cancérogènes chimiques (Walton et al., 1984). *In vivo*, des systèmes de réparation des dommages à l'ADN induits par rayonnement UV ou par exposition à des agents alkylants ont été démontrés chez une autre espèce de poisson par cette même technique (Ishikawa et al., 1984). L'investigation chez les poissons de systèmes de réparation plus spécifiques a été limitée à la O<sup>6</sup>-alkylguanine transférase dont l'activité permet l'élimination de l'adduit O<sup>6</sup>-alkylguanine. Alors qu'*in vitro* son activité chez les poissons a été rapportée comme étant similaire à celle mesurée chez le rat, cette activité s'est révélée inefficace pour l'élimination de la O<sup>6</sup>-alkylguanine chez la truite (Maccubin, 1994). D'une façon générale, la persistance des adduits à l'ADN chez les poissons tend à être associée à de faibles activités de réparation de l'ADN (Maccubin, 1994, French et al., 1996).

**L'ensemble des études présentées sur la formation des adduits HAP à l'ADN chez les poissons benthiques, légitime l'utilisation des adduits à l'ADN comme biomarqueurs d'exposition et d'effets aux HAP. Quatre types d'observations majeures ont motivé ce choix et encouragé par la suite la mesure des adduits à l'ADN chez certaines espèces de bivalves dont en particulier la moule :**

- 1) le niveau d'adduits à l'ADN hépatique des poissons benthiques est corrélé à la concentration en HAP du sédiment.
- 2) le niveau d'adduits à l'ADN augmente avec le temps d'exposition aux HAP. Les adduits à l'ADN peuvent donc être considérés comme un indice d'exposition cumulative aux HAP, du vraisemblablement à une déficience présumée des systèmes de réparation de l'ADN.
- 3) l'induction d'adduits à l'ADN est rapide, leur formation peut donc être considérée comme un biomarqueur d'exposition précoce aux HAP.
- 4) en raison de leur rôle dans la cancérogenèse chimique chez l'homme et les rongeurs, on peut les considérer également comme un biomarqueur de génotoxicité aux HAP.



### III. Les adduits à l'ADN chez la moule : bilan des connaissances

#### III. 1. Existence d'un cytochrome P450 chez *Mytilus sp.*

La présence d'activités MFO P450-dépendantes chez la moule est établie et très utilisée en biosurveillance de l'environnement marin (Livingstone et Farrar, 1984, Livingstone, 1991, Michel et al., 1998, Solé et al., 1996, 1998). Néanmoins, la démonstration, au niveau moléculaire, de l'existence d'un cytochrome P450 chez la moule est récente et partielle. Jusqu'à présent aucune séquence génétique n'a pu être encore déterminée chez cet organisme.

##### III. 1. 1. Evidences biochimiques de l'existence d'un cytochrome P450 chez la moule

###### *Présence d'activités MFO :*

De nombreuses activités MFO ont été observées chez la moule grâce au développement, *in vitro*, de méthodes de mesure de ces activités enzymatiques (Stegeman, 1985, Livingstone, 1988, 1991, Michel et al., 1993). Multiples et variées (Tableau 2), elles catalysent de nombreuses réactions chimiques (oxydation, réduction, hydrolyse, hydratation..) qui permettent l'introduction d'un groupement fonctionnel (-OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH..) à la molécule endogène ou de xénobiotique. Ces réactions facilitent ainsi leur élimination. Parmi ces activités enzymatiques, dites de phase I, certaines d'entre elles ont été très étudiées chez la moule en raison de la démonstration, au laboratoire et sur le terrain, de leur potentialité d'utilisation en biosurveillance. La benzo[a]pyrène hydroxylase (BPH) et la NADPH cytochrome c réductase ont été les plus mesurées. Le tableau 3 récapitule, pour chacune de ces activités, quelques-uns des résultats qui ont permis, malgré l'observation de quelques contradictions, leur proposition en tant que biomarqueurs potentiels d'exposition aux HAP pour les études de biosurveillance (ICES, 1997). Bien que mesurées chez la moule, ces activités n'en restent pas moins putatives puisque aucune des protéines responsables de ces activités n'a été isolée chez la moule.

###### *Identification d'une hémoprotéine similaire à celle des vertébrés :*

La présence d'une hémoprotéine, ayant des caractéristiques spectrales similaires à celles du cytochrome P450 des vertébrés, a été observée dans les microsomes de glande digestive de moule (Gilewicz et al., 1984, Livingstone et Farrar, 1984, Stegeman, 1985, Livingstone et al., 1989b). Par différence spectrale au monoxyde de carbone, plusieurs pics d'absorption furent ainsi mis en évidence selon la méthode d'Eastabrook et Werringloer (1978). Alors que chez les vertébrés le pic d'absorption maximale est obtenu à 450 nm, un pic légèrement décalé, entre 447 et 452 nm, est observé chez la moule. Chez cet organisme, un deuxième pic d'absorption entre 416 et 424 nm est également détecté. Le rôle de l'haémoprotéine associée à ce pic, communément appelé le pic-'416' ou le pic-'418', n'a pas encore été identifié. On pense néanmoins que cette deuxième haémoprotéine pourrait être une forme dénaturée du cytochrome P450 chez la moule ou une protéine indépendante de type peroxydase (Livingstone et Pipe, 1992).

Nous verrons par la suite que la purification partielle d'un cytochrome P450 chez la moule a permis de délimiter avec plus de précision ces pics caractéristiques d'absorption maximale : entre 449 et 447 nm pour le premier pic et entre 409 et 412 nm pour le deuxième (Porte et al., 1995).

###### *Immunodétection de protéines CYP-«like» chez la moule :*

La méthode de purification partielle du cytochrome P450 chez la moule fut initialement développée par Kichin et al. en 1987. Ce n'est que 8 ans plus tard que fut démontrée pour la

Tableau 2: Activités MFO rapportées chez *Mytilus sp* (d'après Livingstone, 1991).

Espèce	Activités MFO
<i>Mytilus edulis</i>	Benzo[a]pyrène hydroxylase Diméthylaniline N-déméthylase Biphényle hydroxylase 7-Ethoxycoumarine O-dééthylase 7-Ethoxyresorufine O-dééthylase Benzphétamine N-déméthylase Testostérone hydroxylase Aldrine epoxydase Acide arachidonique hydroxylase Acide laurique hydroxylase NADPH cytochrome c réductase
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Benzo[a]pyrène hydroxylase Diméthylaniline N-déméthylase Aminopyrène N-déméthylase 7-Ethoxycoumarine O-dééthylase NADPH cytochrome c réductase
<i>Mytilus californianus</i>	Aldrine epoxydase Antipyrine hydroxylase p-Nitroanisole O-déméthylase p-Chloro-N-méthylaniline N-déméthylase

première fois, par Western Blot, l'immuno-reconnaissance par un anticorps anti-CYP1A de perche (*Perca fluviatilis*) d'une forme partiellement purifiée de CYP chez *Mytilus edulis* (Porté et al., 1995). La reconnaissance d'un épitope CYP1A-«like» dans les microsomes de la glande digestive légitimait ainsi l'existence d'une telle protéine chez la moule. Par la suite, plusieurs études démontrèrent l'existence d'autres protéines CYP-«like» chez cet organisme. L'utilisation d'anticorps anti-CYP1A de perche (*Perca fluviatilis*), anti-CYP3A de truite (*Oncorhynchus mykiss*), et anti-CYP2B, anti-CYP2E et anti-CYP4A de rat, a permis ainsi de démontrer la présence de protéines CYP1A-, CYP2E-, CYP2B-, CYP3A- et CYP4A-«like» dans les microsomes de la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* (Peters et al., 1998). L'analyse par Western Blot en présence de standards de poids moléculaire et l'amélioration des techniques de purification ont permis ainsi de déterminer le poids moléculaire de chacune des protéines isolées (Tableau 4).

La présence de telles protéines rend ainsi tout à fait probable l'existence de gènes *CYP1A1*, *CYP2E*, *CYP2B*, *CYP3A* et *CYP4A*, similaires à ceux des vertébrés chez *Mytilus sp*. Néanmoins, l'interprétation de ces résultats est à prendre avec précautions car la reconnaissance d'un épitope commun pour chacun de ces anticorps ne peut être exclue. De plus, une protéine CYP peut avoir plusieurs épitopes reconnaissables par une grande variété d'anticorps. Il est ainsi difficile d'affirmer si les bandes CYP1A1, CYP4A, CYP3A et CYP2B obtenues respectivement à 43, 44, 45 et 44 kDa correspondent à une même et unique protéine ou à 4 protéines de poids moléculaire similaire.

Tableau 3 : Observation *in situ* et au laboratoire de l'induction des activités BPH et NADPH cytochrome c réductase chez *Mytilus sp.*

Activité	Type d'exposition	Observations	Auteurs
Benzo[a]pyrène hydroxylase	Exposition 48 h au 3-MC (1mg/moule, colonne d'eau)	Augmentation significative de l'activité BPH	Michel et al., 1994
	<i>In situ</i>	Discrimination des différents sites en fonction de leur degré de pollution	Michel et al., 1994, 1998
	<i>In situ</i>	Discrimination des sites en fonction de leur degré de pollution. Corrélation avec le niveau de protéines CYP1A-like	Peters et al., 1998
	<i>In situ</i>	Discrimination des sites. Corrélation de la BPH avec la concentration en HAP de la moule entière	Solé et al., 1998
	<i>In situ</i>	Pas de variation entre les différents sites étudiés. Pas de corrélation avec la concentration en HAP de la glande digestive	Nasci et al., 1989
NADPH cytochrome c reductase	Exposition au laboratoire à du B[a]P et au TCB (0 – 0,7 µmol/l/moule)	Augmentation significative de l'activité pour des doses de 0.4 et 0.7 µmol B[a]P/l/moule et 0.7 µmol TCB/l/moule	Michel et al., 1993
	<i>In situ</i>	Pas de variation de cette activité entre les sites	Nasci et al., 1989
	<i>In situ</i>	Corrélation entre l'activité et la concentration tissulaire en HAP	Solé et al., 1994, 1996

3-MC : 3-méthylcholanthène, TCB : 3,3',4,4'-tetrachlorobiphényle.

### III. 1. 2. Evidences moléculaires de gènes *CYP* chez la moule

L'évidence moléculaire de la présence de plusieurs gènes *CYP* chez la moule fut apportée par Wootton et al. en 1995. Dans cette étude, des sondes cDNA de différentes familles de gènes *CYP* (*CYP1A1*, *CYP3A*, *CYP4A1*, *CYP11A*) furent utilisées chez la moule pour le screening de l'ARN total par Northern Blot et de l'ADN génomique par Southern Blot. Par ces deux techniques, l'existence de chacun de ces gènes fut donc investie à deux niveaux moléculaires

différents : au niveau de la séquence génomique en elle-même et de façon indirecte par la mise en évidence de la transcription de ces gènes en ARNm (Tableau 4).

L'analyse par Northern Blot, montre, pour chacune des sondes testées, une hybridation unique caractérisée par la reconnaissance d'une séquence d'ARNm de 2.1 kb. En raison des conditions de faible stringence imposées lors de l'hybridation, ce résultat tend à démontrer l'expression chez la moule de gènes ayant de fortes homologues de séquence avec les gènes *CYP1A1*, *CYP3A*, *CYP4A1* et *CYP11A* de vertébrés. L'analyse par Southern Blot n'a été concluante que pour les sondes *CYP3A* et *CYP11A1* dont le résultat n'a fait que confirmer l'existence de gènes similaires chez la moule. L'absence d'hybridation en Southern Blot des sondes *CYP1A1* et *CYP4A1* est peut être liée à une divergence plus importante de cette famille de gènes au cours de l'évolution, responsable ainsi d'une homologie de séquence moindre entre les gènes de vertébrés et ceux des mollusques.

On notera ici que la présence supposée du gène *CYP1A*-«like» est en accord avec la capacité de métabolisme du B[a]P chez la moule. Il en est de même pour les gènes *CYP3A*- et *CYP4A*-«like» pour lesquels des activités catalytiques spécifiques de ces familles de gènes, respectivement l'acide arachidonique hydroxylase et la 6-A testostérone hydroxylase, ont été observées chez la moule (Wootton et al., 1995).

La modulation de l'expression du gène *CYP1A* a été particulièrement étudiée en raison de son induction possible, chez les vertébrés et les poissons, par des xénobiotiques présents dans le milieu marin. L'étude de la modulation de l'expression du gène *CYP1A* chez les poissons a même permis la proposition de son utilisation en routine pour les études de biosurveillance de l'environnement marin. Des études similaires ont été conduites dans le même but chez la moule, selon deux approches différentes : l'étude du degré de transcription en mRNA de ces gènes ou l'étude de la variation du contenu en protéines CYP-«like». Outre des variations saisonnières observées dans la teneur en *CYP1A*-, *CYP3A* et *CYP4A*-«like» mRNA (Wootton et al., 1996), la modulation de l'expression du gène *CYP1A*-«like» fut mise en évidence avec le niveau de contamination du milieu (Wootton et al., 1995). Dans cette dernière étude, des différences dans le contenu en *CYP1A*-«like» mRNA de la glande digestive furent en effet observées entre deux populations de moules issues de sites de niveau de contamination différent.

L'étude de la modulation de ce gène par la détection immunochimique de la protéine *CYP1A*-«like» fut préférentiellement appliquée de par la disponibilité d'anticorps anti-CYP de vertébrés et la simplicité relative du Western Blot. Une étude *in situ* réalisée sur la côte de la Gallice (Espagne), 6 mois après la marée noire de l'«Aegean Sea», mit ainsi en évidence des niveaux de protéines *CYP1A*-«like» plus élevés dans les sites contaminés aux HAP que dans le site de référence (Solé et al., 1996). Une corrélation a ainsi été mise en évidence chez la moule entre le contenu en protéines *CYP1A* de la glande digestive et la concentration en HAP de ce tissu. Des observations similaires ont été mises en évidence par Peters et al (1998). Lors d'une étude de terrain dans le lagon de Venise, des niveaux supérieurs de 50%, 60%-275% et 300% en protéines *CYP1A* (48 kDa)-, *CYP4A* (50.9 kDa, 44.1 kDa)- et *CYP2E* (52 kDa)-like ont ainsi été observés chez les individus du site contaminé par rapport à ceux du site de référence. Au cours de cette étude, une expérience de transplantation d'animaux du site de référence vers le site contaminé, a également démontré, après 3 semaines, une augmentation du contenu en protéines *CYP1A*-«like» de 63% ; augmentation directement dépendante du temps de transplantation.

Au laboratoire, l'induction de la synthèse de protéines *CYP1A*-«like» fut observée après exposition à des HAP et PCB. L'effet d'une exposition au B[a]P sur le contenu en protéines *CYP1A* de moules fut étudiée pour différentes concentrations en B[a]P (0, 0,5, 5, 50, 100, 500, 1000 ppb) (Canova et al 1998). Une augmentation du niveau de protéines *CYP1A*-«like»

Tableau 4 : Evidences biochimiques et moléculaires de la présence de gènes CYP chez *Mytilus sp.*

Organisme	Niveau D'observation	Technique	Sonde utilisée	Réponse	Taille/poids moléculaire	Auteurs
<i>Mytilus edulis</i>	protéine	Western Blot	anti-CYP1A1 (perche)	+	(1) 54 kDa	Porté et al., 1995
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	protéine	Western Blot	anti-CYP1A1 (perche)	+	(2) 43 kDa, 48 kDa	Peters et al., 1998
			anti-CYP3A (truite)	+	(3) 67 kDa, 53 kDa, 45 kDa	
			anti-CYP2E (rat)	+	(2) 53 kDa, 47 kDa	
			anti-CYP2B (rat)	+	(3) 53 kDa, 48 kDa, 43 kDa	
			anti-CYP4A (rat)	+	(2) 51 kDa, 44 kDa	
<i>Mytilus edulis</i>	mRNA	Northern Blot	cDNA <i>CYP1A1</i> (truite)	+	(1) 2,0 kb	Wootton et al., 1995
			cDNA <i>CYP3A</i> (humain)	+	(1) 2,1 kb	
			cDNA <i>CYP4A1</i> (rat)	+	(1) 2,1 kb	
			cDNA <i>CYP11A1</i> (humain)	+	(1) 2,1 kb	
<i>Mytilus edulis</i>	DNA	Southern Blot	cDNA <i>CYP1A1</i> (truite)	-	(2) 7,3 kb, 4,5 kb	Wootton et al., 1995
			cDNA <i>CYP3A</i> (humain)	+		
			cDNA <i>CYP4A1</i> (rat)	-		
			cDNA <i>CYP11A1</i> (humain)	+	(1) 13 kb	

fut ainsi observée après exposition 48 h à une concentration en B[a]P de 1000 ppb et 72 h à des concentrations de 100 et 500 ppb, le niveau de protéines CYP1A ayant été respectivement augmenté d'un facteur 2, 12 et 6. Les résultats obtenus au cours de cette expérience n'en restent pas moins difficiles à interpréter puisque dans cette étude, l'induction de la synthèse de ces protéines ne semble dépendre ni de la dose, ni de la durée de l'exposition. L'effet d'une exposition à des PCB fut étudié par Livingstone et al (1997) en exposant des moules à l'Arochlor 1254 (20 ppb) dans l'eau ou par injection unique de 2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl (HCB, 2.5 µg/g p. s.). Le résultat de cette étude a montré une induction de la synthèse des protéines CYP1A de 72 % après 10 jours d'exposition à l'Arochlor et de 59 % 4 jours après l'injection d'HCB.

A la vue de ces résultats, le contenu en protéines CYP1A-«like» apparaît comme chez les poissons un biomarqueur potentiel d'exposition aux HAP chez la moule. Néanmoins, il est important de noter ici que l'augmentation du contenu en protéines CYP1A ne coïncide pas toujours avec une augmentation des activités catalytiques qui lui sont associées. Ainsi, une augmentation du contenu en protéines CYP1A peut-être observée sans augmentation parallèle de la BPH (Solé et al., 1996). La situation inverse est également rencontrée. Lors d'une expérience de transplantation, caractérisée par une augmentation de la concentration tissulaire en HAP de 139 à 206%, une augmentation de l'activité BPH fut ainsi observée sans augmentation du contenu en protéines CYP1A (Solé et al., 1998). Bien que non spécifique à cet invertébré marin, la contradiction apparente de ces résultats illustre la difficulté d'utilisation de ces biomarqueurs biochimiques et la nécessité d'acquérir des connaissances supplémentaires sur le cytochrome P450 de la moule.

### III. 2 Métabolisme du B[a]P chez la moule

#### III. 2. 1 Métabolisme *in vitro* :

Bien que la présence d'un cytochrome P450 ne fut démontrée au niveau moléculaire qu'en 1995, l'évidence de son existence chez la moule avait été établie dès le début des années 80 (Livingstone et Farrar, 1984, Stegeman, 1985, Livingstone et al., 1989b, Livingstone, 1991). Néanmoins, malgré un nombre important de données sur les activités MFO de cet organisme, très peu d'études ont fait l'objet de la détermination du profil des métabolites du B[a]P produits.

Stegeman (1985) identifia pour la première fois, chez la moule, les produits du métabolisme du B[a]P, par incubation, en présence de NADPH, de microsomes de glande digestive avec du [<sup>3</sup>H]B[a]P. Après extraction, les métabolites ainsi produits ont été séparés par CLHP et identifiés par détection UV et à radioactivité grâce à l'utilisation de standards externes. Comme chez les vertébrés, trois classes de composés furent ainsi identifiées : les B[a]P-diols, -quinones et -phénols (Tableau 5). Bien que le profil des métabolites obtenus soit similaire d'un point de vue qualitatif à celui des vertébrés, cette première étude de Stegeman permis de mettre en évidence une formation majoritaire des métabolites quinones chez la moule : plus de 60 % des métabolites totaux. Chez les vertébrés, la part des quinones produites *in vitro* ne dépasse guère les 15 % alors que les phénols constituent la grande majorité des métabolites totaux. Les résultats obtenus par Michel et al. en 1992 confirmèrent la production majoritaire de quinones par le métabolisme *in vitro* du B[a]P chez la moule. En présence de NADPH, la part respective de B[a]P-diols, -quinones et -phénols rapportée dans cette dernière étude est respectivement de 4, 82 et 14 %. L'observation d'activités MFO en l'absence de NADPH chez la moule (Livingstone et al., 1989b, Michel et al., 1994), a suscité l'investigation dans cette étude du profil des métabolites obtenus *in vitro* en l'absence de ce co-facteur.

Tableau 5 : Métabolisme du B[a]P *in vitro* chez *Mytilus sp.*

Métabolites	Vitesse de formation pmol/min/mg PM	% des métabolites totaux produits		Auteurs
9,10-dihydrodiol	ND	0,8 ± 0,7	~ 3	Stegeman, 1985
4,5-dihydrodiol	ND	1,2 ± 0,5		
7,8-dihydrodiol	ND	1,0 ± 0,9		
1,6-quinone	ND	28,6 ± 0,3	~ 65	
3,6-quinone	ND	13,1 ± 7,1		
6,12-quinone	ND	23,0 ± 6,0		
9-hydroxy	ND	8,5 ± 0,5 21,0 ± 17,0	~ 30	
7-hydroxy	ND			
3-hydroxy	NI			
9,10-dihydrodiol	0,03 ± 0,01	0,5	4	Michel et al., 1992
4,5-dihydrodiol	0,13 ± 0,04	2,1		
7,8-dihydrodiol	0,10 ± 0,02	1,6		
1,6-quinone	1,60 ± 0,2	25,3	~ 82	
3,6-quinone	1,30 ± 0,3	20,6		
6,12-quinone	2,30 ± 0,4	36,4		
9-hydroxy	♣	13,6	~ 14	
7-hydroxy	NI			
3-hydroxy	0,86 ± 0,12			

ND : non déterminé, NI : non identifié, ♣ : 9-hydroxy non séparé de la 6,12-quinone pour les conditions d'analyse utilisées.

Alors qu'aucun métabolisme n'est observé en l'absence de NADPH chez les vertébrés, le profil des métabolites obtenu chez la moule fut qualitativement identique. Une augmentation significative du métabolisme de 6,3 (+NADPH) à 8,3 (- NADPH) pmoles [<sup>3</sup>H]B[a]P/min/mg PM fut même observée. Quantitativement, l'absence de NADPH a favorisé la production de quinones (+ 66%) au détriment des diols (- 75 %) et des phénols (-35 %). Des éléments de réponse à cette particularité du métabolisme chez la moule furent apportés par l'utilisation de l'alpha-naphtoflavone (ANF), inhibiteur spécifique du cytochrome P450, et de l'alpha-tocopherol acétate (VIT E), piègeur de radicaux libres (Michel et al., 1992).

L'addition d'ANF dans le mélange d'incubation, en présence de NADPH, provoqua ainsi une inhibition de la formation des diols (-80 %) et des phénols (-85 %). Son absence d'effet sur la production des quinones semble démontrer l'existence d'une voie de formation des quinones autre que celle du cytochrome P450. Chez les vertébrés, les quinones sont les produits d'une oxydation à un électron du B[a]P (Cavaliere et al., 1988, 1990b, Cavaliere et Rogan, 1995). Cette oxydation à un électron, catalysée par le cytochrome P450, conduit à la formation d'un B[a]P radical cation, avec sa charge localisée en C6 (le carbone 6 est la position de plus forte densité électronique). Ce radical cation serait le précurseur d'un 6-hydroxyB[a]P très instable qui par auto-oxydation produirait les B[a]P quinones (Lesko et al., 1975).

L'addition de VIT E dans le mélange réactionnel conduit quant à elle à une inhibition de 80 % de la formation des quinones. Cette inhibition semble déterminer un rôle pour les radicaux libres dans la formation des B[a]P quinones. Une oxydation en C6 du B[a]P par les radicaux libres pourrait donc être à l'origine de la formation d'une production importante de quinones.

Chez la moule, le métabolisme *in vitro* du B[a]P est donc caractérisé par une production majoritaire de B[a]P quinones. Comme chez les vertébrés, ces derniers métabolites sont produits par le cytochrome P450. Néanmoins, l'oxydation importante du B[a]P par des radicaux libres chez la moule semble jouer un rôle dans le métabolisme du B[a]P.

### III. 2. 2. Métabolisme du B[a]P *in vivo*

Les métabolites du B[a]P produits *in vivo* chez la moule furent déterminés chez *Mytilus galloprovincialis* après contamination par injection unique dans la glande digestive de [<sup>3</sup>H]B[a]P (0,02 μmole) (Michel et al., 1995). 72h après exposition, les animaux furent sacrifiés et le profil des métabolites produits fut déterminé dans différents pools de glandes digestives et de branchies. La nature des métabolites conjugués à l'acide glucuronique et au sulfate fut également déterminée par traitement préalable de la fraction subcellulaire S9 avec une glucuronidase et une arylsulfatase. Les résultats de cette étude sont récapitulés tableau 6. Le profil des métabolites du B[a]P produits *in vivo* chez la moule est qualitativement similaire à celui obtenu *in vitro*. Outre la détection de composés polaires non identifiés, une petite variation dans la nature des métabolites phénols peut être notée. La formation du 7-hydroxy B[a]P n'a été observée qu'*in vitro* alors qu'inversement le 1-hydroxyB[a]P n'a été détecté qu'*in vivo* chez la moule. Quantitativement, on observe *in vivo* une formation prédominante des métabolites quinones, confirmant ainsi les résultats obtenus *in vitro*. Néanmoins, la proportion des quinones produites est beaucoup plus faible *in vivo* (47% des métabolites totaux) qu'*in vitro* (65-82 % des métabolites totaux). Cette différence fut associée par Michel et al. (1995) à des artefacts qui, lors de la préparation des microsomes, affecteraient les activités du cytochrome P450 tout en favorisant les mécanismes peroxydatifs.

L'analyse des métabolites conjugués à l'acide glucuronique et au sulfate a permis d'identifier d'autres métabolites du B[a]P chez la moule. Les métabolites X1 (tableau 6), éluant en même temps que les dihydrodiols, semblent correspondre à des métabolites B[a]P tétraols, connus, chez les vertébrés, pour être les produits en milieux aqueux de l'hydrolyse spontanée des BPDE. Les métabolites X2 correspondraient quant à eux à des 3,9-dihydrodiols.

La formation de B[a]P diols chez la moule et la présence d'une activité EH chez cet organisme (Suteau et Narbonne, 1988, Suteau et al., 1988, Michel et al., 1993) tendent à démontrer la formation de BPDE très électrophiles. L'observation de B[a]P tétraols conjugués à l'acide glucuronique et au sulfate ne fait que confirmer l'activation du B[a]P en BPDE chez la moule. Comme chez les vertébrés, la moule a donc les capacités métaboliques requises à la formation d'adduits du B[a]P à l'ADN. Néanmoins, la formation d'adduits dépendra également chez cet organisme du rapport entre les activités de phase I et les activités de conjugaison. Ces dernières, dont certaines comme la GST ont été étudiées en tant que biomarqueur potentiel d'exposition aux HAP, ont été rapportées comme étant très efficaces chez la moule (James, 1989, Sheehan et al., 1995, Fitzpatrick et al., 1995a, 1995b).

## IV : La mesure des adduits à l'ADN chez *Mytilus sp* : bilan des connaissances

### IV.1. Formation d'adduits à l'ADN *in vitro*

L'application de la technique de post-marquage au <sup>32</sup>P avec enrichissement au butanol laissa des doutes sur la formation, *in vitro*, d'adduits stables du B[a]P chez la moule (Kurelec et al., 1988). L'incubation de B[a]P avec une fraction subcellulaire de glande digestive n'entraîna en



Tableau 6 : Métabolites du B[a]P produits *in vivo* chez la moule. Détermination du profil des métabolites conjugués à l'acide glucuronique et au sulfate (Michel et al., 1995).

Métabolites	% des métabolites totaux	% total	Métabolites extraits de la fraction Subcellulaire S9 après digestion par ♣			
			Glucuronidase	% total	Sulfatase	% total
Polaires NI	4,4 ± 1,1	17	♣	79	1,3 ± 0,4	50
9,10-dihydrodiol ♣	4,3 ± 0,2		37,9 ± 4,6		ND	
X1	ND		5,9 ± 0,9		5,9 ± 1,8	
4,5-dihydrodiol	3,8 ± 0,6		9,5 ± 4,1		13,3 ± 0,8	
7,8-dihydrodiol	4,3 ± 0,4		17,5 ± 0,8		15,7 ± 1,2	
X2	ND		8,0 ± 2,2		12,4 ± 0,4	
1,6 quinone	17,9 ± 2,4	47	21,3 ± 1,2	21	50,4 ± 7,8	50
3,6 quinone	13,2 ± 2,4					
6,12 quinone	15,8 ± 2,3					
9-hydroxy	15,6 ± 1,7	36	ND	ND	ND	ND
1-hydroxy	11,0 ± 4,0		ND			
3-hydroxy	9,6 ± 4,2		ND			

♣ : co-élution des métabolites polaires non identifiés avec la 9,10-dihydrodiol, ♣ : après soustraction des métabolites mesurés dans la fraction S9 avant digestion par la glucuronidase et la sulfotransférase, ND : non déterminé.

effet aucune production d'adduits chez *Mytilus galloprovincialis*. Avec la même méthode, Harvey et Parry (1997) montrèrent néanmoins, par incubation d'un homogénat brut de glande digestive avec du B[a]P (50 µM), l'induction d'un adduit majoritaire et de plusieurs adduits mineurs chez *Mytilus edulis*. Comme chez les poissons, les adduits formés furent observés au niveau de la diagonale des plaques chromatographiques utilisées (Annexe I) selon une répartition DRZ (Diagonal Radioactive Zone) typique des adduits HAP chez les vertébrés. Par co-chromatographie, l'adduit majoritairement formé dans la glande digestive de moule fut identifié comme l'adduit BPDE-10-N2dG.

Chez *Mytilus edulis*, l'activation du B[a]P en adduits à l'ADN a également été démontrée *in vitro* par la capacité des métabolites du B[a]P à se lier de façon covalente aux macromolécules cellulaires (Marsh et al., 1992). L'injection de [<sup>3</sup>H]B[a]P (150 pmoles) dans le muscle adducteur de moule fut ainsi suivie, 2 à 5 jours après injection, du dosage par scintillation liquide du B[a]P lié à l'ADN et aux protéines de la glande digestive. Les résultats obtenus (tableau 7) ont ainsi démontré la production chez la moule de métabolites électrophiles du B[a]P pouvant se lier aux groupements nucléophiles des macromolécules cellulaires.

Tableau 7 : Liaison covalente des métabolites du B[a]P à l'ADN et aux protéines de la glande digestive de moule (Marsh et al., 1992)

Exposition (jours)	pmol eq B[a]P /g poids humide	% de la dose administrée	fmol eq B[a]P /mg protéines	fmol eq B[a]P /mg ADN
2	27,6 ± 14,7	8,7 ± 3,8	4,3 ± 1,4	4,9 ± 2,3
5	21,4 ± 8,8	5,3 ± 3,2	4,6 ± 2,7	4,1 ± 1,1

## IV.2. Formation d'adduits à l'ADN *in vivo*

### *Etudes au laboratoire*

L'induction d'adduits du B[a]P chez la moule fut étudiée *in vivo* par la technique de post-marquage au  $^{32}\text{P}$  et enrichissement à la nucléase P1 (Venier et Canova, 1996, Canova et al., 1998). Le niveau d'adduits à l'ADN fut ainsi déterminé dans les branchies après exposition d'individus, *Mytilus galloprovincialis*, pendant 48 et 72 h, à différentes concentrations de B[a]P (0, 0,5, 5, 50, 100  $\mu\text{g/l}$ ) (Venier et al., 1996). L'induction d'un unique adduit, près du point d'origine, a ainsi été mise en évidence dans les branchies des organismes exposés. Bien que non identifié, cet adduit a clairement été différencié par co-chromatographie de l'adduit standard BPDE-10-N2dG. Les niveaux d'adduits mesurés chez la moule au cours de cette expérience, respectivement 0,2 et 0,4 adduit/ $10^8$  dNps après exposition 48 et 72h à la concentration la plus forte, furent sensiblement plus faibles que les niveaux d'adduits mesurés communément chez les poissons. Néanmoins, une augmentation linéaire du niveau d'adduits avec la concentration en B[a]P fut observée pour les deux temps d'exposition testés. Pour les deux plus fortes concentrations, une augmentation significative du niveau d'adduits avec le temps d'exposition au B[a]P fut également rapportée. Dans cette même étude, un pré-traitement des moules à l'Aroclor 1254 (inducteur connu des activités MFO chez les vertébrés et la moule), n'entraîna aucune induction du niveau d'adduits.

Une partie de ces résultats fut confirmée par Canova et al (1998) lors de la reproduction de cette même expérience avec deux concentrations supplémentaires de B[a]P (500 et 1000 ppb) et en mesurant le niveau d'adduits à l'ADN dans les branchies et dans la glande digestive de moule (Tableau 8). Le même adduit que celui décrit précédemment par Venier et Canova (1996) fut induit dans les deux tissus étudiés, avec quelques adduits mineurs supplémentaires pour la glande digestive. La différence de cet adduit du BPDE-10-N2dG fut également confirmée dans cette expérience. Quantitativement les niveaux d'adduits les plus élevés furent mesurés dans les branchies. Dans ce tissu, la plus petite concentration tissulaire en B[a]P associée à l'induction d'adduits à l'ADN est 2 à 5 fois plus faible que celle de la glande digestive. Dans ces deux tissus l'observation d'une relation de type dose-réponse n'a pas toujours été confirmée tout comme l'augmentation du niveau d'adduits avec le temps d'exposition. Harvey et Parry (1997) rapportèrent également des mesures d'adduits du B[a]P à l'ADN chez la moule après exposition pendant 24h à des concentrations en B[a]P de 0,001 à 50  $\text{mg/l}$ . Par post-marquage au  $^{32}\text{P}$  et enrichissement au butanol, l'exposition au B[a]P fut à l'origine de 3 adduits dont l'adduit majoritairement formé fut identifié par co-chromatographie comme l'adduit BPDE-10-N2dG.

### IV.3. Etudes *in situ*

Lors d'un programme d'échantillonnage dans le Lagon de Venise, le niveau d'adduits à l'ADN de *Mytilus galloprovincialis* a été mesuré par la méthode de post-marquage au  $^{32}\text{P}$  et enrichissement à la nucléase P1 (Venier et al., 1996). Plusieurs sites de référence ainsi qu'un site industriel contaminé aux HAP ont été sélectionnés et le niveau d'adduits moyen à l'ADN de branchies déterminé à différents moments de l'année. Après chromatographie, aucun adduit ne fut observé chez les individus des sites de référence alors que dans le site contaminé une diagonale radioactive caractéristique des adduits HAP fut observée. Bien que les niveaux d'adduits à l'ADN mesurés soient faibles et semblent présenter des variations saisonnières, les niveaux d'adduits des individus du site contaminé ( $0,066 \pm 0,035$  à  $0,346 \pm 0,064$  adduit/ $10^8$  dNps) furent toujours supérieurs à ceux des individus des sites de référence ( $0,009 \pm 0,009$  à  $0,104 \pm 0,015$  adduit/ $10^8$  dNps). Solé et al. (1996) ont également mesuré les niveaux d'adduits à l'ADN de *Mytilus galloprovincialis* six mois après l'incident pétrolier du «Aegean Sea».

Tableau 8 : Niveaux d'adduits mesurés après exposition au B[a]P (0, 0,5, 5, 50, 100, 500, 1000 ppb) (d'après Canova et al, 1998)

		Branchies		Glande digestive	
		Exposition 48 h	Exposition 72 h	Exposition 48 h	Exposition 72 h
Adduits (/10 <sup>8</sup> dNps)	Min	0,119 ± 0,031 (témoin)	0,075 ± 0,044 (témoin)	0,054 ± 0,044 (témoin)	0,063 ± 0,036 (témoin)
	Max	0,559 ± 0,061 (1000 ppb)	0,789 ± 0,146 (100 ppb)	0,442 ± 0,052 (500 ppb)	0,643 ± 0,231 (1000 ppb)
CIM♣		50	5	50	5
	Ct <sub>t</sub> B[a]P♠	30,3 ± 0,0	15,0 ± 0,9	147,0 ± 16,0	28,0 ± 0,2

CIM ♣: concentration d'induction minimale (ppb), ♠ Ct<sub>t</sub>B[a]P : Concentration tissulaire correspondante en B[a]P (µg/g poids humide)

Malgré l'observation d'un profil d'adduits caractéristique d'une contamination aux HAP dans les sites étudiés (excepté dans le site de référence), aucune corrélation entre le niveau d'adduits à l'ADN et la concentration en HAP de la moule entière ne fut observée. Dans cette étude, les niveaux d'adduits mesurés par enrichissement au butanol sont très élevés (0,20 ± 0,16 à 128 ± 37,3 adduits/10<sup>8</sup> dNps) et semblent avoir été surestimés compt tenu du niveau d'adduits mesuré dans le témoin négatif (18,1 ± 15,8).

Kurelec et al. (1990) ont également déterminé le niveau d'adduits à l'ADN de différentes populations de moules de la mer Adriatique, issues de sites de niveaux de pollution variable. Le gradient de pollution choisi a été établi à partir des résultats obtenus à chaque site sur la fréquence d'aberrations chromosomiques chez la moule et l'induction des activités BaPMO chez les poissons. Par post-marquage et enrichissement au butanol, aucun adduit ne fut observé dans cette étude en relation avec le degré de pollution malgré l'observation dans certains sites de plusieurs adduits «naturels».

A la vue des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* sur les adduits du B[a]P à l'ADN chez la moule, plusieurs points importants peuvent être soulignés :

- 1) Les résultats obtenus *in vitro* montrent l'activation possible du B[a]P en espèces électrophiles chez la moule donc la capacité de cet organisme à former des adduits HAP à l'ADN. L'utilisation de la technique de post-marquage au <sup>32</sup>P avec enrichissement au butanol semble confirmer, par l'identification d'un adduit ayant les mêmes propriétés chromatographiques que le BPDE-10-N2dG, l'existence d'une voie d'activation du B[a]P en B[a]P diol-époxydes. Ce résultat est en accord avec l'observation d'une activité EH et d'un cytochrome P450 «like» chez la moule. L'identification *in vivo* de métabolites B[a]P tétraols confirme également la formation de B[a]P diol-époxydes chez cet organisme.
- 2) L'utilisation de la technique de post-marquage au <sup>32</sup>P avec enrichissement à la nucléase P1 montre *in vivo* l'induction d'un adduit majoritaire dans les branchies et la glande digestive qui ne correspond pas à l'adduit BPDE-10-N2dG. L'absence d'induction de l'adduit ainsi formé par pré-traitement avec l'Arochlor 1254, tend à associer cet adduit à une voie

d'activation ne mettant pas en jeu le cytochrome P450. En effet, les activités qui lui sont associées sont connues comme étant inductibles par les PCB plans. Les métabolites quinones étant majoritairement formés chez la moule, Venier et Canova (1996) émettent l'hypothèse selon laquelle cet adduit pourrait être un adduit BPQ.

- 3) La nature de la méthode d'enrichissement (butanol ou nucléase P1) utilisée pour la technique de post-marquage au  $^{32}\text{P}$  semble être responsable de différences observées dans l'identification des adduits. Ainsi, par la méthode d'enrichissement au butanol, l'adduit majoritairement formé *in vivo* dans la glande digestive de moule est identifié comme l'adduit BPDE-10-N2dG alors qu'avec la méthode à la nucléase P1, il apparaît comme un adduit différent.
- 4) L'exposition à de fortes concentrations en B[a]P provoque chez la moule des concentrations tissulaires en B[a]P très importantes. Malgré la bioconcentration de ce polluant, les niveaux d'adduits à l'ADN des moules ainsi exposées sont faibles par rapport à ceux mesurés chez les vertébrés. Cette particularité semble liée à l'existence d'activités MFO plus faibles que celles des vertébrés chez la moule et à la capacité de cet organisme à développer un métabolisme de phase I et II bien équilibré (Michel et al., 1995). En réponse à l'exposition à des xénobiotiques, une augmentation adaptative des activités de conjugaison peut en effet limiter la quantité réactive de métabolites de phase I pour les macromolécules cellulaires.
- 5) L'observation au laboratoire d'une augmentation du niveau d'adduits avec la dose et le temps d'exposition est favorable à la proposition des adduits à l'ADN comme biomarqueurs d'exposition aux HAP (Venier et Canova, 1996). Néanmoins, cette observation n'a pas toujours été vérifiée au laboratoire en raison d'une grande variabilité interindividuelle (Harvey et Parry, 1997). Cette variabilité complique beaucoup la reproductibilité et l'interprétation des données obtenues par la technique de post-marquage au  $^{32}\text{P}$ . Elle est expliquée par l'existence de variations interindividuelles dans l'absorption, le métabolisme et l'excrétion du xénobiotique, les mécanismes de réparation de l'ADN et le renouvellement cellulaire. La mesure des adduits à l'ADN dans des pools de tissus tend à minimiser ces variations.
- 6) L'observation de différences dans le niveau d'adduits à l'ADN entre tissu est très important pour une future application en biosurveillance. Chez la moule, le niveau d'adduits à l'ADN des branchies est supérieur à celui de la glande digestive bien que ce dernier tissu soit le siège principal de la bioaccumulation et des activités de biotransformation chez la moule (Livingstone et Pipe, 1992). Parce que les branchies semblent plus sensibles que la glande digestive (tableau 8), la mesure des adduits dans ce tissu peut permettre une détection plus précoce des effets génotoxiques des HAP.
- 7) Pendant une période de stabulation en aquarium, l'apparition d'adduits à l'ADN fut observée chez des moules non exposées à des xénobiotiques (Harvey et Parry, 1997). De la même façon, Kurelec et al. (1990) ont observé *in situ* la présence d'adduits à l'ADN sans relation avec le niveau de pollution de leur milieu. La formation de ces adduits pourrait être liée à des mécanismes endogènes. Lorsqu'ils ne peuvent être différenciés des adduits induits, leur présence peut empêcher toute interprétation des données obtenues au laboratoire par la technique de post-marquage au  $^{32}\text{P}$ . Sur le terrain, la prise en compte de ces adduits 'naturels' dans les études de biomonitoring pourrait être également responsable de l'absence de corrélation observée avec le niveau de pollution.

**L'ensemble de ces résultats montre que les connaissances sur la formation des adduits HAP à l'ADN chez la moule sont encore très limitées. L'identification des adduits formés reste difficile et partielle par manque d'adduits standards. Elle est pourtant de toute importance pour l'identification chez la moule des différentes voies d'activation possible**

des HAP en adduits à l'ADN. L'identification structurelle des adduits formés peut en effet permettre d'identifier les métabolites ayant réagi avec l'ADN et ainsi de caractériser les différentes voies de biotransformation des HAP chez cet organisme.

L'acquisition de connaissances sur la persistance dans le temps des adduits formés et sur les systèmes de réparation de l'ADN chez la moule est également requise. De ces connaissances dépendra l'utilisation possible des adduits à l'ADN comme dosimètre moléculaire d'exposition à des composés génotoxiques.

Les résultats obtenus montrent le potentiel d'utilisation des adduits à l'ADN comme biomarqueurs d'exposition aux HAP. Néanmoins, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour permettre leur interprétation dans le milieu naturel.



**CHAPITRE 2**  
**LES DOMMAGES OXYDATIFS A L'ADN**





## LES DOMMAGES OXYDATIFS A L'ADN

L'oxygène est indispensable aux organismes aérobies mais certaines formes, résultant de la réduction partielle de l'O<sub>2</sub> (Figure 15), peuvent être toxiques en raison de leur grande réactivité pour les macromolécules cellulaires. Les oxyradicaux ainsi produits sont collectivement regroupés en biologie sous le terme d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ce terme englobe également quelques dérivés de l'oxygène qui bien que ne présentant pas d'électrons non appariés participent activement aux dommages oxydatifs. Les ERO sont produits de façon continue dans la cellule par le métabolisme cellulaire normal, notamment lors du cycle catalytique du cytochrome P450 (Figure 16). Des sources exogènes ont également été identifiées dont l'exposition à certains rayonnements (UV, X,  $\gamma$ ) et xénobiotiques (Newcomb et Loeb, 1995). Malgré l'existence dans la cellule de nombreux moyens de défense, la concentration en ERO présente dans la cellule peut être supérieure à ses capacités antioxydantes et conduire ainsi à l'état de stress oxydatif, état qui permettra l'expression de la cytotoxicité et de la génotoxicité des ERO (Klaunig et al, 1998).

### I. Les espèces réactives de l'oxygène :

#### I. 1. L'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)

L'oxygène singulet n'est pas un radical à proprement parler mais une forme excitée de l'oxygène moléculaire qui a la propriété de se comporter comme un radical accepteur d'électrons. Différentes sources cellulaires d'<sup>1</sup>O<sub>2</sub> ont été identifiées (Ravanat et Cadet, 1995) dont les réactions de photosensibilisation (Epe, 1993). Certaines molécules sont capables d'absorber de l'énergie lorsqu'elles sont soumises à des rayonnements lumineux tels que les rayonnements UV ou visibles, et passer ainsi d'un état fondamental à un état excité. En transférant leur énergie d'excitation à une autre molécule dont l'O<sub>2</sub>, elles retrouvent leur état initial tout en produisant <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Les chlorophylles, le rétinol, les flavines et les porphyrines sont des agents photosensibilisateurs naturels. Certains xénobiotiques peuvent après absorption jouer un rôle similaire dans la cellule tels que le psoralène et la mitomycine C. <sup>1</sup>O<sub>2</sub> peut également être produit par les défenses immunitaires en tant qu'agent anti-microbien et anti-viral ainsi que lors de la métabolisation des peroxydes lipidiques par le cytochrome P450 (Di Mascio et al., 1989, Newcom et Loeb, 1995). La dismutation non enzymatique d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> ainsi que le cycle catalytique de certaines enzymes donneuses d'électrons du cytochrome P450 ont également été rapportés comme source d'<sup>1</sup>O<sub>2</sub> dans la cellule.

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> peut réagir directement avec les macromolécules cellulaires (lipides, protéines, ADN) car c'est un électrophile puissant présentant un temps de demi-vie relativement long (Rice-Evans et Burdon, 1993, Cadet et al., 1994). Il peut interagir avec les molécules de deux façons distinctes. Par combinaison chimique avec des molécules présentant des double-liaisons C=C, il peut conduire, dans le cas des acides gras poly-insaturés membranaires, à la formation d'hydroperoxydes impliqués dans le mécanisme de la peroxydation lipidique. <sup>1</sup>O<sub>2</sub> peut également donner son énergie par contact à d'autres molécules et leur conférer ainsi un état d'instabilité.

#### I. 2. L'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)

O<sub>2</sub><sup>-</sup> constitue l'état de réduction monoélectrique de l'oxygène. Sa formation est engendrée par de nombreux processus notamment enzymatique. La NADPH oxydase associée à la membrane plasmique des phagocytes et des lymphocytes B catalyse la réduction de l'oxygène

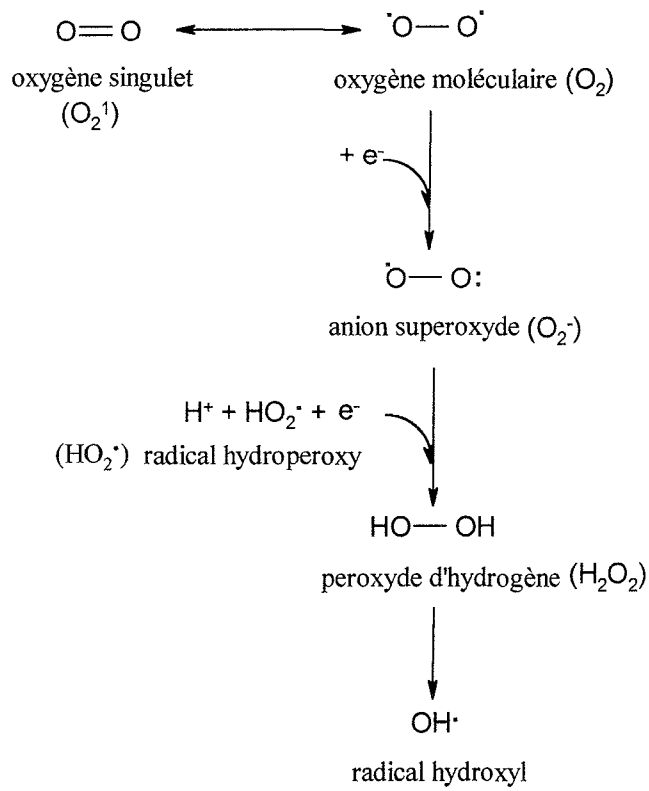


Figure 15 : Réduction séquentielle de l'oxygène moléculaire en espèces radicalaires

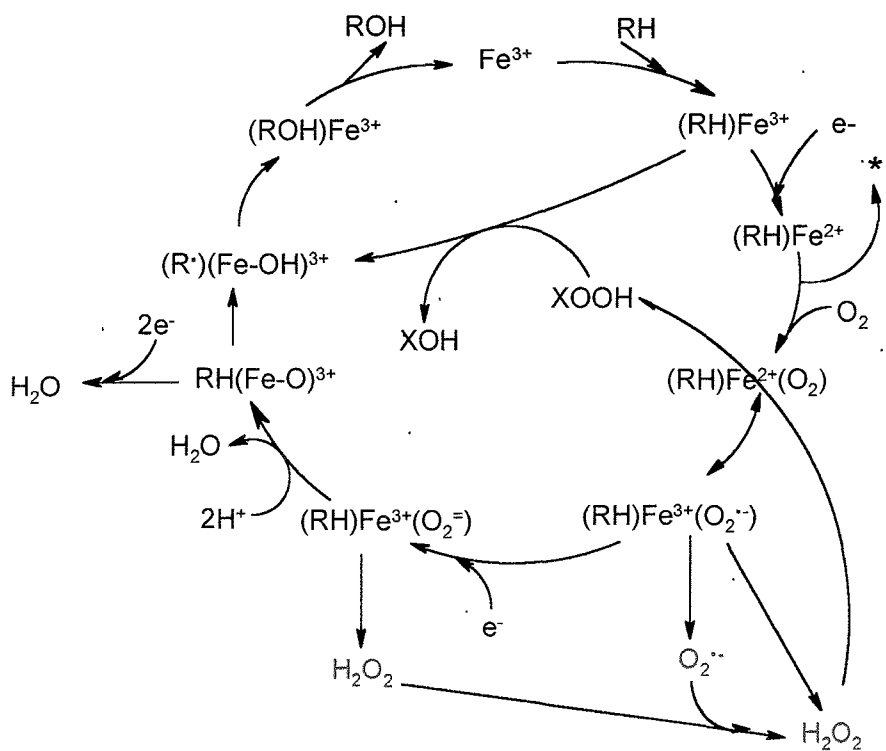
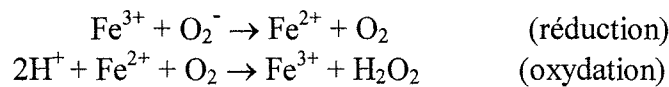


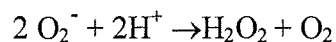
Figure 16 : Cycle catalytique du cytochrome P450 (Eastabrook, 1978)

en  $O_2^-$ , constituant ainsi l'un des mécanismes de défense du système immunitaire (Chanock et al., 1992). La xanthine oxydase des péroxisomes génère également des ERO dont  $O_2^-$  lors de la réduction de la xanthine ou de l'hypoxanthine en acide urique (Aruoma et al., 1989). La cytochrome oxydase de la chaîne respiratoire ainsi que le transport électronique assuré par le cytochrome P450 ont également été identifiés comme des sources d' $O_2^-$  dans la cellule.

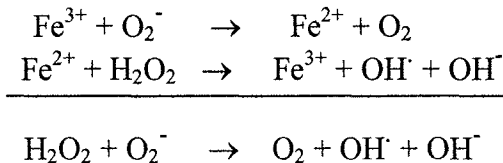
Bien que peu réactif pour les macromolécules cellulaires,  $O_2^-$  peut néanmoins conduire à la production d'oxyradicaux plus réactifs (Belleville-Nabet et al., 1995). En présence de protons, il peut former un radical hydroperoxyde,  $HO_2^\cdot$  ( $O_2^- + H^+ \rightarrow HO_2^\cdot$ ), capable d'initier la peroxydation lipidique. Cet oxydo-réducteur peut à la fois participer à des réactions d'oxydo-réduction et générer ainsi l'hydrogène peroxyde :



$O_2^-$  peut également conduire en milieux aqueux à la formation d' $H_2O_2$  par dismutation spontanée selon la réaction :



La formation d' $O_2^-$  est particulièrement importante en raison de sa participation, via la réaction d'Haber-Weiss, à la production du très électrophile radical hydroxyle. Cette réaction cinétiquement très lente nécessite la présence simultanée d' $O_2^-$  et d' $H_2O_2$  ainsi que de métaux de transition comme catalyseurs, notamment le fer :

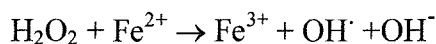


La biodisponibilité des métaux dans la cellule est contrôlée. Ces derniers sont effectivement séquestrés par liaison à des protéines de transport ou de stockage (Aruoma et al., 1991, Aruoma, 1998). Dans le cas du fer, après avoir été absorbé via la paroi intestinale, il est ensuite transporté vers les cellules par des transferrines, leur stockage étant parallèlement assuré par d'autres protéines comme les ferritines, les céruléoplasmines, l'hémossidérine et les métallothionéines. Lorsqu'il est lié de façon spécifique à ces protéines, il ne participe pas aux réactions redox de la cellule. Néanmoins, au cours du stress oxydatif un relargage de fer peut être induit par la présence de certains oxyradicaux ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ), entraînant ainsi, par la présence de métaux libres dans l'organisme, un environnement propice à la production d'ERO (Aruoma, 1998). Des métaux autres que le fer peuvent catalyser des réactions avec les ERO dont le cuivre, le chrome et le cobalt (Halliwell et Gutteridge, 1990).

### I. 3. L'hydrogène peroxyde ( $H_2O_2$ )

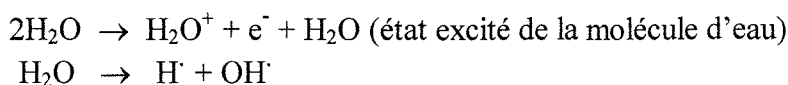
$H_2O_2$  correspond à l'état de réduction biélectrique de l'oxygène. Il est produit essentiellement dans le réticulum endoplasmique par dismutation d' $O_2^-$  en  $H_2O_2$ , soit de façon spontanée ou par l'action de la superoxyde dismutase ( $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ) (Touati, 1989). Il peut être également formé par l'activité de certaines oxydases (xanthine oxydase, glucose oxydase, glutathione oxydase) (Salazar et Van Houten, 1997) ou comme sous-produit de la

phosphorylation oxydative des mitochondries. Faiblement oxydant,  $\text{H}_2\text{O}_2$  a la capacité de traverser les membranes et d'inactiver le fonctionnement de certaines enzymes par l'oxydation notamment de leurs groupements thiols ( $-\text{SH}$ ). A fortes concentrations, il peut également endommager les systèmes cellulaires de production d'énergie. La toxicité d' $\text{H}_2\text{O}_2$  est surtout liée à sa conversion en radical hydroxyle via la réaction d'Haber-Weiss et la réaction de Fenton. Cette dernière nécessite, comme pour la réaction d'Haber-Weiss, la présence de métaux de transition :



#### I. 4. Le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\cdot$ )

Le radical hydroxyle est l'état de réduction triélectronique de la molécule d'oxygène. C'est le radical le plus réactif de tous. Il réagit avec tous les types de molécules cellulaires soit par abstraction d'atomes d'H soit par transfert, à une double-liaison, de son électron célibataire. Dans la cellule, il peut être formé par différents mécanismes, notamment par la photolyse et la radiolyse de l'eau par les radiations ionisantes (rayons X et  $\gamma$ ) :



En présence de métaux de transition et de la présence simultanée d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et d' $\text{O}_2^-$ , la formation du radical hydroxyle peut être catalysée selon la réaction d'Haber-Weiss. La présence de ces métaux peut également engendrer la scission homolytique de la liaison O-O d' $\text{H}_2\text{O}_2$  selon la réaction de Fenton et produire ainsi directement  $\text{OH}^\cdot$  à partir d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . En raison de sa forte réactivité, le radical hydroxyle présente un faible rayon de diffusion, sa réactivité avec les macromolécules cellulaires reste donc limitée à son lieu de production. La diffusion plus élevée d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans la cellule, assure néanmoins via la réaction de Fenton une distribution plus large du radical hydroxyle.

On peut noter également la production possible par ce dernier de radicaux  $\text{R}^\cdot$  et  $\text{ROO}^\cdot$  ayant un rôle très important dans le processus de la peroxydation lipidique.

#### I. 5. Les radicaux alkyles, $\text{R}^\cdot$ , alkoxydes, $\text{RO}^\cdot$ , peroxydes, $\text{ROO}^\cdot$ et les hydroxyperoxydes, $\text{ROOH}$

Ces radicaux sont formés au cours de la peroxydation lipidique via l'attaque initiale par une espèce réactive de l'oxygène ( $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $^1\text{O}_2$ ) des acides gras poly-insaturés des phospholipides membranaires, des triglycérides et du cholestérol.

#### I. 6. Le peroxydinitrite, l'ozone et les oxydes d'azote

Le peroxydinitrite est le produit de la réaction du radical nitroxyde ( $\text{NO}^\cdot$ ) avec l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ). L'ozone ( $\text{O}_3$ ) est quant à elle produite par la photodissociation de l' $\text{O}_2$  en atomes d'O et par réaction de ces derniers avec des molécules d'oxygène ( $\text{O}_2 \rightarrow 2\text{O}$ ,  $\text{O}_2 + \text{O} \rightarrow \text{O}_3$ ). Bien que n'étant pas une forme radicalaire, l'ozone a un pouvoir oxydant plus élevé que celui de l'oxygène. On retrouve également dans l'atmosphère, le mono et le dioxyde d'azote ( $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ ).

## II. Les défenses antioxydantes (figure 17)

### II. 1. Les défenses antioxydantes non enzymatiques

#### II.1.1. Les vitamines A, C et E

On regroupe sous le terme de vitamine A, les composés, autres que les caroténoïdes, possédant un cycle  $\beta$ -ionone. Parce que leur métabolisme conduit à la formation de vitamine A, les caroténoïdes dont le  $\beta$ -carotène sont communément appelés pro-vitamine A. Surtout localisée dans les membranes cellulaires en raison de sa liposolubilité, la vitamine A est un piègeur d'oxyradicaux ( $^1\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\cdot$  et  $\text{ROO}^\cdot$ ).

La vitamine C ou acide ascorbique a un rôle similaire dans la cellule. Hydrosoluble, elle est un piègeur d' $^1\text{O}_2$  et d' $\text{OH}^\cdot$ . La vitamine E regroupe, quant à elle sous son terme, plusieurs isomères du tocophérol dont l' $\alpha$ -tocophérol, piègeur de radicaux alkoxy et peroxy.

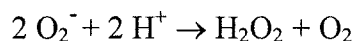
#### II.1.2. Le glutathion

Le  $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glycine (glutathion) est un tripeptide de faible poids moléculaire, très largement répandu dans la cellule. De par sa fonction thiol, il joue un rôle important dans la détoxification cellulaire soit par la conjugaison de molécules électrophiles soit par l'expression de ses propriétés antioxydantes. Il a la capacité de piéger directement  $\text{OH}^\cdot$  et  $^1\text{O}_2$  et de réduire indirectement l'hydrogène peroxyde et les hydroperoxydes lipidiques en servant de cofacteur à une prooxydase ou à une réductase.

### II. 2. Les défenses antioxydantes enzymatiques

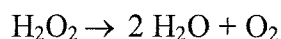
#### II.2.1. La superoxyde dismutase (SOD)

Présente dans différents compartiments cellulaires et extracellulaires, la SOD est une métallo-enzyme qui contient selon les cas du fer (périplasma des bactéries), du cuivre (plasma, cytosol), du manganèse (mitochondries) ou du zinc (plasma, cytosol) (Pelmont, 1995). C'est une enzyme qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène :



#### II.2.2. La catalase (CAT)

C'est une enzyme essentiellement présente dans les péroxysomes qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau (Pelmont, 1995):



#### II.2.3. Les glutathion-péroxydases

Présentes essentiellement dans le cytosol et les mitochondries, elles catalysent la réduction des hydroperoxydes en leurs alcools respectifs en utilisant le glutathion comme cofacteur (Pelmont, 1995):



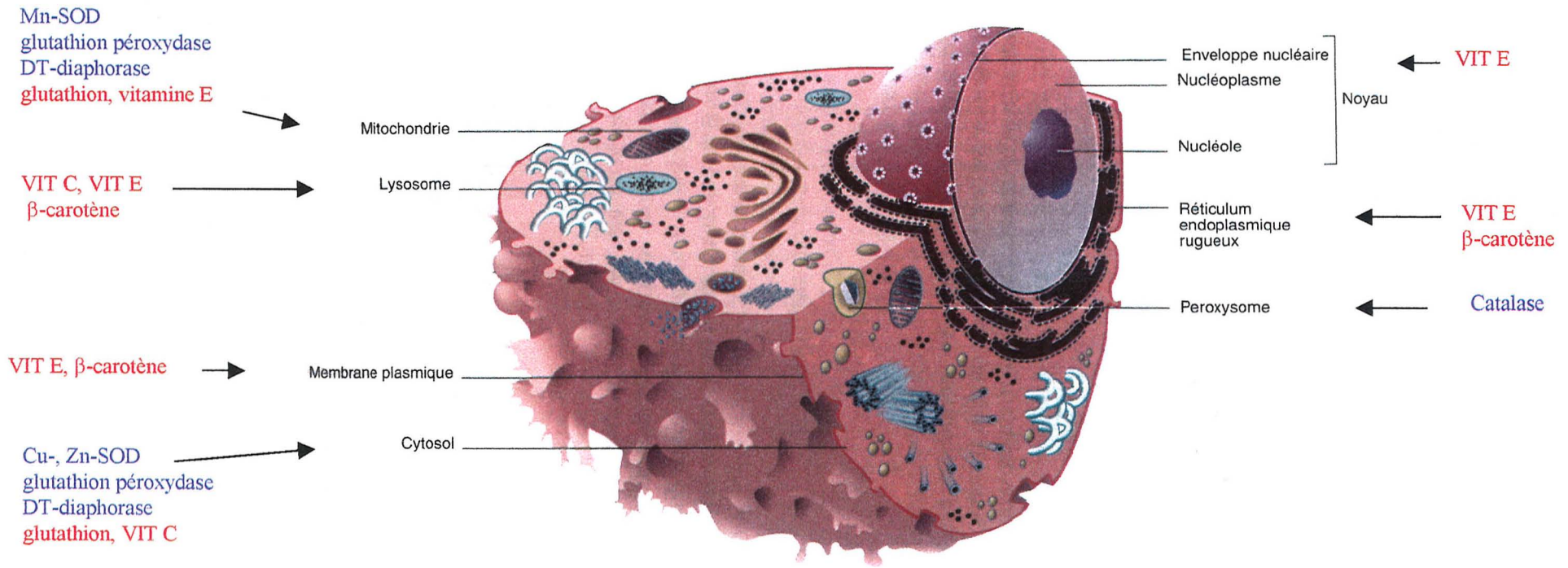


Figure 17: localisation cellulaire des défenses antioxydantes enzymatiques (bleu) et non enzymatiques (rouge)

#### II.2.4. La DT-diaphorase (NAD(P)H :quinone oxydoréductase)

Elle a un rôle important dans la prévention de la toxicité des quinones. En catalysant leur réduction à deux électrons en hydroquinones, la DT-diaphorase prévient l'entrée des quinones dans les cycles redox et de ce fait la production d'anion superoxyde et de radicaux semiquinones (Joseph et al., 1994, Cadenas, 1995). Les hydroquinones ainsi formées sont facilement excrétées par conjugaison à l'acide glucuronique (UDP) par l'UDP glucuronyltransférase (UDPGT). Parce que son action s'oppose à celle de la NAD(P)H cytochrome P450 réductase, la toxicité des quinones semble dépendre de la compétitivité de ces deux activités enzymatiques (Nakamura et Hayashi, 1994, Joseph et Jaiswal, 1998).

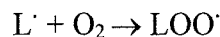
L'activité DT-diaphorase est particulièrement importante dans le foie et est surtout localisée dans le cytosol et dans une moindre mesure dans les microsomes et les mitochondries (Ernster, 1976). Contrairement à la CAT et à la SOD, cette enzyme est exprimée par un gène de la famille [Ah] connu comme étant inductible par les xénobiotiques organiques (Bayney et al., 1989): chez le rat, l'induction de cette activité est génétiquement liée à celle du cytochrome P450IA1 (Lemaire et Livingstone, 1993).

### III. Les dommages oxydatifs aux macromolécules cellulaires

#### III. 1. Dommage aux lipides et aux protéines

L'oxydation des lipides insaturés ou peroxydation lipidique est un mécanisme qui conduit à la destruction des acides gras polyinsaturés (AGPI) (acide linoléique, acide arachidonique...) par un processus autocatalytique non contrôlé. Il en résulte la formation d'hydropéroxydes d'acides gras et de plusieurs sous-produits dont des aldéhydes (Kappus, 1991). La peroxydation lipidique peut être décomposée en trois phases distinctes :

Phase d'initiation :  $L-H \rightarrow L\cdot$  (L : acide gras polyinsaturé)



Phase de propagation :  $LOO\cdot + L-H \rightarrow LOOH + L\cdot$

Phase de terminaison :  $L\cdot + L\cdot \rightarrow L-L$

Au cours de la phase d'initiation, un radical d'acide gras poly-insaturé est formé au cours de l'abstraction, par une espèce radicalaire ( $OH\cdot$ ,  $^1O_2$ ,  $RO\cdot$ ,  $ROO\cdot$ ), d'un atome d'H à l'AGPI correspondant. Le radical ainsi formé se stabilise en diène conjugué par réarrangement moléculaire et réagit avec l' $O_2$  pour former un radical peroxyde,  $LOO\cdot$ . Ce radical peut à son tour interagir avec d'autres chaînes d'AGPI et leur arracher un atome d'H. C'est la phase de propagation de la peroxydation lipidique. A ce stade, des hydropéroxydes sont formés. Relativement stables à température physiologique, ces derniers peuvent néanmoins en présence de complexes métalliques (Cu, Fe) subir une scission- $\beta$  de leur liaison double et conduire ainsi à la formation de radicaux alkoxydes. Par scission- $\beta$  de ces derniers, des alcanes peuvent être produits dont le pentane dans le cas de l'acide arachidonique. La décomposition des hydroperoxydes en présence de fer peut conduire également à la production de malondialdéhyde (Figure 18). La phase de terminaison intervient quand deux radicaux réagissent entre eux et conduisent à la formation d'un composé stable.

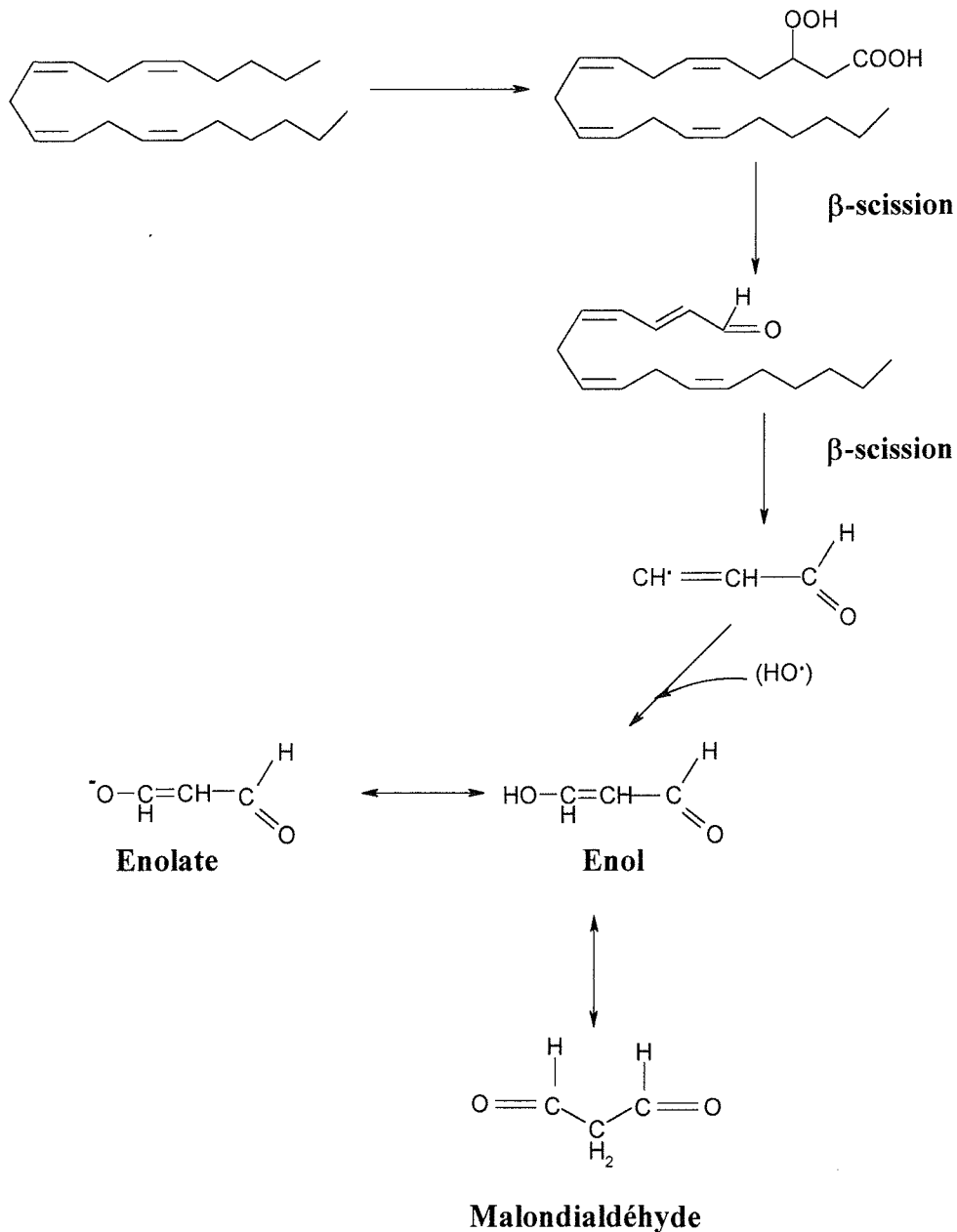


Figure 18 : Formation de malondialdéhyde lors de la peroxydation de lipides poly-insaturés contenant au moins deux double-liaisons (d'après Roberfroid et Calderon, 1995).

Les membranes biologiques, constituées d'acides gras insaturés et poly-insaturés, sont particulièrement concernées par la peroxydation lipidique. De par leur rôle dans la fluidité membranaire, l'oxydation des lipides modifie en effet la structure et le fonctionnement des membranes. Plusieurs sous-produits de la peroxydation lipidique dont les hydroperoxydes, les aldéhydes et le malondialdéhyde ont également été identifiés comme ayant des propriétés cytotoxiques et mutagènes (Esterbauer et al., 1991).

Les oxyradicaux et les aldéhydes peuvent agir directement avec les groupements thiols,  $-SH$  et  $-NH_2$ , des protéines et inhiber ainsi certaines activités enzymatiques (Klaunig et al., 1998). Le MDA peut, tout comme les oxyradicaux, réagir avec plusieurs acides aminés et former des agrégats, des fragmentations ainsi que des pontages intramoléculeux de protéines. L'attaque



par des espèces radicalaires des protéines de transport et des protéines «récepteurs» peut également altérer l'homéostasie cellulaire et modifier ainsi le transfert des signaux dans la cellule (Klaunig et al., 1998).

Il faut noter également ici que les hydroperoxydes lipidiques ainsi que le MDA peuvent endommager le matériel génétique par la formation respective de cassures double-brins (Morita et al., 1983, Esterbauer et al., 1990) et d'adduits à l'ADN (Chaudhary et al., 1994).

### III. 2. Dommages à l'ADN

La formation de dommages oxydatifs à l'ADN n'est possible que pour les ERO,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{OH}^\cdot$  qui possèdent l'énergie suffisante à l'induction:

- de cassures simple et double brins (Yu et Anderson, 1997, Jacobi et al., 1998)
- de sites abasiques via l'oxydation du désoxyribose en C1' ou C2' et relarguage de la base adjacente (Ramana et al., 1998)
- à l'oxydation des bases de l'ADN (Ravanat et Cadet, 1995, Douki et al., 1997)
- de pontages protéines/DNA (Newcomb et Loeb, 1995)

Nous nous limiterons néanmoins à l'étude exclusive de l'oxydation des bases de l'ADN.

#### III.2.1 Réaction d' $\text{OH}^\cdot$ avec l'ADN

Bien que formé à l'extérieur du noyau et présentant une forte réactivité qui ne lui permet qu'un rayon de diffusion extrêmement faible, le radical hydroxyle a un rôle prédominant dans l'oxydation des bases de l'ADN. Sa formation à proximité de l'ADN est en effet possible via la réaction de Fenton grâce à la capacité de l'hydrogène peroxyde à traverser la membrane nucléaire et la présence d'ions métalliques dans la chromatine (Blakely et al., 1990). Il réagit avec les 4 bases de l'ADN et produit de multiples lésions oxydatives, principalement par addition au niveau des carbones C5 et C6 des pyrimidines et des carbones C5, C6 et C8 des purines (Figure 19) (Cadet et al., 1997b).

##### *Réaction avec la 2'-désoxyguanosine*

Le produit d'oxydation le plus connu de la 2'-désoxyguanosine par  $\text{OH}^\cdot$  est la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosine ou 8-oxodGuo. Cette lésion qui résulte de l'addition en C8 du radical hydroxyle a été détectée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* et est considérée comme l'une des lésions majoritairement formées par les ERO (Mauthe et al., 1995, Wang et al., 1995, Kim et Lee, 1997). Le radical intermédiaire formé lors de l'addition du radical hydroxyle en C8 peut également conduire par ouverture du cycle à la formation de la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine ou FapyGua.

##### *Réaction avec la 2'-désoxyadénosine*

De façon analogue à la désoxyguanosine, l'attaque par le radical hydroxyle de la 2'-désoxyadénosine résulte en la formation majoritaire de la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyadénosine (8-oxodAdo) et de la 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FapyAde).

##### *Réaction avec la 2'-désoxycytidine*

$\text{OH}^\cdot$  réagit de façon préférentielle au niveau de la double liaison C5=C6 de la 2'-désoxycytidine. Par réaction d'addition en C5, il en résulte la formation de 5-hydroxy-2'-désoxycytidine (5OHdCyd) et de la 5,6-dihydroxy-5,6-dihydro-2'-désoxycytidine.

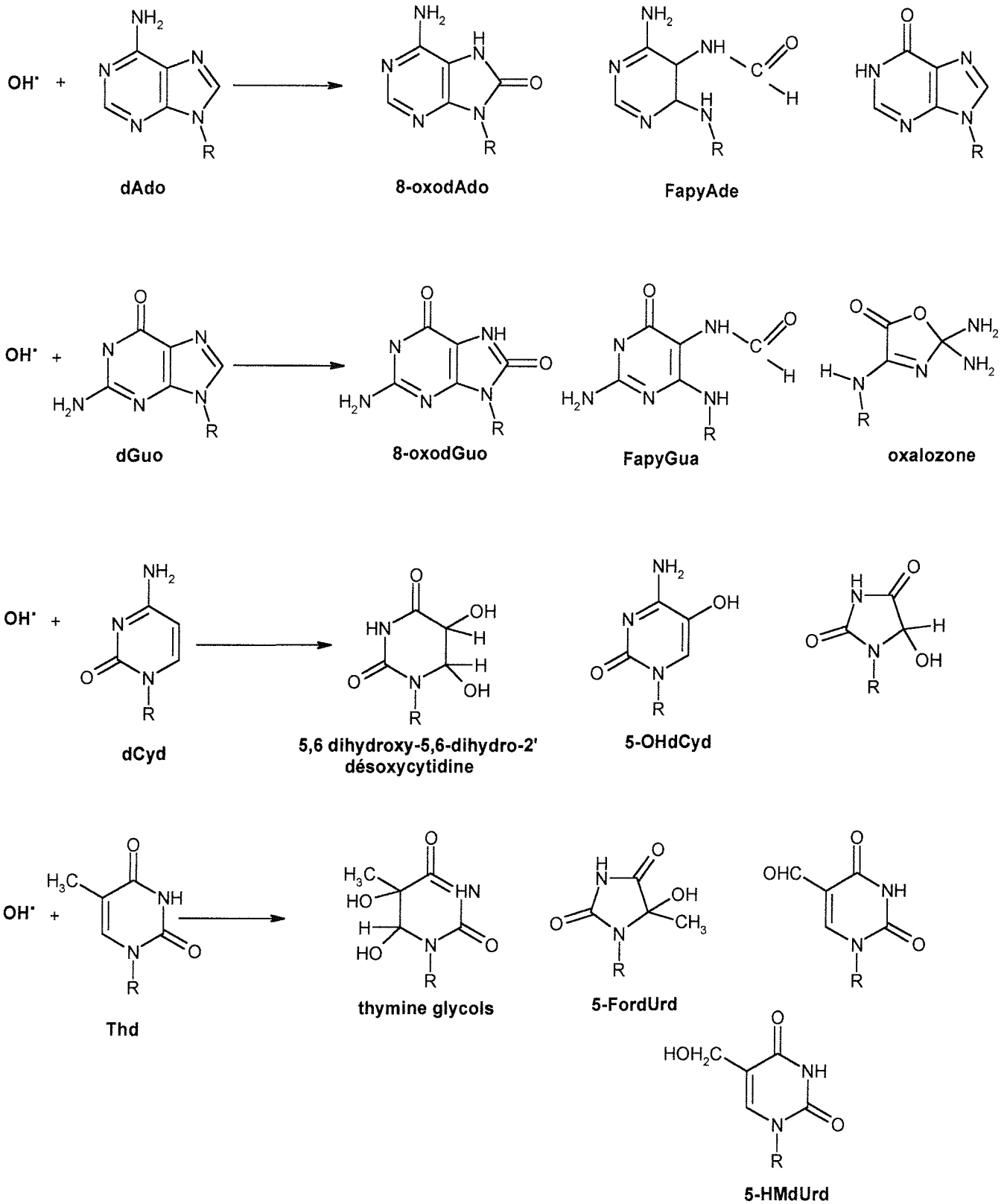


Figure 19 : Principaux produits de réaction du radical hydroxyle avec la dAdo, la dGuo, la dCyd et la Thd (d'après Cadet et al., 1997b).

*Réaction avec la thymidine*

Comme pour la 2'-désoxycytidine, l'attaque de la thymidine par le radical hydroxyle s'effectue par une réaction d'addition en C5=C6. Il en résulte la formation de 5,6-dihydro-5,6-dihydroxythymidine plus connu sous le nom de glycol de thymidine. Le radical hydroxyle peut également soustraire un atome d'H au groupement méthyle en C5 et conduire à la formation de deux autres produits : la 5-hydroxyméthyl-2'-désoxyuridine (5HMdUrd) et la 5-formyl-2'-désoxyuridine (5-FordUrd).

## III.2.2. Réaction de l'hydrogène peroxyde et de l'oxygène singulet avec l'ADN

L'hydrogène peroxyde ne réagit qu'avec l'adénine et provoque des oxydations en position N1. L'oxygène singulet ne réagit quand à lui qu'avec la 2'-désoxyguanosine avec laquelle il conduit à la formation de la 8-oxodGuo et des deux diastéréoisomères du 7,8-dihydro-4-hydroxy-8-oxo-2'-désoxyguanosine (Figure 20) (Ravanat et Cadet, 1995).

## III.2.3. Mesure des bases oxydées

Différentes méthodes analytiques permettent la mesure de ces bases oxydées de l'ADN dont notamment l'analyse par chromatographie liquide haute performance et détection électrochimique (CLHP/DE) et l'analyse par chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse (CG/SM) (Annexe II) (Floyd et al., 1986, Dizdaroglu et Bergtold, 1986, Kaur et Halliwell, 1996, Ravanat et al., 1997). Parce que ces lésions se produisent à l'état de trace ( $1/10^{-5}$  à  $10^{-6}$ ), leur mesure est très sensible aux oxydations artéfactuelles qui peuvent être liées soit à technique de mesure utilisée ou à la préparation de l'échantillon (Harris et al., 1994, Cadet et al., 1997a, 1998).

## III. 3. Systèmes de réparation des bases oxydées de l'ADN

L'observation d'un taux basal de bases oxydées à l'ADN démontre leur formation continue dans l'organisme et l'existence d'un équilibre entre les mécanismes conduisant à leur formation et les systèmes de réparation qui semblent ainsi fonctionner à un état proche de la saturation.

La réparation des bases oxydées de l'ADN est principalement assurée par le mécanisme de réparation par excision de bases (BER) et dans une moindre mesure par le NER (cf page 26, 28). Les enzymes impliquées dans ces mécanismes ont été particulièrement bien caractérisées chez *Escherichia Coli* et dans une moindre mesure chez *Saccharomyces cerevisiae* (Tableau 9) (Girard et Boiteux, 1997, Laval et al., 1998, Wang et al., 1998). La plus étudiée de toute est la formamidopyrimidine glycosylase, Fpg, capable de réparer les lésions du type 8-oxodGuo, FapyGua et FapyAde (Karakaya et al., 1997, Anson et al., 1998, Jurado et al., 1998). Chez les vertébrés des systèmes de réparation similaires ont été identifiés (Demple et Harrison, 1994).

L'isolation et la caractérisation de ces enzymes de réparation ont permis le développement de méthodes de mesure indirecte du niveau de bases oxydées à l'ADN (Pflaum et al., 1997, Anson et al., 1998).

**IV Signification biologique des dommages oxydatifs à l'ADN**

La formation de lésions oxydatives à l'ADN a été estimée comme étant de l'ordre de 200 000 par jour pour le génome humain (Newcomb et Loeb, 1995). Bien que pouvant être assez bien réparées, ces lésions semblent jouer un rôle prédominant dans le vieillissement et la mutagenèse de tous les organismes aérobies ainsi que dans le développement de certaines

Tableau 9 : Principales enzymes de réparation des bases oxydées de l'ADN chez *E. coli* et *S. cerevisiae*

<i>Escherichia coli</i>			
gène	Protéine (enzyme correspondante)	Activité	Lésions réparées
mutM ou fpg	MutM ou Fpg (formamidopyrimidine DNA glycosylase)	DNA glycosylase <sup>1</sup> , $\beta$ -lyase <sup>2</sup> , dRpase <sup>3</sup>	purines oxydées pyrimidines oxydées ?
<i>MutY</i>	MutY	DNA glycosylase	purines oxydées
<i>mutT</i>	MutT <sup>4</sup>	hydrolase	purines oxydées
<i>nth</i>	Nth ou endonucléase III	DNA glycosylase, $\beta$ -lyase	pyrimidines oxydées
<i>nei</i>	Nei ou endonucléase VIII	DNA glycosylase	pyrimidines oxydées
<i>nfo</i>	Nfo ou endonucléase IV	endonucléase (classe 2), 3'-phosphatase, 3'-phosphoglycoaldehyde diesterase	
<i>xth</i>	Xth ou exonucléase III	endonucléase (classe 2), exonucléase, 3'-phosphatase	
<i>alka</i>	Alka <sup>6</sup> ou 3-methyl-adénine DNA glycosylase ou hypoxanthine-DNA glycosylase	DNA glycosylase	résidus hypoxanthine pyrimidines oxydées purines oxydées bases alkylées ?
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
gène	Protéine (enzyme correspondante)	Activité	Lésions réparées
OGG1	ogg1 (homologue MutM)	DNA glycosylase, AP lyase	purines oxydées
NTG1	ntg1 (homologue endonucléase III)	DNA glycosylase, AP lyase	pyrimidines oxydées
NTG2	ntg2	DNA glycosylase, AP lyase	pyrimidines oxydées

<sup>1</sup>: coupure de la liaison N-glycosidique qui relie la base oxydée au ribose, <sup>2</sup>: excision de la base oxydée par coupure de l'ADN au niveau des liaisons phosphodiester situés en 3' et 5' du site abasique (réaction d'élimination  $\beta$ - $\delta$ ), <sup>3</sup>: élimination des désoxyriboses phosphates en position 5' par clivage hydrolytique du site abasique, <sup>4</sup>: purifie le pool de dNTP par hydrolyse des dNTP oxydés en dNMP et pyrophosphate, <sup>6</sup>: les résidus hypoxanthine sont générés par déamination de l'adénine et attaque de l'ADN par l'oxyde d'azote

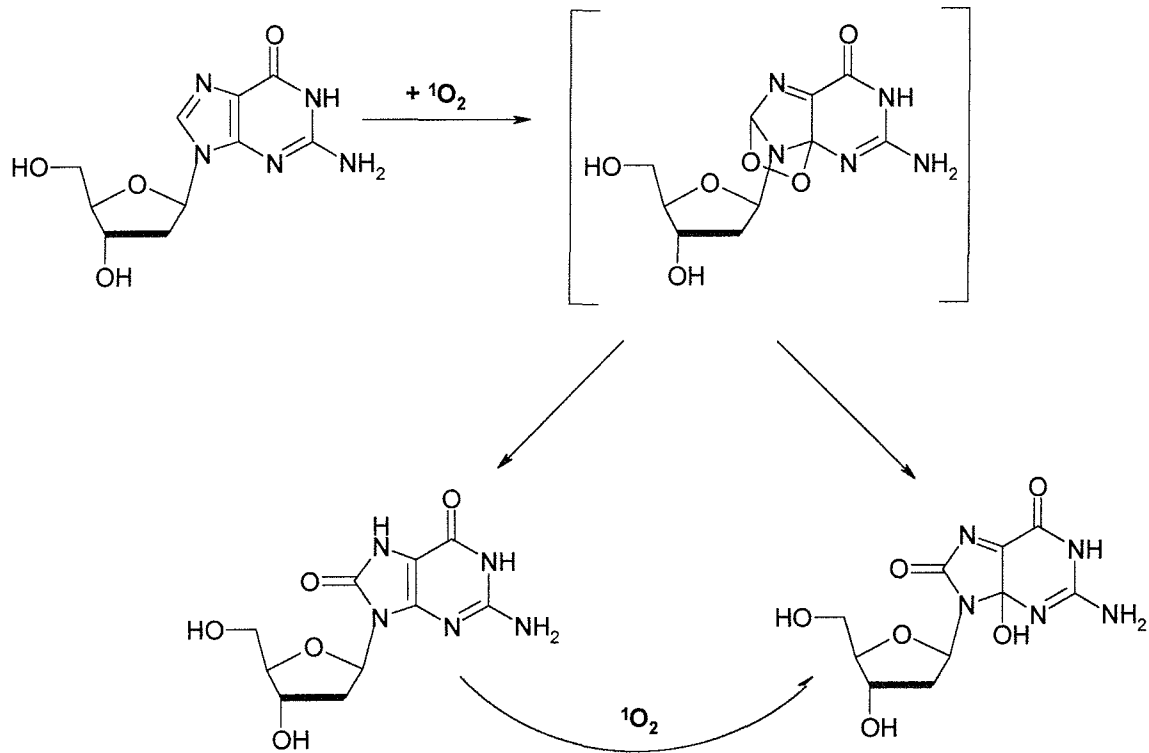


Figure 20 : Principaux produits d'oxydation de la 2'-désoxyguanosine par l'oxygène singulet : obtention de la 8-oxodGuo et des deux diastéroisomères 4R\* et 4S\* du 4,8-dihydro-4-hydroxy-8-oxo-2'-désoxyguanosine (Ravanat et Cadet, 1995).

maladies dont le cancer (Ames et al., 1993, Wiseman et al., 1995, Aruoma, 1998). Leur rôle dans le processus de la cancérogenèse a été suspecté par l'observation au laboratoire de la capacité des antioxydants et des piègeurs de radicaux libres à prévenir ou retarder le développement de néoplasmes (Guyton et Kensler, 1993, Ames et al., 1993). L'induction du cancer par le stress oxydatif pourrait donc être le résultat d'une augmentation de la production de radicaux libres et/ou d'une diminution des défenses antioxydantes (Klaunig et al., 1998).

L'exposition de cellules de mammifères à des ERO conduit à des mutations, à des transformations malignes (Weitzman et al., 1985) ainsi qu'à l'observation de profils de méthylation anormaux de l'ADN (Weitzman et al., 1985, Cerda et Weitzman, 1997). Ces derniers sont fréquemment rencontrés dans les cancers humains et les cellules immortelles (Olinski et al., 1992). Le rôle de ces radicaux dans le processus du cancer pourrait donc être lié aux conséquences, aussi bien génétiques (mutations) qu'épigénétiques (méthylation), de leur réaction avec le matériel génomique. Selon le modèle classique de cancérogenèse, ces modifications pourraient ainsi conduire à l'activation de proto-oncogènes et/ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (cf page 21).

La méthylation de l'ADN contribue à l'organisation du génome des mammifères et probablement au contrôle de l'expression des gènes (Adams, 1990, Razin et Cedar, 1991). Chez les eucaryotes supérieures, elle est assurée par la cytosine-5-méthyltransférase qui catalyse le transfert d'un groupe méthyle de la S-adenosyle-L-méthionine au C5 de la cytosine. La méthylation de l'ADN aurait un effet inhibiteur sur l'expression des gènes

eucaryotes (Yisraeli et Szyf, 1984). Dans les tissus présentant des tumeurs, une hypométhylation dominante du génome est observée parallèlement à la localisation de zones génomiques hyperméthylée (Feinberg et Vogelstein, 1983, Herman et al., 1994). Deux hypothèses ont été émises quant à l'implication de la méthylation dans le processus de la cancérogenèse chimique (Cerdeja et Weitzman, 1997). Dans la première, une modification du profil de méthylation de l'ADN pourrait conduire, par hyperméthylation, à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs et des gènes de la différenciation cellulaires et/ou, par hypométhylation, à la surexpression des proto-oncogènes. On peut noter ici que la 8-oxodGuo a été identifiée comme pouvant entraîner des modifications dans le schéma de méthylation de l'ADN (Weitzman et al., 1994). Une deuxième hypothèse repose sur la formation de cytosine méthylée qui en présence de faibles concentrations en S-adénosyle-méthionine peut, par déamination, produire un fort taux de mutations C → T, caractéristiques de celles rencontrées dans le gène suppresseur de tumeurs p53.

Parmi les lésions oxydatives de l'ADN, l'oxydation des différentes bases entraîne, lorsqu'elles ne sont pas ou mal réparées, une altération du matériel génétique via l'induction de mutations (Feig et al., 1994, Wang et al., 1998, Palmer et al., 1997). Dans le cas de la 8-oxodGuo, sa non réparation entraîne une réplication incorrecte par l'ADN polymérase au niveau de la base modifiée et des bases adjacentes (Kuchino et al., 1987). Il en résulte l'apparition de mutations par substitutions GC → TA et AT → CG (Cheng et al., 1992, Wang et al., 1998). Les mutations induites par la 8-oxodGuo correspondent au profil mutationnel principalement retrouvé dans le gène suppresseur de tumeurs p53 et les proto-oncogènes K-ras. L'induction de mutations dans ces gènes cruciaux par la 8-oxodGuo a d'ailleurs été démontrée de façon indirecte *in vivo* (Higinbotham et al., 1992). Des niveaux de bases oxydées dont la 8-oxodGuo ont été également rapportés comme étant particulièrement élevés dans les tissus présentant des tumeurs (Wang et al., 1995). Parmi les autres types de lésions à l'ADN, les sites abasiques (cf page 27) peuvent également entraîner des mutations (Newcomb et Loeb, 1995).

## V. Mesure des bases oxydées chez les organismes marins : biomarqueur potentiel du stress oxydatif

De nombreux contaminants présents dans l'environnement marin ont été identifiés chez les vertébrés comme ayant des propriétés pro-oxydantes pour les organismes exposés. Parmi ces polluants, on peut notamment citer les HAP, les composés nitroaromatiques et certains produits agrochimiques comme le paraquat (herbicide) et le lindane (pesticide) (Livingstone et al., 1990). Les dommages oxydatifs à l'ADN engendrés par l'exposition à ces contaminants (Mauthe et al., 1995, Wang et al., 1995) semble jouer un rôle important dans le processus de la cancérogenèse chimique.

La proposition de la mesure de la 8-oxodGuo comme biomarqueur du stress oxydatif chez les vertébrés et l'observation *in situ* par Malins et Haimanot (1990) de la présence de différentes bases oxydées (FapyGua, FapyAde, 8-oxodGuo, 8-oxoAdo) dans les lésions néoplasiques de soles anglaises, sont à l'origine des investigations conduites sur ce type de dommages à l'ADN chez des organismes «sentinelles».

## VI. Bilan des connaissances chez *Mytilus sp*

### VI. 1. Production d'ERO chez la moule :

La production d'oxyradicaux chez la moule a été proposée comme un mécanisme de toxicité possible des polluants de l'environnement marin (Livingstone et al., 1990, Livingstone,

1991). Parmi les processus identifiés comme stimulateurs de la production d'ERO, certains d'entre eux sont particulièrement pertinents pour l'espèce sentinelle *Mytilus sp.* Grâce à son activité de filtration, la moule est capable de bioaccumuler la plupart des polluants présents dans l'environnement marin à des concentrations qui peuvent être supérieures à celles retrouvées dans la colonne d'eau ou le sédiment (Neff, 1984, Botello et al., 1997). Dans le cas des HAP, leur métabolisme conduit chez la moule à la formation prédominante de métabolites quinones (cf pages 41-44). En raison de leur nature et leur identification chez les vertébrés comme substrats de la DT-diaphorase et de la NADPH cytochrome P450 réductase, l'exposition aux HAP et leur biotransformation en quinones apparaissent chez la moule comme des facteurs prooxydants potentiellement importants. La mise en évidence de l'existence de ces activités enzymatiques chez la moule ne fit que confirmer l'implication des HAP dans l'induction du stress oxydatif (Livingstone et al., 1990, Lemaire et Livingstone, 1993). L'absorption, via la colonne d'eau ou le sédiment, de métabolites quinones issues de la photo-oxydation ou de la dégradation biologique des HAP est également non négligeable (Burns, 1993).

En raison de la bioaccumulation dans ses tissus de métaux variés et en quantités importantes, la production d'ERO par des réactions redox mettant en jeu des métaux de transition (Aust et al., 1985) peut également être particulièrement importante chez la moule (Ostapczuk et al., 1997, Regoli, 1998).

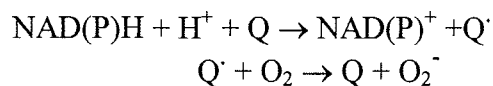
Finalement, l'induction du cytochrome P450 et des enzymes de biotransformation telles que les flavoprotéines réductases NAD(P)H-dépendantes, a déjà été observée chez la moule (Gilewicz et al., 1984, Livingstone, 1988, Michel et al., 1993). Ces enzymes peuvent respectivement générer  $O_2^-$  et/ou  $H_2O_2$  et  $O_2^-$  lors de leur cycle catalytique (Ortiz de Montellano, 1986). Le contenu en cytochrome P450 ainsi que l'activité cytochrome P450 réductase furent rapportés dans certaines études comme étant corrélés à la concentration tissulaire en HAP totaux (Solé et al., 1994, 1996).

On peut noter également ici que l'exposition à des polluants chimiques pro-oxydants peut s'ajouter, chez les organismes de la zone inter-tidale, au stress quotidien de l'hyperoxie engendrée par le cycle des marées.

## VI. 2. Induction de la production d'ERO *in vitro* chez la moule

La capacité de la ménadione (quinone modèle), des HAP et des composés nitro-aromatiques à stimuler la production d'ERO chez la moule a été démontrée *in vitro*, de façon directe ou indirecte, par la mesure :

- de l'oxygène moléculaire consommé lors de l'entrée dans les cycles redox des composés parentaux et/ou de leurs métabolites quinones (Q):



- de la production d' $O_2^-$  définie comme la part de l'activité NAD(P)H cytochrome c réductase pouvant être inhibée par la SOD
- de l'éthylène produit lors de l'oxydation de l'acide 2-keto-4-méthiolbutyrique (KMBA) par  $OH^\cdot$ , en présence d'un complexe Fe/EDTA comme promoteur de la réaction d'Haber-Weiss.

Une augmentation NAD(P)H-dépendante de la consommation en oxygène moléculaire fut ainsi démontrée lors de l'incubation de microsomes de glande digestive de moule avec le

nitrofurantoïne (Garcia Martinez et al., 1992), la N-oxyde 4-nitroquinoline (Garcia Martinez et al., 1992), la ménadione et plusieurs HAP quinones (1,2-naphthoquinone, 1,4-naphthoquinone, 9,10-phenanthrènequinone, tetramethyl-1,4-benzoquinone) (Sjölin et Livingstone, 1997). Pour chacun de ces composés, la consommation en oxygène fut plus importante en présence de NADH que de NADPH. Aucune augmentation de la consommation en  $O_2$  ne fut en revanche observée pour certaines HAP-quinones (1,4-benzoquinone, anthraquinone) dont celles du B[a]P (Sjölin et Livingstone, 1997). La production NAD(P)H-dépendante d' $O_2^-$  fut démontrée chez la moule après exposition à la ménadione, (Livingstone et al., 1989a), au nitrofurantoïne et à la N-oxyde 4-nitroquinoline (Garcia Martinez et al., 1992, 1995) confirmant ainsi, avec l'augmentation observée de la consommation en oxygène, l'entrée dans les cycles redox de ces composés modèles chez la moule.

La production d' $OH^\cdot$  a été très étudiée chez la moule en raison de sa très forte réactivité et en tant qu'oxyradical ultime des réactions de Fenton et d'Haber-Weiss. Une augmentation de la production du radical hydroxyle fut ainsi démontrée *in vitro* pour la ménadione (Livingstone et al., 1989a, Sjölin et Livingstone, 1997), le nitrofurantoïne (Garcia Martinez et al., 1990), et plusieurs HAP quinones dont chacune des 1,6-, 3,6- et 6,12-quinones du B[a]P (Garcia Martinez et Livingstone, 1995, Sjölin et Livingstone, 1997). Comme observée précédemment, la production d' $OH^\cdot$  fut plus importante en présence de NADH que de NADPH, à l'exception de la B[a]P 6,12-quinone pour laquelle aucune stimulation de la production d' $OH^\cdot$  ne fut observée en présence de NADH.

L'implication d' $H_2O_2$  et d' $O_2^-$  dans la production d' $OH^\cdot$  par la B[a]P 1,6-quinone fut déterminée par l'addition respective de CAT et de SOD dans le milieu réactionnel. Que ce soit en présence de NADPH ou de NADH, l'addition de CAT provoqua une inhibition de 80% de la production d' $OH^\cdot$  induite par la B[a]P 1,6-quinone (Garcia Martinez et Livingstone, 1995). L'effet observé de la SOD sur la production d' $OH^\cdot$  démontra que son activité était dépendante de la nature du cofacteur utilisé. Alors qu'en présence de NADPH, cette enzyme provoquait une inhibition de 27 % de la production d' $OH^\cdot$ , aucun effet ne fut observé en présence de NADH (Garcia Martinez et Livingstone, 1995).

Que ce soit pour les composés modèles (ménadione) ou les HAP quinones testés, la production NADPH-dépendante d' $OH^\cdot$  chez la moule semble impliquer en raison du rôle d' $O_2^-$  et d' $H_2O_2$ , les réactions d'Haber-Weiss et de Fenton. En présence de NADH et contrairement aux composés modèles, la production d' $OH^\cdot$  par les B[a]P quinones semble mettre en jeu d'autres radicaux libres chez la moule (Garcia Martinez et al., 1995).

**La production d'oxyradicaux par le métabolisme de composés modèles chez la moule démontre les capacités de cet organisme à exprimer un stress oxydatif. Dans le cas des HAP, la stimulation de la production d'ERO semble dépendre principalement de l'entrée dans les cycles redox de leurs métabolites quinones. Pour ces derniers, l'absence d'augmentation de la consommation en  $O_2$  rapportée par Sjölin et Livingstone (1997) semble indiquer un manque de sensibilité de cette mesure pour l'estimation de la production d'ERO. La production NADH dépendante majoritaire est en accord avec l'observation chez cet organisme d'activités microsomales de phase I NADH-dépendantes plus fortes et d'une activité DT-diaphorase NADH-dépendante plus faible dans la glande digestive (Livingstone et Farrar, 1988, Solé et al., 1994).**



VI. 3 Production d'ERO *in vivo* chez la moule

La production d'ERO *in vivo* chez la moule n'a jamais été directement démontrée néanmoins certaines conséquences du stress oxydatif ont été mesurées *in situ* et au laboratoire chez cet organisme après exposition à certains polluants chimiques.

*Variation du niveau d'expression des défenses antioxydantes*

L'induction *in vivo* d'un stress oxydatif chez la moule, par l'exposition à des polluants chimiques, peut être indiquée par des variations constatées dans le niveau d'expression de ces défenses antioxydantes. Chez cet organisme, des défenses antioxydantes similaires à celles des vertébrés, ont été identifiées (Tableau 10). L'observation au laboratoire et *in situ* de la variation du contenu/de l'activité de certaines de ces défenses antioxydantes avec l'exposition à des polluants chimiques, a contribué à la proposition de certaines d'entre elles comme biomarqueurs d'exposition aux polluants de l'environnement marin (Ribera et al., 1991, Cajaraville et al., 1992, Solé et al., 1994).

*Dommmages oxydatifs aux protéines et aux lipides*

Très peu de données concernant les dommages oxydatifs aux protéines sont disponibles chez cet organisme. Une augmentation significative du contenu en carbonyles (produit de

Tableau 10: Les défenses antioxydantes chez *Mytilus sp.*

<b>Défenses antioxydantes non enzymatiques</b>	
Vitamines A, E, C	Ribera et al., 1989, 1991
Glutathion	Ribera et al., 1991, Gamble et al., 1995
Caroténoïdes ( $\beta$ -carotène)	Livingstone et al., 1990
<b>Défenses antioxydantes enzymatiques</b>	
CAT	Livingstone, 1990, Gamble et al., 1995, Cajaraville et al., 1993
SOD	Livingstone et al., 1990, Gamble et al., 1995
Glutathion peroxydase	Livingstone et al., 1990, Regoli et al., 1998
Glutathion réductase	Lemaire et Livingstone, 1993, Regoli et al., 1998
Glyoxalase I et II	Regoli et al., 1998
Aldéhyde deshydrogénase	Lemaire et Livingstone, 1993
NAD(P)H DT-diaphorase	Livingstone et al., 1990, Lemaire et Livingstone, 1993

dégradation oxydative des protéines) fut néanmoins démontrée dans la glande digestive de moules exposées au cuivre (Kirchin et al., 1992). Cette augmentation fut particulièrement observée dans le cytosol et dans les lysosomes de la glande digestive, ces compartiments cellulaires ayant été identifiés comme des sites de séquestration préférentiel des métaux chez cet organisme.

La peroxydation lipidique chez la moule a été mesurée de façon indirecte par la formation de malonaldéhyde (Livingstone et al., 1990). Sur le terrain, une augmentation de la peroxydation lipidique avec le niveau de contamination du milieu fut ainsi observée dans la glande digestive de moule (Moore, 1988). Au laboratoire, l'exposition à du B[a]P conduit à une augmentation de la quantité de peroxydes lipidiques présents dans la glande digestive, parallèlement à une diminution de la quantité de lipides peroxydables (Livingstone et al., 1990). Ribera et al. (1991) firent des observations identiques dans la glande digestive, les branchies et le manteau de moules exposées à la ménadione.

### *Dommages à l'ADN*

#### Mesure des cassures à l'ADN simple et double-brins

La formation de cassures à l'ADN a été identifiée comme l'un des effets génotoxiques du stress oxydatif. L'application chez la moule des techniques d'éluion (Bihari et al., 1990, Bolognesi et al., 1996) et de dénaturation alcaline (Shugart, 1988, Nacci et al., 1992) ainsi que l'utilisation récente de la très prometteuse méthode Comet (Mitchelmore et Chipman, 1998, Wilson et al., 1998, Steinert et al., 1998) ont permis de démontrer l'induction de ce type de dommages oxydatifs à l'ADN chez la moule après exposition à des xénobiotiques multiples et variés (Tableau 11).

#### Mesure des bases oxydées chez *Mytilus sp.*

La 8-oxodGuo est la seule base oxydée à avoir été mesurée chez la moule. Marsh et al. (1993) furent les premiers à mesurer ce type de dommage à l'ADN chez *Mytilus edulis* après exposition *in vivo* à la ménadione et au nitrofurantoïne. Pour chaque composé, des moules furent exposées via la colonne d'eau à une concentration de 100 ppb pendant 2 à 4 jours et le niveau de 8-oxodGuo déterminé par CLHP/DE dans la glande digestive des organismes exposés. Aucune augmentation du niveau de 8-oxodGuo ne fut observée avec l'exposition à la ménadione et au nitrofurantoïne, les valeurs rapportées allant de  $22 \pm 6$  8-oxodGuo/10<sup>5</sup>dGuo (animaux témoins) à  $46 \pm 35$  8-oxodGuo/10<sup>5</sup>dGuo (animaux exposés à la ménadione). Les niveaux mesurés au cours de cette expérimentation ne furent pas différents de ceux obtenus *in situ* chez des animaux endogènes à la baie de Plymouth (16 à 46 8-oxodGuo/10<sup>5</sup>dGuo) (Marsh et al., 1993).

L'effet d'une exposition au B[a]P (0,5 à 1000 ppb) sur la formation de 8-oxodGuo dans l'ADN de glandes digestives et de branchies fut également étudié chez *Mytilus galloprovincialis* par Canova et al. (1998). Une augmentation du niveau de 8-oxodGuo fut ainsi mis en évidence dans l'ADN de branchies après 48 h d'exposition à 5, 50 et 100 ppb de B[a]P et 72 h d'exposition à 5, 50 et 1000 ppb. Dans l'ADN de glande digestive, une augmentation significative du taux de 8-oxodGuo fut également observée après 48 h d'exposition à 100 et 1000 ppb et 72 h d'exposition pour les concentrations supérieures ou égales à 0,5 ppb. Les niveaux mesurés dans la glande digestive ( $10,85 \pm 3,77$  à  $28,51 \pm 1,85$  8-oxodGuo/10<sup>5</sup>dGuo pour les témoins et le groupe exposé 72h à 100 ppb de B[a]P respectivement) furent plus élevés que dans les branchies ( $2,24 \pm 0,27$  à  $7,66 \pm 0,69$  8-oxodGuo/10<sup>5</sup>dGuo pour les témoins et le groupe exposé 72h à 100 ppb respectivement). Dans chacun des deux tissus étudiés, l'augmentation linéaire du niveau de 8-oxodGuo avec la

Tableau 11: Production de cassures de brins à l'ADN chez la moule par l'exposition au laboratoire à des composés génotoxiques (d'après Mitchelmore et Chipman, 1998).

Agents chimiques	Type de cellules	In vitro/in vivo	Espèces	Technique	Référence
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> MX MNNG B[a]P 1-NP NF	Glande digestive	<i>In vitro</i>	<i>Mytilus edulis</i>	C	Mitchelmore et Chipman, 1998
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Branchies	<i>In vitro</i>	<i>Mytilus edulis</i>	C	Wilson et al., 1998
MNNG Cu	Branchies	<i>In vivo</i>	<i>Mytilus edulis</i>	DA	Nacci et al., 1992
B[a]P	Glande digestive Branchies	<i>In vivo</i>	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	EA	Herbert et Zahn, 1990
	Haemolymphe	<i>In vivo</i>			Bihari et al., 1990
MitC FA	Haemolymphe	<i>In vivo</i>	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	EA	Batel et al., 1993
DMS	Haemolymphe	<i>In vivo</i>	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	DA	Accomando et al., 1991
DMB	Branchies	<i>In vivo</i>	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	EA	Bolognesi et al., 1996

Abbréviations : MX : 3-chloro-4-(dichlorométhyle)-5-hydroxy-(5H)-furanone, MNNG : N-méthyle-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 1-NP : 1-nitropyrene, NF : nitrofurantoin, MitC : mitomycine C, FA : formaldéhyde, DMS : diméthyle sulfate, DMB : diméthylbenzanthracène, C : Comet, EA : élution alcaline, DA : dénaturation alcaline.

concentration en B[a]P ne fut pas validé en raison de la diminution ou de l'absence d'effets observés pour certaines doses supérieures et/ou intermédiaires.

Les résultats obtenus au cours de ces deux études montre que les niveaux de 8-oxodGuo mesurés chez la moule sont relativement élevés par rapport à ceux indiqués chez les vertébrés (Annexe II). Bien que la bioaccumulation de métaux chez la moule soit importante et puisse justifier l'hypothèse d'une formation d'ERO en plus grande quantité chez cet organisme, les différences de niveaux rapportés entre ces deux études laissent supposer une surestimation possible des niveaux de 8-oxodGuo chez cet organisme (Annexe II).

La mise au point d'un protocole adapté à la mesure de la 8-oxodGuo chez cet organisme apparaît donc comme primordiale pour la mesure précise du taux de formation de base de cette lésion à l'ADN. Parce qu'elle se produit à l'état de trace, une oxydation artéfactuelle des échantillons lors de leur préparation peut en effet conduire à une surestimation des niveaux mesurés et rendre ainsi difficile tout exercice d'intercomparaison. La présence d'un bruit de fond trop important est également défavorable à l'observation d'éventuels effets sur le niveau de cette base oxydée. Le développement d'un tel protocole devra ainsi permettre l'acquisition de données supplémentaires nécessaires à la validation ou non de l'utilisation de cette mesure comme biomarqueur du stress oxydatif chez la moule.

## **OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE**



## Objectifs généraux du travail de thèse

Les nombreux travaux menés depuis ces dernières années sur l'utilisation possible de la mesure des adduits à l'ADN et de la 8-oxodGuo comme marqueurs respectifs de génotoxicité et du stress oxydatif chez les vertébrés, ont suscité l'investigation de ces deux types de dommages à l'ADN chez la moule en vue d'une application potentielle en biosurveillance de l'environnement marin. La formation de ces lésions, proposée chez les vertébrés comme un événement crucial de l'initiation de la cancérogenèse chimique, pourraient avoir des applications directes en tant que biomarqueurs de génotoxicité chez la moule et permettre ainsi la prédiction des effets à long terme de l'exposition aux contaminants génotoxiques présents dans le milieu naturel. Dans ce cas, leur signification en terme d'effets sur les écosystèmes pourrait être plus importante que celle des seuls biomarqueurs d'exposition plus communément mesurés chez cet organisme « sentinelle ». Il est important de souligner ici que l'identification structurale des adduits formés pourraient également permettre de préciser les voies d'activation métaboliques présentes chez cet organisme et d'identifier ainsi les molécules à l'origine de l'expression des effets génotoxiques.

Les HAP étant l'une des classes de contaminants majeurs de l'environnement marin, l'étude de la formation d'adduits et de 8-oxodGuo à l'ADN de moule a été réalisée dans le cas d'une exposition au B[a]P. Cet HAP a en effet été le plus utilisé pour les études de cancérogenèse chimique. Parce que cette étude nécessitait des conditions d'exposition contrôlées, un modèle d'exposition *in vivo* au B[a]P a dans un premier temps été développé au laboratoire pour cette espèce sentinelle. Bien que la contamination de ce bivalve marin par la colonne d'eau ou le sédiment ait été majoritairement utilisée dans les études de toxicologie de l'environnement, la contamination des moules par la voie trophique a été retenue pour notre modèle d'exposition. Cette voie d'exposition semblait en effet plus proche des conditions du milieu : la contamination *in situ* des moules étant liée à leur activité de filtration et donc d'alimentation.

Parce que ce modèle d'exposition devait permettre l'étude des dommages à l'ADN chez les animaux exposés, la vérification de la biodisponibilité du B[a]P incorporé dans la nourriture a été étudié via la cinétique de transfert du B[a]P dans les différents tissus de moule (Figure 21). L'utilisation de B[a]P radiomarqué devait, par l'étude de la cinétique de liaison à l'ADN des métabolites du B[a]P, permettre d'estimer la formation d'adduits à l'ADN pour les conditions d'exposition choisies.

A l'issue des résultats obtenus, la cinétique de formation et d'élimination des adduits et de la 8-oxodGuo à l'ADN de branchies et de glande digestive de moule a été déterminée en fonction du temps et de la dose d'exposition au B[a]P. Les niveaux d'adduits à l'ADN ont été mesurés par l'application de la techniques de post-marquage au <sup>32</sup>P, en collaboration avec le Dr P. Venier de l'Université de Padoue, Italie, et le Prof A. Leszkowicz de l'ENSAT de Toulouse. La 8-oxodGuo a été mesurée par CLHP-DE.

Les études expérimentales ont été complétées par des études de terrain suivant deux stratégies différentes :

- Mesure des adduits à l'ADN de moules transplantées au cours d'une expérience de « caging » le long des côtes méditerranéennes françaises et collectées au cours de la mission RINBIO.
- Mesure de la 8-oxodGuo à l'ADN de moules issues de gisements naturels, collectées le long des côtes italiennes et grecques au cours de la mission BIOMAR IV.

A partir des résultats obtenus, il s'agira non seulement d'établir une relation entre la dose d'exposition et l'étendue des dommages à l'ADN mais également de proposer une approche mécanistique par l'étude des paramètres biochimiques impliqués dans l'activation du B[a]P. La détermination des capacités de la moule à réparer ces types de dommages à l'ADN aura quant à elle son importance pour juger de la réversibilité des effets. L'ensemble de ces investigations devra permettre de discuter la proposition ou non des adduits à l'ADN et de la 8-oxodGuo comme biomarqueurs d'effets des HAP chez la moule et de se prononcer ainsi sur leur incorporation possible dans les batteries de tests utilisées pour la gestion ou la réhabilitation de sites contaminés.



**TAXONOMIE:**

classe: bivalves ou laméllibranches  
ordre: filibranches  
famille: Mytilidés  
genre: *Mytilus*  
espèce: *edulis*, *galloprovincialis* (Europe)

**ANATOMIE:**

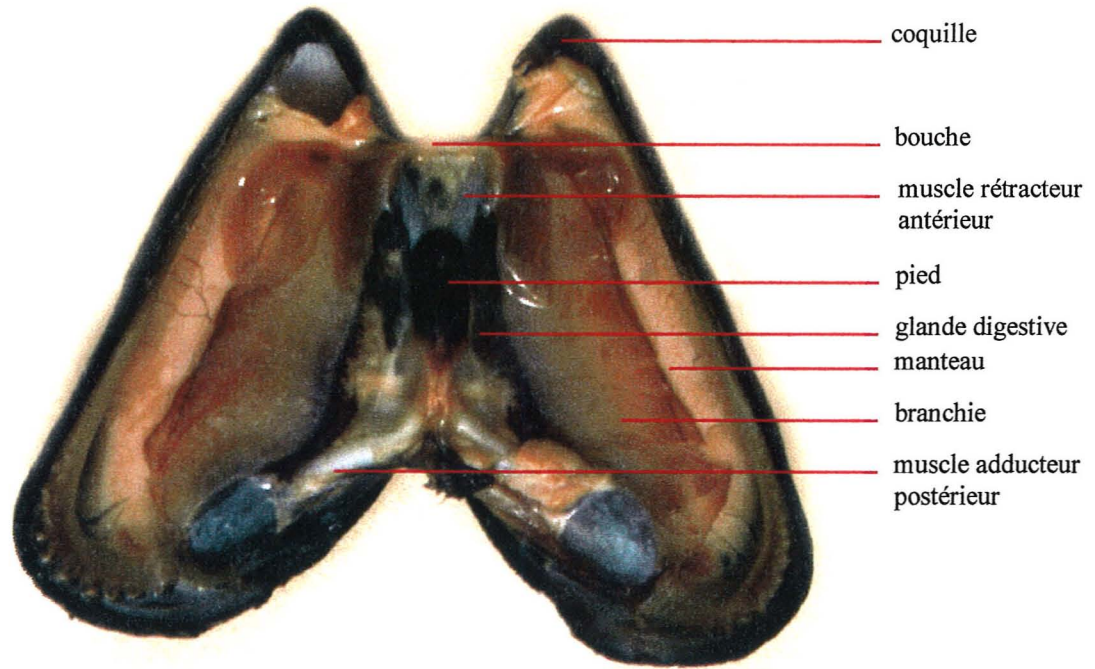


Figure 21: La moule, *Mytilus* sp: taxonomie et anatomie (Photographies: G & M-T Thébaud)



**DEUXIEME PARTIE**  
**RESULTATS**



## **CHAPITRE 1**

**Mise en place d'un système d'exposition par la voie trophique au benzo[a]pyrène pour l'espèce sentinelle, *Mytilus sp* et validation du modèle d'exposition pour l'étude de la formation d'adduits du B[a]P à l'ADN**



## Développement d'un système d'exposition par la voie trophique au B[a]P pour l'espèce sentinelle *Mytilus sp*

### I. Principes de base du modèle d'exposition

La contamination des bivalves marins étant exclusivement liée à leur activité de filtration, l'exposition des animaux au B[a]P par la voie trophique a été sélectionnée pour notre modèle d'exposition. Chez les vertébrés, la bioaccumulation du B[a]P ayant été démontrée comme étant fortement dépendante de la nature du bol alimentaire (Stavric et Klassen, 1994), la prise en compte de ce paramètre n'en était que plus justifié. Parce que la présence de nourriture en quantité trop abondante peut réduire l'activité de filtration des bivalves marins, l'apport de nourriture dans les aquariums a été étalé sur une période de 8 heures à l'aide d'une pompe péristaltique.

De manière à simplifier le schéma d'exposition, le compartiment sédimentaire n'a pas été représenté dans notre modèle. Le sédiment présentant une forte capacité d'absorption des polluants de type HAP, la non considération de ce compartiment devait permettre une meilleure maîtrise des doses d'exposition. Les deux seuls compartiments représentatifs du milieu marin ont donc été la colonne d'eau et le compartiment biologique, représenté ici par la moule.

L'utilisation d'eau de mer naturelle issue de la baie d'Arcachon a été préférée à la fabrication d'eau de mer artificiellement reconstituée. Outre les motivations de ce choix d'ordre économique, il semblait important de ne pas s'affranchir de la présence de matière organique particulière dont dépend fortement l'activité de filtration des moules.

De façon à contrôler les doses de nourriture et de contaminant et assurer la qualité de notre eau de mer au cours de l'expérience, le renouvellement journalier de l'eau a été programmé. Lorsqu'il en a été possible, des filtres externes au charbon actif ont été utilisés pour permettre une maintenance moins contraignante des aquariums. Le fonctionnement des filtres a néanmoins été déclenché uniquement lorsque les moules n'étaient plus alimentées. La rétention des particules alimentaires et donc du contaminant sur les filtres aurait en effet entraîné une diminution de la dose théorique d'exposition.

De manière à maintenir une charge constante dans l'aquarium, le volume d'eau fourni par individu a été maintenu constant (volume d'eau/nombre de moules = k). L'échantillonnage d'animaux en cours d'expérience a donc été compensé soit par l'introduction d'animaux 'de compensation' soit par le réajustement du volume d'eau dans les bacs.

Les variations de température pouvant être responsables de modifications physiologiques chez la moule, la température de l'eau a été maintenue stable au cours de l'expérimentation. La réalisation des expériences dans une pièce climatisée et le remplissage des bacs plusieurs jours avant l'introduction des animaux a ainsi permis la mise en température de l'eau à celle de la pièce (18°C).

L'oxygène a été pourvu dans chaque aquarium par l'utilisation du matériel communément utilisé en aquariophilie.

## II. Choix de la nourriture

Parce que nous avons choisi de contaminer les moules par la voie trophique, il était nécessaire de fournir aux animaux une nourriture appropriée tant sur le plan quantitatif que qualitatif.

De façon à ne pas compliquer la maintenance du système d'exposition, la mise en culture parallèle de microalgues ne pouvait être envisagée. Deux types de solution nutritive pour invertébrés marins, disponibles dans le commerce, ont donc été sélectionnés comme source d'alimentation potentielle de nos animaux. La composition de chacune de ces solutions respectivement, Liquizell (Hobby, Allemagne) et Marine Liquifry (Interpet, Angleterre) est partiellement indiquée par le fabricant. Alors que la première semble constituer exclusivement de spiruline (microalgues), la seconde est entièrement industrielle (Tableau 12).

Compte tenu des données citées dans la bibliographie (Riisgard et al., 1981) et de la posologie recommandée par chaque fabricant, deux rations journalières ont été testées chez la moule pour chaque type d'aliment pendant une période de 15 jours:

Liquizell :

- Régime A: 21 mg équivalent poids sec/individu/jour
- Régime B: 10 mg équivalent poids sec/individu/jour

Marine Liquifry :

- Régime C: 28 mg équivalent poids sec/individu/jour
- Régime D: 59 mg équivalent poids sec/individu/jour

Pour chaque solution nutritive, l'équivalence poids humide/poids sec fut préalablement déterminée par la pesée de 1 ml de solution, avant et après incubation à 60°C pendant 48h dans une étuve.

L'hydrosolubilité dans l'eau de chacune de ces solutions et l'évolution du poids individuel moyen des animaux ainsi alimentés ont été les paramètres utilisés pour sélectionner le type de nourriture et la dose journalière la mieux appropriée à notre étude. La dose de nourriture doit en effet permettre une augmentation ou tout au moins une stabilisation du poids de l'animal pendant toute la durée de l'expérimentation, garantissant ainsi un bon état physiologique de la moule.

Tableau 12 : Informations disponibles sur la composition du Marine Liquifry et du Liquizell

	Marine Liquifry	Liquizell
Composition (% de poids sec)	Protéines 34,8 ± 4,8 Lipides 13,6 ± 3,8 Fibres 1,5 ± 1,3 Cendres 7,7 ± 3,0	Spiruline
Correspondance volume/poids sec	141 mg matière sèche/ml	54 mg matière sèche/ml



## II. 1. Modèle d'exposition

Les moules, *Mytilus galloprovincialis*, utilisées au cours de cette expérience ont été achetées à la Teste (Océan Atlantique, France) auprès Des Viviers d'Aquitaine. Originaires de Rya de la Rosa (Gallice, Espagne), elles ont été gardées en viviers avant commercialisation. De retour au laboratoire, les moules ont été débarrassées des organismes parasites externes et triées de façon à constituer un groupe de taille homogène.

Une rampe de 5 aquariums d'une contenance de 30 l chacun a été utilisée pour cette expérience. Dans chaque aquarium, 42 moules ont été gardées en stabulation dans une eau de mer stabilisée à 18°C et provenant de la baie d'Arcachon (35 ‰). L'eau a été oxygénée en continu par un système de bulleurs (Réna). De façon à ne pas renouveler l'eau des bacs tous les jours, un système de filtration a été utilisé. Un filtre de charbon actif (Actikool) placé dans le compartiment annexe de chaque aquarium a ainsi permis, selon le principe des vases communicants, une filtration continue de l'eau de mer à l'exception faite des heures pendant lesquelles la nourriture a été apportée dans les aquariums.

Les animaux d'un des 5 aquariums n'ont été nourris avec aucune nourriture de manière à servir de témoins. Deux aquariums ont été consacrés à l'essai de chacune des deux doses de Marine Liquifry et deux autres à celles de Liquizell. Dans chaque aquarium essai, la quantité totale de nourriture a été apportée progressivement, dans un même volume d'eau, pendant une durée de 8 heures grâce à l'utilisation d'une pompe péristaltique (Technicon).

L'expérience a été conduite pendant une durée de 15 jours et 8 individus ont été échantillonnés dans chaque aquarium après 0, 3, 8 et 15 jours d'expérimentation. Le poids individuel humide et sec de chaque moule a été déterminé par gravimétrie, le poids sec ayant été obtenu après une période d'incubation de 48 h à 60°C (conditions pour lesquelles on arrive à un poids sec constant).

## II. 2. Résultats

### II. 2. 1. Analyse statistique

Pour chaque groupe, l'évolution au cours du temps du poids individuel humide et sec a été déterminée grâce à la réalisation d'une ANOVA (Statistica Soft. Inc) en prenant comme facteur le temps d'expérimentation. L'homogénéité des variances a été préalablement vérifiée par la réalisation d'un test de Hartley. Chaque fois que l'effet du temps sur chacun de ces paramètres fut démontré comme étant statistiquement significatif, un test *a posteriori* (Test de Newman Keuls) fut réalisé (Statistica Soft. Inc.).

### II. 2. 2. Données brutes

Les mesures du poids individuel sec et humide de moule obtenues au sein de chaque groupe sont récapitulés Figure 22. Les résultats des différentes ANOVA sont quant à eux résumés tableau 13.

### II. 2. 3. Interprétation des résultats

Aucune différence de poids individuel sec et humide n'a été observée pendant les 15 jours de l'expérimentation chez les moules témoins, n'ayant reçu aucune source de nourriture. Il est

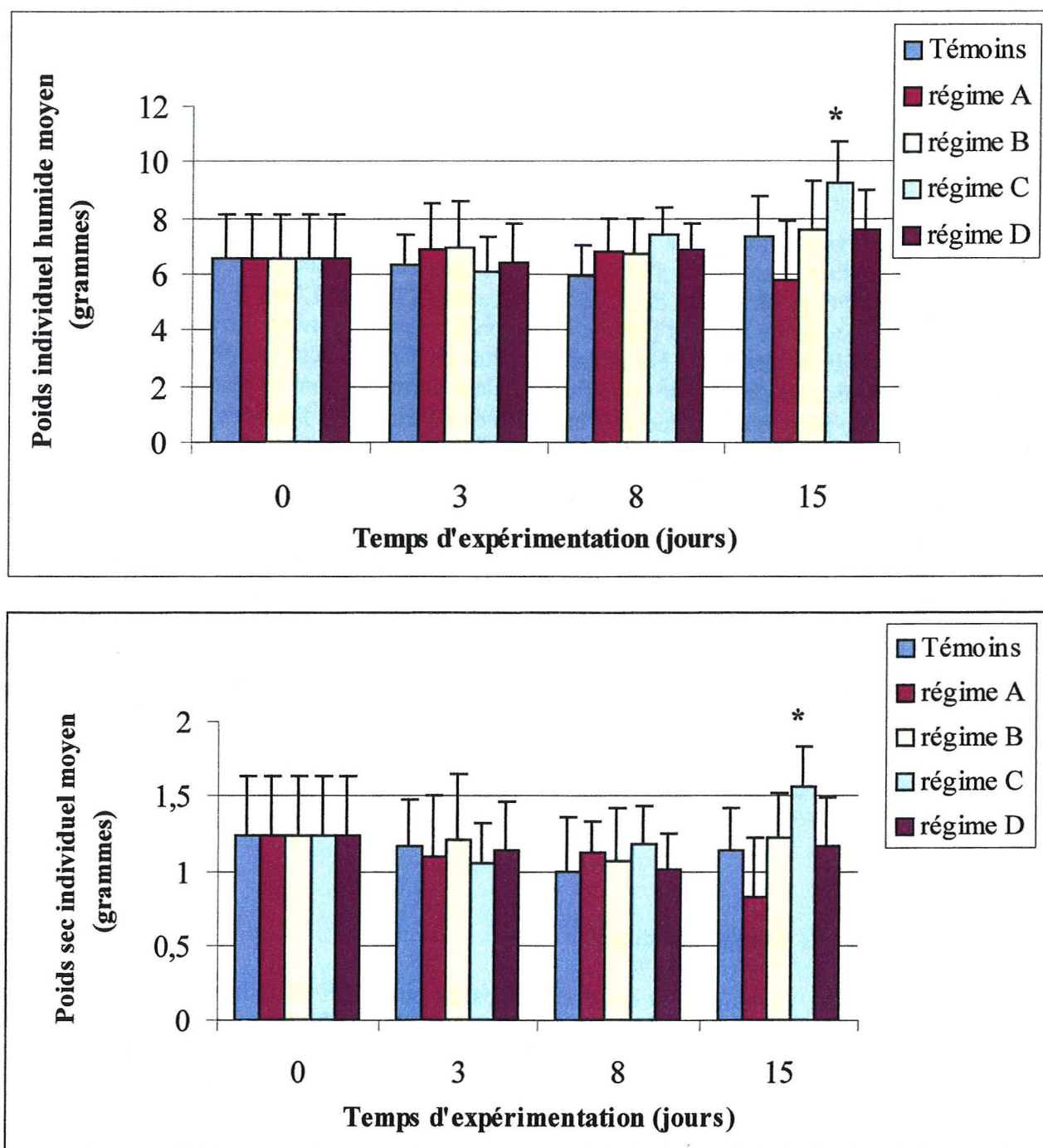


Figure 22 : Evolution au cours du temps du poids individuel moyen (humide et sec) des moules de chacun des 5 groupes d'expérimentation. \* : significatif à  $p < 0.05$ .

peu probable que la présence initiale de matière particulaire dans l'eau de mer ai pu permettre l'assouvissement des besoins alimentaires de ces moules pendant les 15 jours de l'expérimentation. L'absence de perte de poids observée chez ces animaux pourrait donc être expliquée par une durée d'expérimentation trop courte pour l'observation d'un tel changement chez la moule, caractérisé par un métabolisme faible en comparaison à celui des vertébrés.

Comme pour les moules témoins, aucune variation de poids n'a été observée chez les animaux alimentés avec les régimes A, B et D. Le régime C a quant à lui conduit à une augmentation significative du poids individuel humide et sec au 15<sup>ème</sup> jour de l'expérimentation.

Tableau 13 : Résultats de l'analyse statistique concernant l'étude de l'effet du temps d'alimentation sur le poids individuel humide et sec de chaque groupe

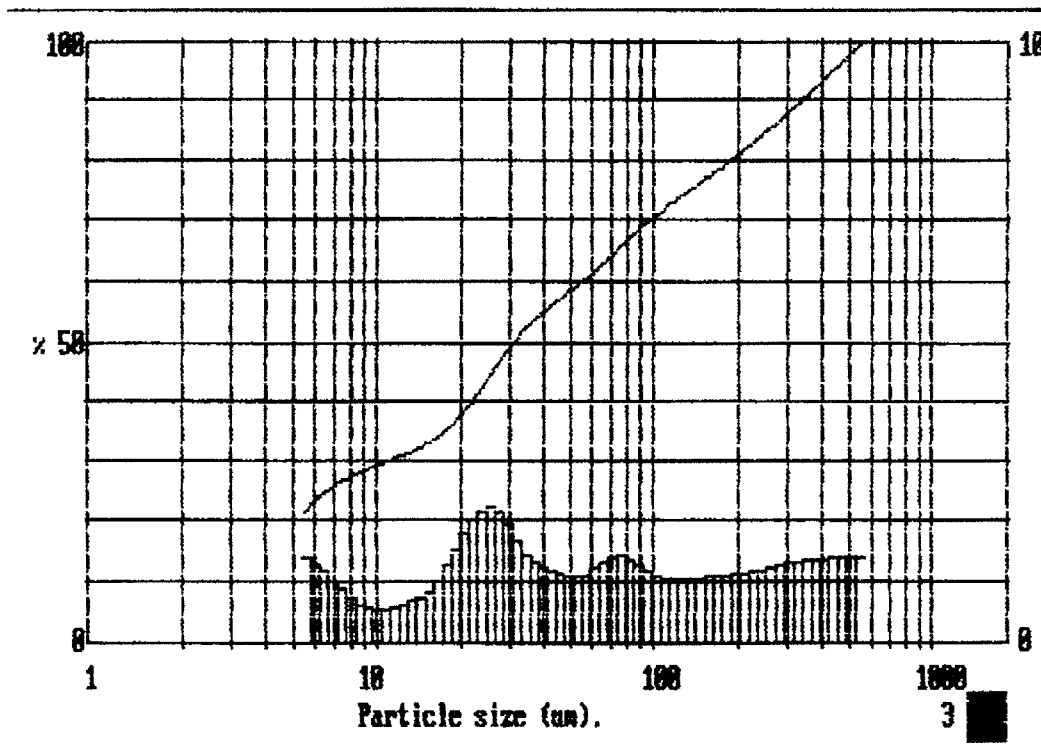
	Poids individuel humide moyen	Poids individuel sec moyen
<b>Groupe témoin</b>	Pas d'évolution au cours du temps (F = 1.65, dl = 3/28, p = 0.200)	Pas d'évolution au cours du temps (F = 0.63, dl = 3/28, p = 0.601)
<b>Régime A</b>	Pas d'évolution au cours du temps (F = 0.76, dl = 3/28, p = 0.528)	Pas d'évolution au cours du temps (F = 1.82, dl = 3/28, p = 0.166)
<b>Régime B</b>	Pas d'évolution au cours du temps (F = 0.67, dl = 3/28, p = 0.578)	Pas d'évolution au cours du temps (F = 0.36, dl = 3/28, p = 0.781)
<b>Régime C</b>	Effet significatif avec le temps (F = 8.43, dl = 3/28, p < 0.001) Augmentation significative au 15 <sup>ième</sup> jour d'alimentation	Effet significatif avec le temps (F = 3.98, dl = 3/28, p < 0.02) Augmentation significative au 15 <sup>ième</sup> jour d'alimentation
<b>Régime D</b>	Pas d'évolution au cours du temps (F = 1.21, dl = 3/28, p = 0.325)	Pas d'évolution avec le temps (F = 0.62, dl = 3/28, p = 0.608)

L'absence d'effet observé de la solution nutritive Liquizell sur le poids des animaux est en accord avec l'observation d'une mauvaise solubilité dans l'eau de mer. Une répartition très localisée de cette nourriture à la surface des aquariums a en effet été observée pendant toute la durée de l'expérimentation. Les moules n'ont donc pas pu filtrer et absorber cette nourriture de façon efficace.

La solution de Marine Liquify apparaît quant à elle utilisable dans le cadre de notre modèle d'exposition. Outre le fait qu'elle présente une très bonne solubilité dans l'eau de mer et une granulométrie adaptée aux capacités d'assimilation de la moule (Figure 23), la variation de couleur du contenu digestif des moules ainsi alimentées, témoigne de l'absorption de cette nourriture au cours de l'expérience. Alors qu'à J0, la glande digestive de moule présente une coloration vert kaki liée à la présence de microalgues dans le tube digestif, une coloration blanchâtre, couleur de la solution de Marine Liquify, est observée dès le 3<sup>ième</sup> jour d'alimentation. Néanmoins, en raison de l'absence d'effet observé avec le régime D, sa filtration et son absorption par la moule semblent dépendre de sa concentration dans l'eau. La régulation de l'activité de filtration des moules en fonction de la qualité et de la quantité de nourriture a ainsi été décrite dans la littérature (Ibarrola et al., 1998).

A l'issue de cette expérience, le régime C (Marine Liquify, 28 mg/moule/jour) a été sélectionné pour notre modèle d'exposition dans la mesure où il permet le maintien des moules en stabulation dans un bon état physiologique. Il était intéressant d'estimer également l'efficacité d'assimilation de cette nourriture pour la détermination des doses d'exposition en B[a]P de nos expériences futures.

**MALVERN** Instruments SB 60D 17 Sep 1997 16:31 am



Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				173	2.2	150	76.8	29.5	4.4	25.4	44.4	10.75
				150	2.2	129	74.6	25.4	4.4	21.9	40.0	D[4,3]
				129	2.2	111	72.4	21.9	3.6	18.9	36.4	99.96µm
				111	2.2	96.0	70.1	18.9	2.5	16.3	33.9	
564	2.9	487	97.1	96.0	2.6	82.5	67.5	16.3	1.7	14.1	32.2	D[3,2]
487	2.9	420	94.3	82.5	2.8	71.5	64.7	14.1	1.3	12.1	30.9	9.78µm
420	2.8	362	91.4	71.5	2.8	61.5	61.9	12.1	1.2	10.4	29.7	
362	2.7	313	88.7	61.5	2.3	53.0	59.6	10.4	1.1	9.05	28.6	D[V,0.9]
313	2.6	270	86.1	53.0	2.2	45.8	57.4	9.05	1.4	7.80	27.2	335.20µm
270	2.5	233	83.6	45.8	2.4	39.5	54.9	7.80	2.0	6.70	25.2	
233	2.4	201	81.2	39.5	2.7	34.1	52.2	6.70	2.5	5.80	22.8	D[V,0.1]
201	2.3	173	79.0	34.1	3.5	29.5	48.8	5.80	22.8	1.50	0.0	3.21µm
Source =	:Sample			Beam length =	2.2 mm			Model indp				D[V,0.5]
Focal length =	300 mm			Log. Diff. =	1.819			Volume Conc. =	0.0467%			30.89µm
Presentation =	pii			Obscuration =	0.2699			Sp. S.A	0.6133 µ²/cc.			Shape OFF
				Volume distribution								

Figure 23: Granulométrie laser de la solution nutritive de Marine Liquify. ○ La taille moyenne des particules de cette solution est de 30.89 µm. ● 70.1 % des particules ont une taille inférieure ou égale à 111 µm.

*Calcul de l'efficacité d'assimilation (EA) du régime C:*

Ce calcul a été réalisé sur la base des différences significatives de poids sec démontrées entre les moules nourries au régime C et celles du groupe témoin.

- Poids sec individuel moyen après 15 jours d'alimentation au régime C : 1.556 g
- Poids sec individuel moyen des témoins à J0 = 1.231 g
- Variation moyenne du poids sec moyen :  $1.556 - 1.231 = 0.325$  g
- Gain journalier moyen en poids sec par individu :  $0.325 \text{ g}/15 = 0.022$  g soit 22 mg
- % moyen de gain par individu et par jour :  $\sum [(m_j - m_{j-1}) / (m_{j-1})] \times 100 / 15 = 1.60$
- $EA = (22/28) \times 100 = 72 \%$

Le même type de calcul réalisé par comparaison avec le groupe témoin à J15 donne une AE de 100 %.

Dans cette étude, l'EA calculée de la solution de Marine Liquifry est forte, + de 70%. Néanmoins, ce n'est qu'une valeur estimée qu'il faut considérer avec précaution. En effet, il existe des méthodes beaucoup plus précises de l'EA (Allison et al., 1998, Ibarrola et al., 1998).

## Validation du modèle d'exposition pour l'étude de la formation des adduits du B[a]P à l'ADN chez *Mytilus sp*

### I. Objectifs du travail

L'utilisation de notre modèle d'exposition pour l'étude de la formation d'adduits du B[a]P à l'ADN chez la moule doit répondre à plusieurs impératifs :

- le B[a]P incorporé dans la solution de Marine Liquifry doit être biodisponible pour la moule de façon à permettre une biotransformation possible du B[a]P en espèces électrophiles pour l'ADN. L'étude au cours du temps de la bioaccumulation de ce contaminant dans les différents tissus de moule devra permettre de juger de son absorption chez les organismes exposés.
- Pour la dose et le temps d'exposition choisie, il est important de déterminer si la formation d'adduits à l'ADN a pu être induite au cours de l'expérience. En effet, en raison du travail important et du coût de l'analyse des adduits à l'ADN par la technique de post-marquage au  $^{32}\text{P}$ , il est primordial d'estimer au mieux la qualité des échantillons qui seront obtenus.

Dans le but de répondre à chacun de ces objectifs :

- les moules ont été exposées par la voie trophique à du B[a]P radiomarqué et les cinétiques de bioaccumulation et de liaison à l'ADN de  $[^3\text{H}]\text{B[a]P}$  ont été déterminées dans les différents tissus de moule.
- la concentration en B[a]P de la solution nutritive de Marine Liquifry a été déterminée de façon à exposer les animaux à une dose de 50 mg B[a]P/kg poids sec de moule/jour :
  - Quantité de Marine Liquifry apportée par jour et par individu : **28 mg**
  - Poids sec individuel moyen : **~1 g**
  - Quantité de B[a]P à apporter par jour et par individu pour atteindre une dose de 50 mg/kg p. s. moule/jour = **50 µg**
  - Concentration en B[a]P de la solution de Marine Liquifry =  $50/28 = 1.786 \mu\text{g B[a]P/mg Marine Liquifry}$

Cette dose a été choisie de façon à être du même ordre de grandeur :

- que la plus forte concentration moyenne en HAP totaux mesurée dans la moule entière par le Réseau National d'Observation (54.4 mg HAP totaux/kg poids sec de moule, site de Nice-La Reserve) (RNO, 1995).
- que les doses en B[a]P ayant respectivement induit chez la truite arc-en-ciel la formation d'adduits du B[a]P à l'ADN (Potter et al., 1994).

La dose d'exposition choisie pour cette expérimentation reste théorique. En effet, contrairement à une contamination par gavage ou par injection intrapéritonéale, la dose réelle d'exposition des moules au B[a]P dépendra :

- 1) de la quantité de nourriture ingérée
- 2) de l'absorption de B[a]P éventuellement présent dans la fraction dissoute de l'eau de mer : une désorption du B[a]P de la nourriture jusque dans l'eau ne peut être en effet exclue.

Pour notre modèle d'exposition, l'évaluation du flux de notre vecteur de contamination pourrait donc être donnée par le calcul de l'EA (efficacité d'absorption) de la solution de Marine Liquifry calculée précédemment. Néanmoins, l'activité de filtration des moules pouvant être altérée par la présence du B[a]P, la valeur de l'EA n'a pas été prise en compte ici pour l'estimation de la dose réelle d'exposition au B[a]P. Compte tenu de la durée de l'exposition, la dose théorique choisie est de toute façon d'un ordre de grandeur jugé suffisamment fort pour assurer un effet génotoxique du B[a]P.

## II. Matériel et méthode :

Cette partie ayant été détaillé de façon tout à fait explicite dans l'article 1 suivant, seul un schéma récapitulatif de la méthode d'extraction d'ADN utilisé est proposé Figure 24.

## III. Résultats :

Les résultats de ces investigations sont détaillés dans l'article 1 :

F. Akcha, T. Burgeot, P. Venier, J. F. Narbonne (1999). Relationship between kinetics of benzo[a]pyrene bioaccumulation and DNA binding in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62: 455-462.

### Résumé :

Des moules, *Mytilus galloprovincialis*, ont été exposées par la voie trophique à l'hydrocarbure aromatique modèle, le Benzo[a]pyrène (B[a]P). Un mélange de B[a]P/[H<sup>3</sup>]B[a]P a ainsi été incorporé dans la nourriture pour exposer les moules à une dose individuelle totale de l'ordre de 50 mg B[a]P/kg p. s. moule/jour. Au cours des 13 jours d'exposition, des échantillons ont été prélevés pour l'étude de la cinétique de bioaccumulation du B[a]P dans les différents tissus de moule (glande digestive, branchies, manteau). La cinétique de liaison du B[a]P à l'ADN a également été déterminée dans les branchies et dans la glande digestive.

Que ce soit dans la glande digestive, les branchies ou le manteau, une augmentation de la concentration en équivalent B[a]P avec le temps d'exposition a été observée. La glande digestive a été identifiée comme le tissu principal de la bioaccumulation du B[a]P chez la moule. En tenant compte de la distribution massique de chaque tissu, la concentration en B[a]P dans la moule entière, à la fin des 13 jours d'exposition, a été estimée à 58,5 mg/kg p. s. moule. A l'issue d'une période d'épuration de 7 jours, une diminution de la concentration en B[a]P dans la glande digestive (- 73%) et les branchies (- 32%) a été observée.

Pour les conditions d'exposition choisies, de la radioactivité associée au [H<sup>3</sup>]B[a]P a été mesurée dans l'ADN de branchies et de glande digestive. Dans chacun de ces deux tissus, une augmentation discontinue de la quantité de liaisons a été observée avec le temps d'exposition. Après 13 jours, les concentrations en pmoles d'équivalent B[a]P par mg d'ADN ont été respectivement de 281,91 ± 110,62 et de 15,64 ± 6,72 dans la glande digestive et les branchies.

Les résultats obtenus montrent que le modèle d'exposition proposé est adapté à l'étude des effets engendrés par l'exposition à des xénobiotiques organiques. Le B[a]P incorporé dans la

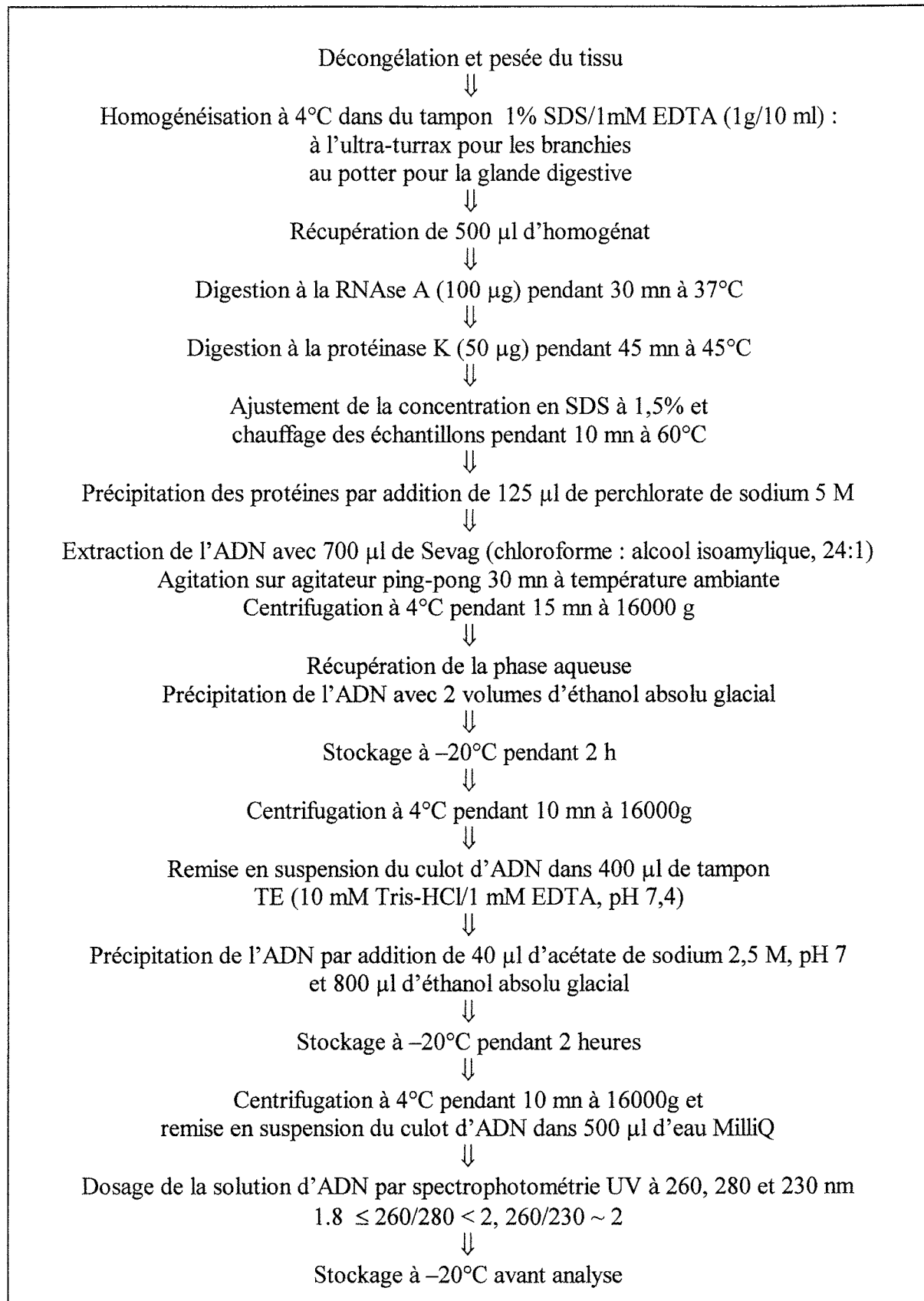


Figure 24 : Protocole d'extraction d'ADN de moule selon Venier et Canova, 1996.



nourriture est assimilé par la moule. Sa bioaccumulation et sa biotransformation provoque la formation de liaisons covalentes entre les métabolites du B[a]P et l'ADN. Ce modèle peut donc être utilisé pour l'étude de la formation d'adduits du B[a]P à l'ADN de moule.

**Article numéro 1 :**

**F. Akcha, T. Burgeot, P. Venier, J-F. Narbonne (1999). Relationship between kinetics of benzo[a]pyrene bioaccumulation and DNA binding in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62 : 455-462.**

# Relationship Between Kinetics of Benzo[a]pyrene Bioaccumulation and DNA Binding in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*

F. Akcha,<sup>1</sup> T. Burgeot,<sup>2</sup> P. Venier,<sup>3</sup> J. F. Narbonne<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Physico and Toxicochimistry of Natural Systems, UPRESA 5472 CNRS, University of Bordeaux I, Avenue des Facultés, 33405 Talence, France

<sup>2</sup> IFREMER, Laboratory of Chemical Pollutants, Rue de l'Île d'Yeu, 44300 Nantes Cedex, France

<sup>3</sup> University of Padova, Department of Biology, via Bassi 58/B, Padova, Italy

Received: 5 August 1998/Accepted: 16 February 1999

Presence of persistent contaminants in the marine environment is of great concern as some of them have been identified as genotoxic or carcinogenic to several biological systems. In the aim to monitor pollution levels and impacts on marine flora and fauna, large biomonitoring programs have been developed leading to important multidisciplinary *in situ* studies. A large number of enzymatic biomarkers of pollutant exposure have been developed and integrated in field studies. Specific biomarkers of genotoxicity have also been assessed as 'early warning' of pollution effects (Burgeot et al. 1996). Due to their bio-ecological particularities and caging possibility, mussels are widely used in biomonitoring. They are the key sentinel organisms of the American Mussel Watch Program and French biomonitoring network, RNO (Réseau National d'Observation).

Among the genotoxicity biomarkers, DNA adducts have been widely studied for the last decade as their formation is thought to be a crucial event in chemical carcinogenesis initiation. In marine environment biomonitoring, several studies have been conducted in benthic fishes using the <sup>32</sup>P-postlabeling technique. *In situ* dose-response relationships have been demonstrated between total Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAHs) concentration in sediment and hepatic DNA adduct levels (French et al. 1996). Because DNA adduct levels have been shown to be correlated with the prevalence of hepatic neoplasms and related lesions (Stein et al. 1994), they can be used as early markers of chemical carcinogenesis and hence for cancer risk assessment. These observations demonstrate the potential use of DNA adducts as a biomarker of both PAH exposure and effects.

With the future aim to study the different pathways involved in PAH DNA adduct formation, a mesocosm model to assess pollutant exposure has been developed for the mussel, *Mytilus galloprovincialis*. As model PAH, Benzo[a]pyrene (B[a]P) contamination of mussels has already been noted via sediment and water column and DNA adduct formation has been demonstrated for the latter exposure scenario (Venier and Canova, 1996). Because contamination in bivalves occurs via their filter-feeding activity, uptake via food supply was chosen for this experiment. During a 13 day exposure period, kinetics of B[a]P bioaccumulation in mussel tissues (gills, digestive gland,

mantle) have been studied to assess the bioavailability of the pollutant for the exposed organisms. B[a]P DNA binding kinetics were also studied in both gills and digestive gland to check the ability of the dose applied to induce DNA damage. For the original way of exposure described, a concentration of environmental concern is reached in whole mussel, sufficient enough to target DNA. The results obtained validated the use of this model for further works on DNA adduct formation in mussels.

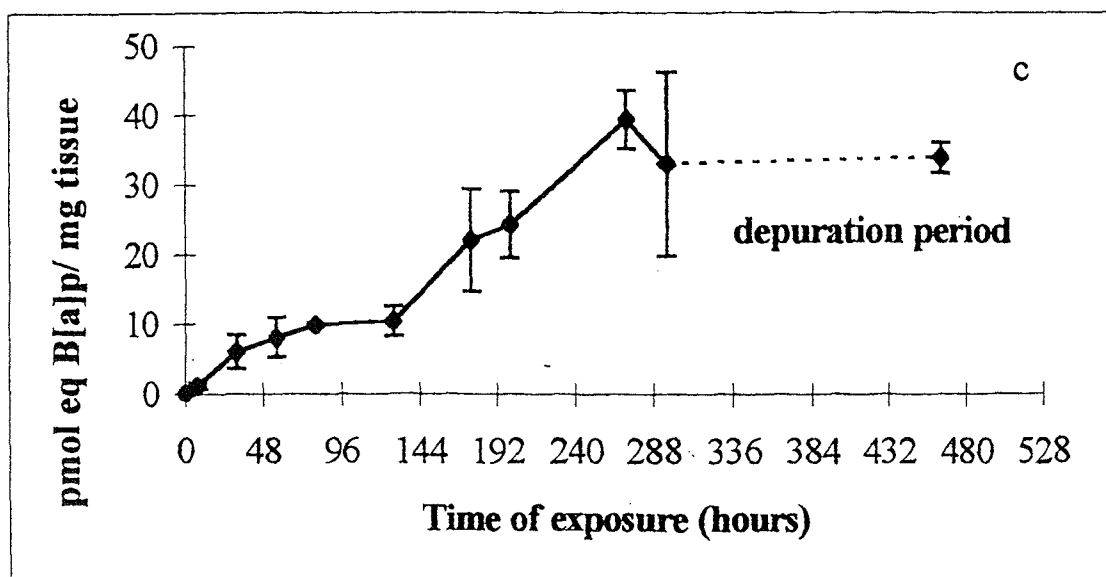
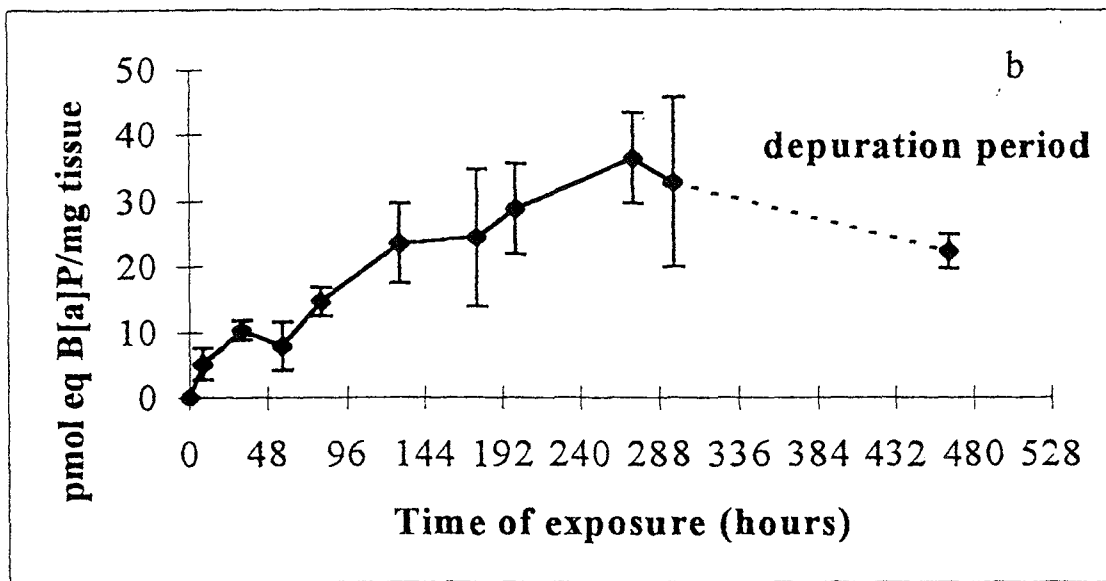
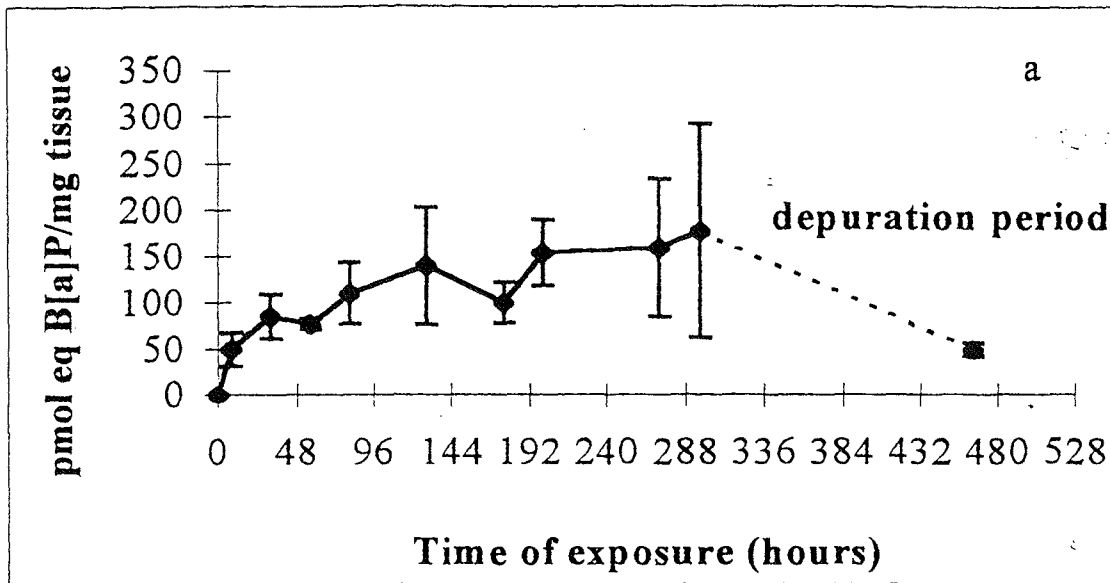
## MATERIALS AND METHODS

Specimens of mussels *Mytilus galloprovincialis* were bought (Viviers d'Aquitaine, La Teste) in Arcachon Bay (France). Originating from Rya de la Rosa (Gallice, Spain), they were kept in wet docks before being commercialized. In the laboratory, 150 animals were selected to build up a group of similar sized individuals and kept in 35 ‰ seawater filled glass aquariums. Water was pumped from the Bay of Arcachon. Its temperature was stabilized at room temperature (18°C) using an air conditioning system. Water was renewed every morning. The volume provided per individual (volume of water/ number of animals = 1L) was fixed during the time of the experiment: animals removed for testing were replaced in the aquarium. Oxygen was provided by the use of a continuous air-bubbler system. Animals were fed with Marine Liquify, a commercial solution for marine invertebrates prepared by INTERPET. The suitability of particle size for the mussel was checked by laser granulometry. Each animal received a daily amount of 28 mg equivalent d.wt of Marine Liquify. Feed was delivered over 8 hr into the aquariums by using a peristaltic pump. Every morning, feed was freshly contaminated with a mixture of B[a]P/ [<sup>3</sup>H]B[a]P (1364: 1) to reach a concentration of 1.786 µg B[a]P/ mg Marine Liquify. Hence, each individual was nominally exposed to a daily dose of 50 mg B[a]P/ kg d.wt. A 4 day acclimatization period was observed before the beginning of the experiment.

Experiment was conducted over 13 days and sampling occurred at 0, 8, 32, 56, 80, 128, 176, 200, 272 and 296 hr after the acclimatization period. It has been followed by a 7 day depuration period characterized by the same abiotic parameters, as previously described, but in total absence of B[a]P in feed. A sample was taken at the end of the depuration period to assess the ability of mussels to recover from B[a]P exposure. At each sampling time, 12 individuals were removed: 4 animals were used for the study of B[a]P concentration in mussel tissues (gills, digestive gland, mantle) and 4 other ones for the study of B[a]P DNA binding in both gills and digestive gland. The rest were used for the time-course study of the mean individual dry weight as an index of the physiological state of the organisms.

At each sampling time, the individual dry weight of 4 whole mussels was gravimetrically determined by weighing the samples before and after a 48 hour period at 60°C in a drying oven.

Determination of [<sup>3</sup>H]B[a]P concentration in each individual tissue was carried out by Liquid Scintillation Counting (LSC). Liver, gills and mantle of four individual



**Figure 1.** B[a]P bioaccumulation kinetics in (a) digestive gland (b) gills and (c) mantle of exposed mussel.

mussels were dissected out at each sampling time. After a brief rinse in acetone to remove adsorbed B[a]P, they were kept at -80 °C before analysis. After weighing, thawed tissue remained overnight in Lumasolve (LUMAC LSC, 5 mL/ g fresh tissue) under moderate agitation at 50°C. Aqualuma plus (LUMAC, LSC), was then added to a volume equivalent to 1 mg tissue (6 mL/ mL) for radioactivity counting. Radioactivity of the samples was recorded using a Searle Delta 300 Counter. Taking into account the dilution factor of [<sup>3</sup>H]B[a]P into B[a]P, results were expressed in pmol equivalent B[a]P per mg fresh tissue.

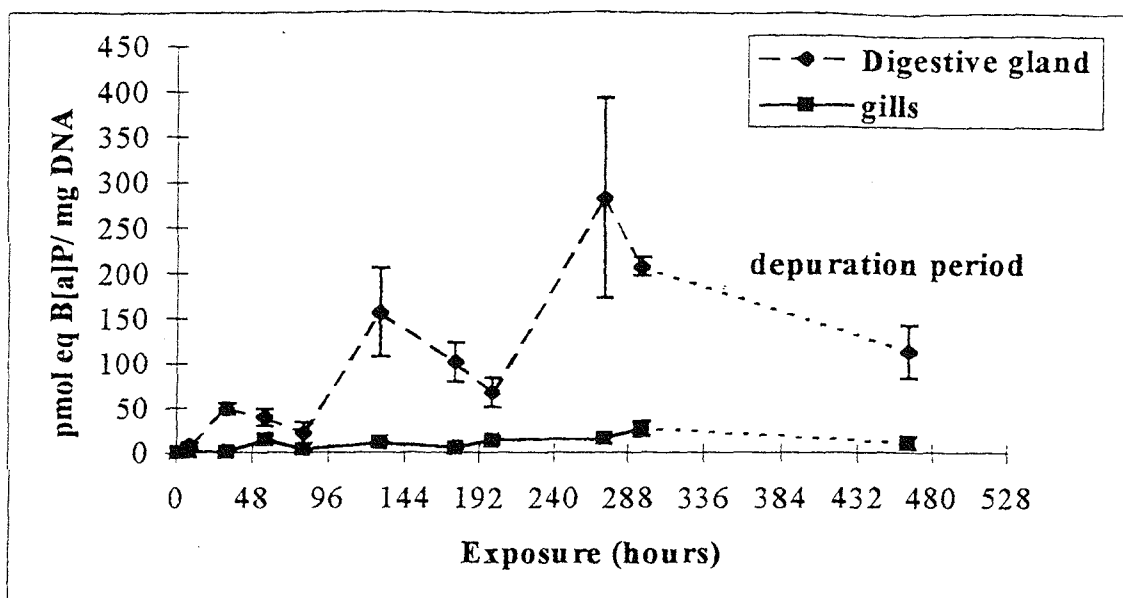
For DNA binding, the liver and the gills of 4 individual mussels were dissected out and briefly rinsed in acetone to remove adsorbed B[a]P. Samples were kept at - 80°C prior analysis. DNA of each individual tissue was isolated as described by Venier and Canova (1996). DNA titration was carried out by UV spectrophotometry at 260 and 280 nm. Radioactivity was recorded as previously described for tissue samples. Aqualuma Plus was added for each sample to a volume equivalent to 500 µg DNA. Results were expressed in pmol equivalent B[a]P/ mg DNA.

For the time-course study of both mean individual dry weight and DNA binding, raw data were analyzed by carrying out a one-way ANOVA ( $p = 0.05$ ) taking B[a]P exposure time as a factor (Statsoft, Inc. 1993). Variance homogeneity was previously checked by conducting the Hartley test.

## RESULTS AND DISCUSSION

No significant difference was observed in the mean individual dry weight of the exposed organisms as a function of exposure time. Animals did not lose weight during the time of the experiment, suggesting a relatively constant physiological condition of the test organisms over a short experimental period. This stability can be interpreted as a result of the filter feeding activity.

In either digestive gland, gills and mantle, the concentration of B[a]P increases with exposure time (Fig. 1). B[a]P bioaccumulation kinetics follow a linear mathematical model in both gills ( $y = 0.1344 x$ ,  $R = 0.826$ ,  $p < 0.001$ ) and mantle ( $y = 0.12310 x$ ,  $R = 0.915$ ,  $p < 0.001$ ), whereas in the digestive gland the concentration increases following a logarithmic model ( $y = -14.819 + 67.306 \cdot \log_{10}(x) + \epsilon$ ,  $R = 0.609$ ,  $p = 0.001$ ). The comparison of the values obtained before and after the depuration period shows a decrease of B[a]P concentration in both digestive gland and gills, by respectively 73 and 32%. However, the conduction of Student t tests on these values shows no significant decrease. Lack of statistical significance is explained by the high standard deviations of means obtained, reflecting inter-individual variability in B[a]P bioaccumulation. In the mantle, B[a]P concentration remains constant after depuration. Digestive gland, gills and mantle represent respectively, 14%, 24% and 20% of the mean individual wet weight (determined during the course of the experiment). Taking into account the weight distribution of each tissue type and the concentration of B[a]P recorded in each tissue, the estimated concentration in whole mussels reaches 58.5 mg B[a]P/ kg d.wt mussel (9.964 mg B[a]P/kg w. wt) at the end of



**Figure 2.** B[a]P DNA binding kinetics in mussel digestive gland and gills.

the 13 day of exposure. This concentration is similar to that recorded at the highly polluted site of Nice-La Reserve for total PAHs (54.4 mg/ kg d.wt mussel) by the RNO (Beliaeff et al. 1998).

These results suggest that for the conditions of exposure described, B[a]P is bioavailable for the organisms. The linear increase of B[a]P concentration with exposure time shows that in both gills and mantle, steady state is not reached at the end of the 13 days of exposure. In the digestive gland, the logarithmic increase of B[a]P concentration illustrates a different pattern of bioaccumulation. In this tissue, the logarithmic kinetics involve a fast absorption phase during the first 32 hours. For this period, the uptake rate in the digestive gland is of  $2.87 \text{ pmol B[a]P hr}^{-1}$  for only  $0.34$  and  $0.18 \text{ pmol hr}^{-1}$  for gills and mantle respectively. In digestive gland, a plateau is reached after a 100 hr period whereas saturation is not evident after 280 hr exposure in gills and mantle. Difference observed between tissues can be interpreted as a classical difference between contact tissue and compartments of distribution via the circulating system. In mussel, feed particles are filtrated through gills and dispatched up to the digestive gland haemolymph to be metabolized, explaining the high bioaccumulation in this tissue. In the other hand, enzymes involved in the biotransformation of both endogenous and exogenous substrates are mainly localized in the digestive gland in mussel (Livingstone and Pipe 1993). Benzo[a]pyrene is known to be metabolized to more water soluble products that can be excreted via conjugates formation. The balance between these two opposite processes explains the non linear increase of B[a]P concentration in the digestive gland.

The decrease of B[a]P concentration after the 7 day depuration period illustrates the ability of digestive gland to recover from B[a]P exposure via its biotransformation and excretion. The weak release of stored metabolites observed during depuration in the mantle may be linked with the low level of biotransformation process in this tissue. It seems to be due also to its rich lipid

content, responsible of its role as a storage compartment in the mussel. As previously reported by Suteau et al. (1988), the digestive gland appears as the main tissue of benzo[a]pyrene bioaccumulation.

Results obtained for the digestive gland and the gill DNA are presented in Fig. 2. For the digestive gland and the gills, [<sup>3</sup>H]B[a]P associated radioactivity was recorded in DNA. DNA binding time-course was analyzed using a one way ANOVA. Data were log transformed to obtain homogenized variances. Binding of B[a]P metabolites increases with time in a jagged pathway in both the digestive gland ( $F = 31.881$ ,  $\sqrt{df} = 9/18$ ,  $p < 0.001$ ) and the gills ( $F = 20.995$ ,  $\sqrt{df} = 9/19$ ,  $p < 0.001$ ) DNA. Binding in the digestive gland is up to 10 times higher than in the gills. Conduction of Student t tests, show that the amount of bound metabolites decrease in both tissues during depuration. The calculation of a binding index (pmol bound/ mg DNA)/ (Dose,  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) as previously proposed by James et al. (1995) gives values for digestive gland and gills of, respectively, 1.04 and 0.13.

These results suggest that B[a]P incorporated into the food supply has been absorbed, bioaccumulated and biotransformed in mussel. Its biotransformation in digestive gland and gills has led to the production of electrophilic metabolites that covalently bind to DNA. As recorded in Table 1, mussel tissues present a different balance between phase I and phase II biotransformation activities. Phase I activities and particularly those related to the MFO system are greater in the digestive gland. Benzo[a]pyrene Hydroxylase (BPH) activity only has been

**Table 1.** Phase I and Phase II enzymatic activities in mussel tissues. <sup>1</sup>DG: digestive gland, G: gills, M: mantle, <sup>2</sup>M: microsomes, C: cytosol, S: S9 supernatant, <sup>3</sup>fs: field study, ms: mesocosm study, <sup>4</sup>: Glutathion-S-Transferase.

Enzy. Activities	Tissue	Values recorded	References
<b>NADPH</b>	DG <sup>1</sup> / M <sup>2</sup>	7.6	Stegeman (1985), fs <sup>3</sup>
<b>cyt c reductase</b>	G/ M	3.2	Stegeman (1985), fs
nmol/ min/ mg prot	M/ M	2.6	Stegeman (1985), fs
	DG/ M	21.8 ± 19	Suteau and Narbonne (1988), fs
<b>BPH</b>	DG/ M	0.9 ± 0.6	Nasci et al. (1989), fs
UF/ min/ mg prot			
<b>B[a]P metabolism</b>	DG/ M	0.035	Stegeman (1985), fs
nmol/ min/ mg prot	G/ M	0.013	Stegeman (1985), fs
	M/ M	ND	Stegeman (1985), fs
<b>GST<sup>4</sup></b>	G/ C	55.9- 82.3	Solé et al. (1996), fs
nmol/ min/ mg prot	DG/ M	8.5- 25	Solé et al. (1996), fs
	DG/ C	65 ± 15	Unpublished results, ms



recorded in this tissue until now. As a result, B[a]P biotransformation is much more efficient in the digestive gland than in the other tissues. The digestive gland in this experiment, is the tissue presenting the highest B[a]P concentration and known phase I activities (Table 1), it is hence not surprising to record in this tissue the highest DNA binding values. It is also important to underline that phase I activities have been reported to be induced by aromatic compounds, demonstrating the existence of adaptive mechanisms in polluted environment. The discontinuous increase of DNA binding with time, notably in the digestive gland (jagged pattern) may reflect the existence of an opposite process. A decrease observed after depuration support this hypothesis. In vertebrates, DNA repair mechanisms have already been demonstrated. In mollusks, no similar mechanism has been clearly identified.

If we consider that all the B[a]P taken up via feeding per individual was available, 6.9 % of the total dose applied is recovered in whole mussel. B[a]P transfer from tissue to DNA is low, less than 0.1% (Table 2.).

**Table 2.** Tissue distribution and DNA transfer of recovered B[a]P<sup>1</sup> in relation to the concentration of the corresponding tissue, ND: undetermined.

	Digestive gland	Gills	Mantle	Rest
Tissue distribution (%)	57	20	16	7
% of DNA binding <sup>1</sup>	0.1	0.08	ND	ND

These results show that the mesocosm system developed is suitable for the study of DNA adduct formation in mussel. B[a]P in feed is bioavailable for the organisms: for the dose applied, its accumulation and biotransformation in mussel result in DNA binding of B[a]P metabolites. Because B[a]P bioaccumulation and DNA binding vary from one tissue to another due to differences in uptake and biotransformation abilities, DNA adduct formation is expected to occur to different extents among various tissues. Data obtained during depuration demonstrate the ability of mussel to recover from B[a]P exposure in term of internal tissue dose and DNA damage.

DNA adduct formation is the resulting integration of both absorption, metabolism and detoxification processes. In mussel, persistence of genotoxin-DNA adducts has been recently demonstrated in *Mytilus edulis* (Harvey and Parry, 1998) pointed out the limited capacity of the DNA repair mechanisms in mussel. Because mussels are chronically exposed to pollutants in the marine environment, DNA adduct measurement appears so of considerable promise as a cumulative index of current and past exposure to genotoxin compounds. Further work based on this mesocosm will be carried out to improve the knowledge on stable and depurinating adduct formation in this sentinel organism.

*Acknowledgments.* This work is part of a doctoral dissertation supported by the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) and by the European research program BIOMAR (ENV5-CT96-0300).

- Beliaëff B, O'Connor TP, Claisse D (1998) Comparison of chemical concentrations in mussels and oysters from the United States and France. *Environ Monitor Ass* 49: 87-95
- Burgeot T, Bocquéné G, Porte C, Dimeet J, Santella RM, Garcia de la Parra LM, Pfohl-Leszkowicz A, Raoux C, Galgani F (1996) Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 131: 125-141
- French BL, Reichert WL, Hom T, Nishimoto M, Sanborn HR, Stein JE (1996) Accumulation and dose-response of hepatic DNA adducts in English sole (*Pleuronectes vetulus*) exposed to a gradient of contaminated sediments. *Aquat Toxicol* 36: 1-16
- Harvey JS, Parry JM (1998) The analysis of DNA adduct formation, removal and persistence in the common mussel *Mytilus edulis* exposed to 4-nitroquinoline 1-oxide. *Mutat Res* 399: 31-42
- James MO, Altman AH, Li C-LJ, Schell JD (1995) Biotransformation, hepatopancreas DNA binding and pharmacokinetics of benzo(a)pyrene after oral and parenteral administration to the American lobster, *Homarus americanus*. *Chem Biol Interact* 141-160
- Livingstone DR, Pipe RK (1992) Mussels and environmental contaminants: Molecular and cellular aspects. In: Grosling E. (ed), *The mussel, Mytilus edulis: Ecology, Physiology, Genetics and culture*. Elsevier, Amsterdam, ch 9 pp 425-464
- Nasci C, Campesan G, Fossato VU, Dolci F, Menetto A (1989) Hydrocarbon content and microsomal BPH and reductase activity in mussel, *Mytilus sp.*, from the Venice Area, North-East Italy. *Mar Environ Res* 28: 109-112
- Solé M, Porte C, Biosca X, Mitchelmore CL, Chipman JK, Livingstone DR, Albaigés (1996) Effects of the 'Aegean Sea' oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the Mussel (*Mytilus edulis* L.). *Comp Biochem Physiol* 113 C, 2:257-265
- Stegeman JJ (1985) Benzo(a)pyrene oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel (*Mytilus edulis*) and other bivalve mollusk species from the western north Atlantic. *Mar Biol* 89: 21-30
- Stein JE, Reichert WL, Varanasi U (1994) Molecular epizootiology: Assessment of exposure to genotoxic compounds in teleosts. *Gen Mol Ecotoxicol* 19-23
- Suteau PM, Narbonne JF (1988) Preliminary data on PAH metabolism in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* from Arcachon Bay, France. *Mar Biol* 98: 421-425
- Venier P, Canova S (1996) Formation of DNA adducts in the gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* treated with benzo(a)pyrene. *Aquat Toxicol* 34: 119-133

## **CHAPITRE 2**

**Mesure des adduits du B[a]P à l'ADN de glande digestive de moule par la technique de post-marquage au  $^{32}\text{P}$ .**



## I. Objectifs :

Pour les conditions d'exposition choisies, l'assimilation du B[a]P par la moule laisse supposer la formation à l'ADN de liaisons stables du B[a]P. Une nouvelle expérience a donc été réalisée dans le but de mesurer quantitativement et qualitativement les adduits à l'ADN par la technique de post-marquage au <sup>32</sup>P. Cette technique, très sensible, est la méthode actuelle de référence pour la mesure des adduits à l'ADN chez les vertébrés, poissons marins y compris (JAMP, 1998). Selon notre modèle, des moules ont donc été exposées pendant 21 jours à la même dose de B[a]P.

Dans le cadre de notre approche mécanistique, certains paramètres biochimiques impliqués dans le métabolisme et l'activation du B[a]P ont également été mesurés chez ces animaux. Il en a été aussi le cas pour d'autres marqueurs d'exposition non spécifiques du métabolisme des HAP.

Compte tenu de l'étendu des analyses à effectuer, cette expérience avait pour but l'exposition d'un très grand nombre d'individus. Sa réalisation a donc nécessité un changement d'échelle de notre modèle et ainsi la mise à disposition de certains moyens de la station marine d'Arcachon : bassins et prise d'eau de mer directe. L'application de la technique de post-marquage au <sup>32</sup>P sur ces échantillons a été réalisée en collaboration avec le laboratoire du Docteur Paola Venier (Université de Padoue, Italie) au cours de deux séjours d'une durée totale de 5 semaines.

## II. Matériel et méthode :

L'ensemble des techniques utilisées ayant été décrit dans l'article 2, cette partie sera consacrée uniquement à des compléments d'information.

### *Origine des animaux :*

Cette expérimentation avait été initialement commencée avec des moules de Gallice. Malheureusement, la découverte en cours d'échantillonnage d'un parasite, *Mytilicola intestinalis* (Figure 25), présents en très grande quantité dans la glande digestive, a entraîné l'interruption immédiate de l'expérimentation. Ce parasite est en effet responsable d'une perforation de l'appareil digestif susceptible d'affaiblir les capacités métaboliques de la moule. L'expérience a donc été reconduite avec un groupe de moules sain, originaire du Bassin de Thau. Sur la base du dosage de 6 HAP (Fluoranthène, Benzo[b]fluoranthène, Benzo[k]fluoranthène, Benzo[a]pyrène, Benzo[g]pyrène, Indéno[1,2,3-cd]pyrène), le niveau de contamination initiale en HAP totaux des moules de ce site est de 16,4-24,1 mg/kg p. s. moule (RNO, 1995).

### *Echantillonnage :*

Au cours de cette expérimentation des tissus de branchies ont également été prélevés pour l'étude des adduits à l'ADN dont les résultats sont présentés chapitre 3.

### *Protocoles de mesures des différentes activités enzymatiques :*

Pour chaque activité enzymatique mesurée, un schéma récapitulatif est proposé (Figures 26 à 32).

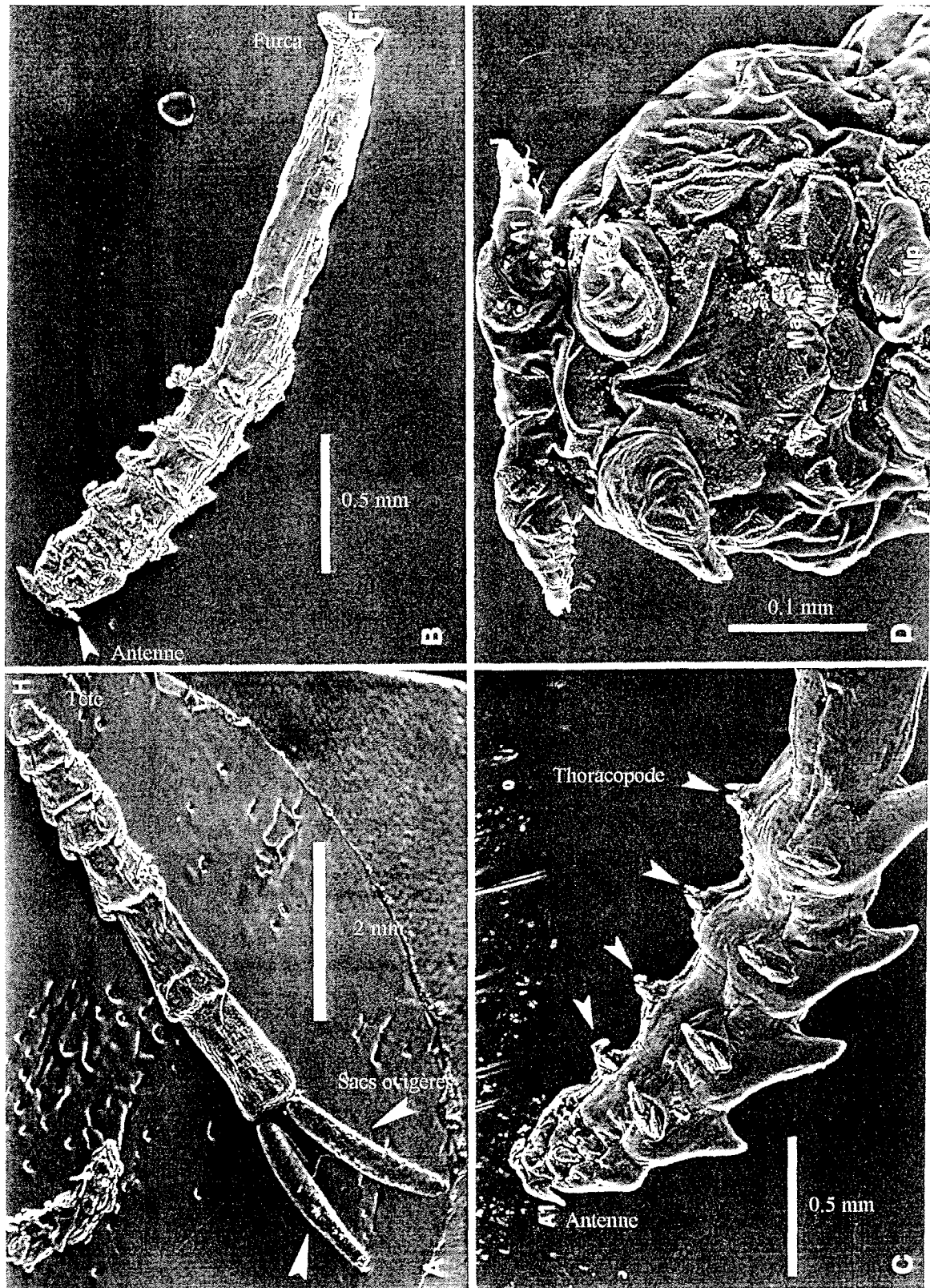


Figure 25 : Observation au microscope électronique du copépode *Mytilicola intestinalis* (Canestri-Trotti et al, 1998). (A) : vue dorsale d'une femelle ovigère, (B) : vue ventrale d'un mâle, (C) : vue ventrale de la partie antérieure d'un corps femelle, (D) : vue ventrale de la tête d'un mâle, A1, A2 : antennes 1 et 2, Ma1, Ma2 : maxillaires 1 et 2, Mp : maxillipède.

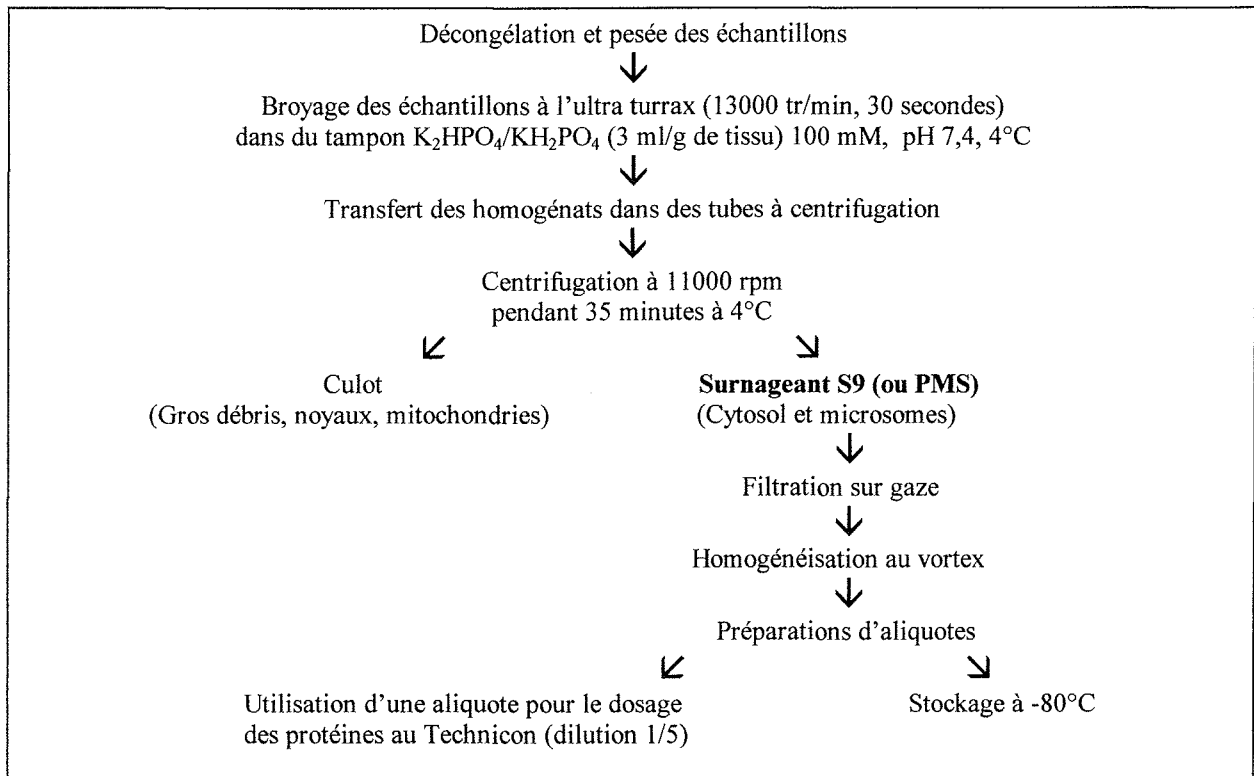


Figure 26 : Préparation de la fraction subcellulaire S9 de branchies de moule

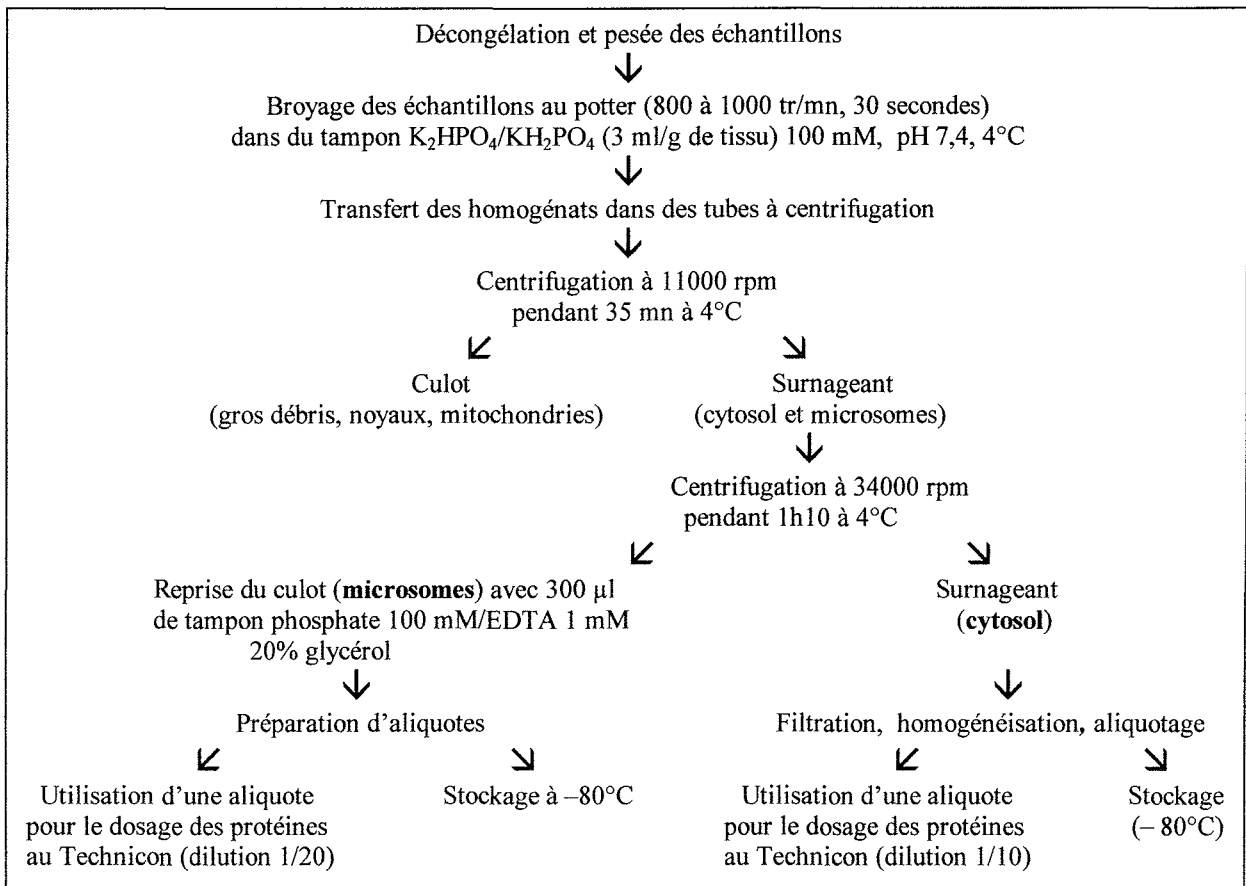


Figure 27 : Préparations des différentes fractions subcellulaires de glande digestive de moule

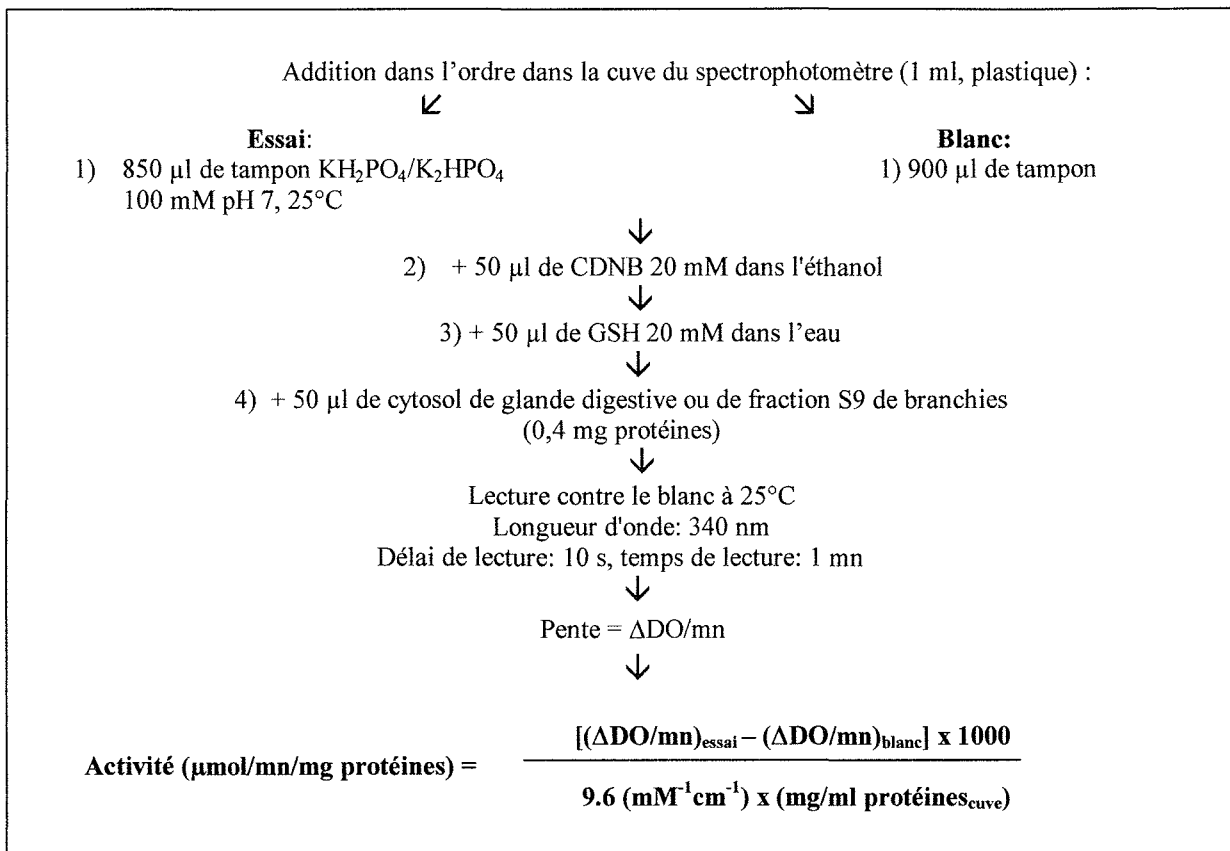


Figure 28 : Dosage colorimétrique de l'activité Glutathion-S-transférase (GST) soluble (d'après la méthode de Habig et al ,1974). Principe : L'incubation de la GST présente dans la fraction subcellulaire de moule avec un mélange de Glutathion (GSH) et de 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) conduit à la formation d'un complexe GST-CDNB coloré, dosable par colorimétrie.

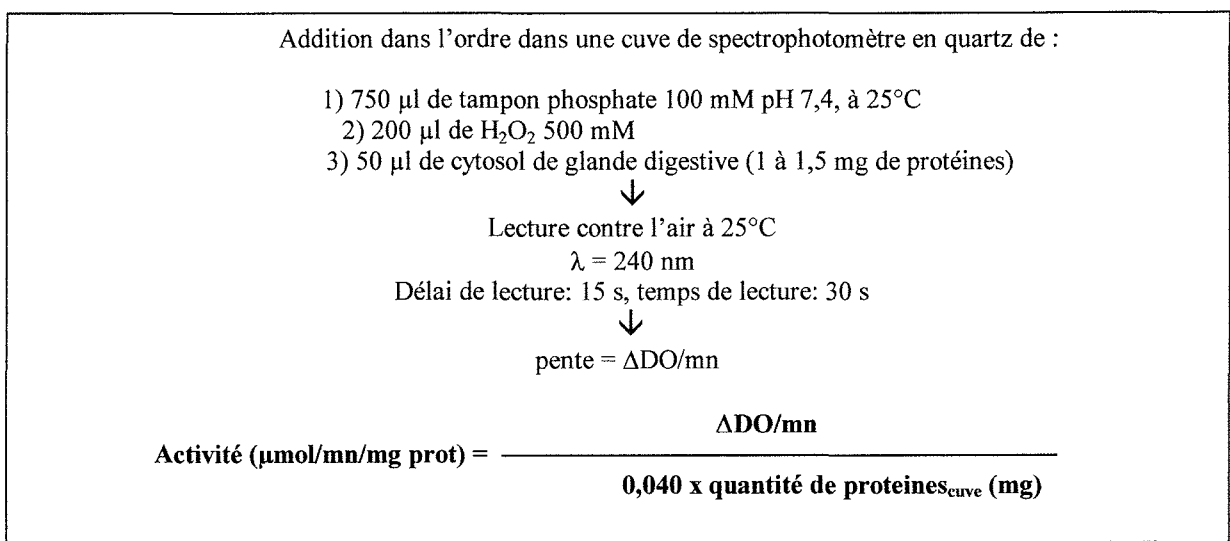


Figure 29 : Dosage de l'activité Catalase dans la glande digestive de moule (d'après Claiborne, 1985). Principe : selon la réaction catalysée par la Catalase contenue dans la fraction cytosolique de la glande digestive (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → 2 H<sub>2</sub>O + O<sub>2</sub>), on suit la disparition de l'eau oxygénée avec le temps d'incubation



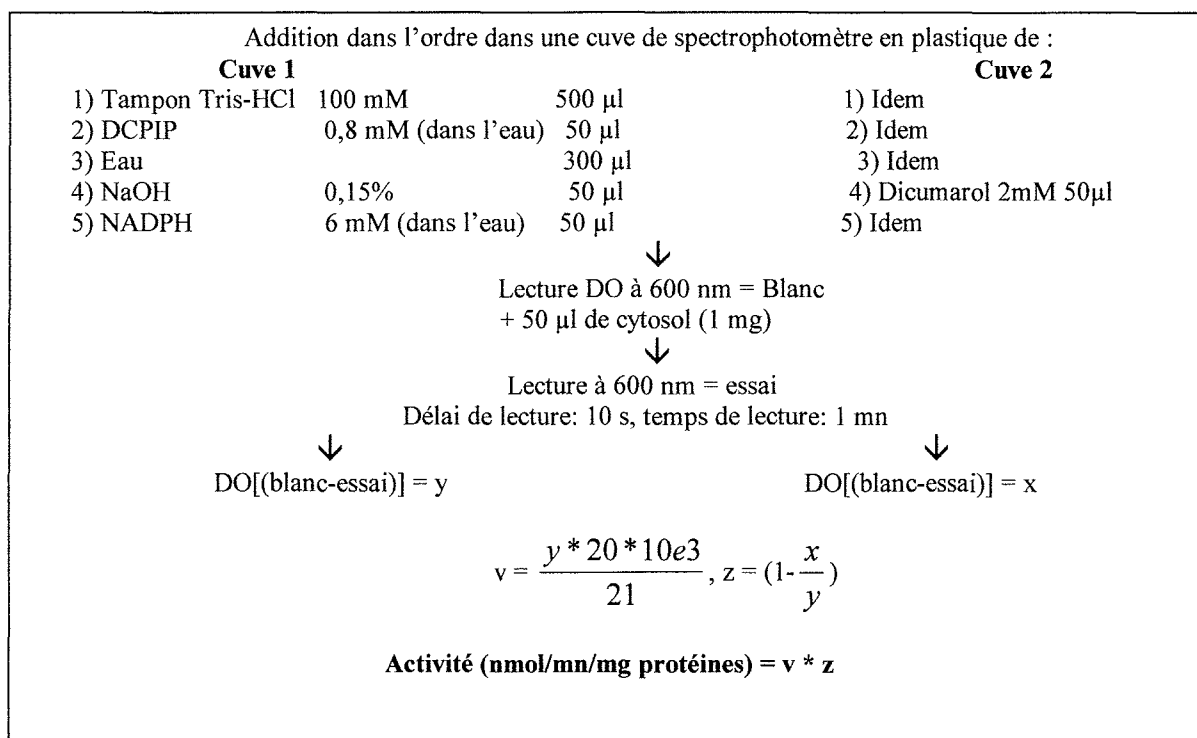


Figure 30 : Dosage de l'activité DT- diaphorase dans la glande digestive de moule (d'après Benson et al., 1980). Principe : Cette enzyme catalyse la réduction à 2 électrons du dichlorophénolindophénol (DCPIP) selon la réaction, NAD(P)H + DCPIP → NAD(P)<sup>+</sup> + DCPIP red. Inhibée par le dicoumarol, cette activité est mesurée comme étant la part d'activité DCPIP reductase inhibée par le dicoumarol.

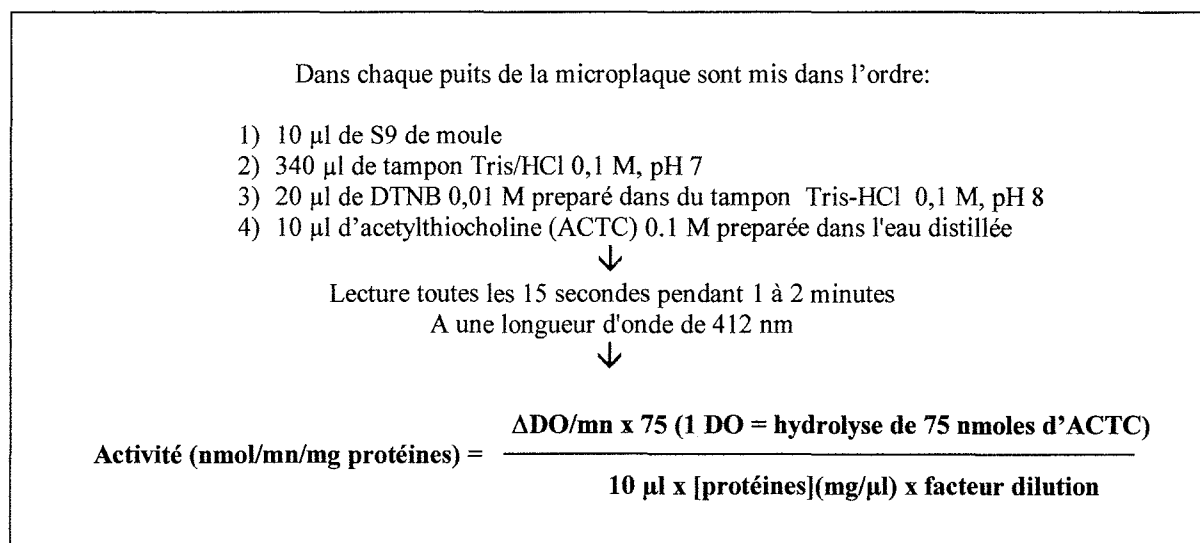


Figure 31 : Dosage de l'activité acétylthiocholine estérase (d'après Galgani et Bocquéne, 1988). Principe : l'acetylthiocholine estérase présente dans la fraction S9 de branchie permet l'hydrolyse de l'acetylthiocholine en thiocholine. Ce dernier composé réagit avec le DTNB (5,5', dithiobis-2-nitrobenzoïque acide) pour produire le TNB (5,5', thiobis-2-nitrobenzoïque acide) dont la coloration jaune permet le dosage par colorimétrie.

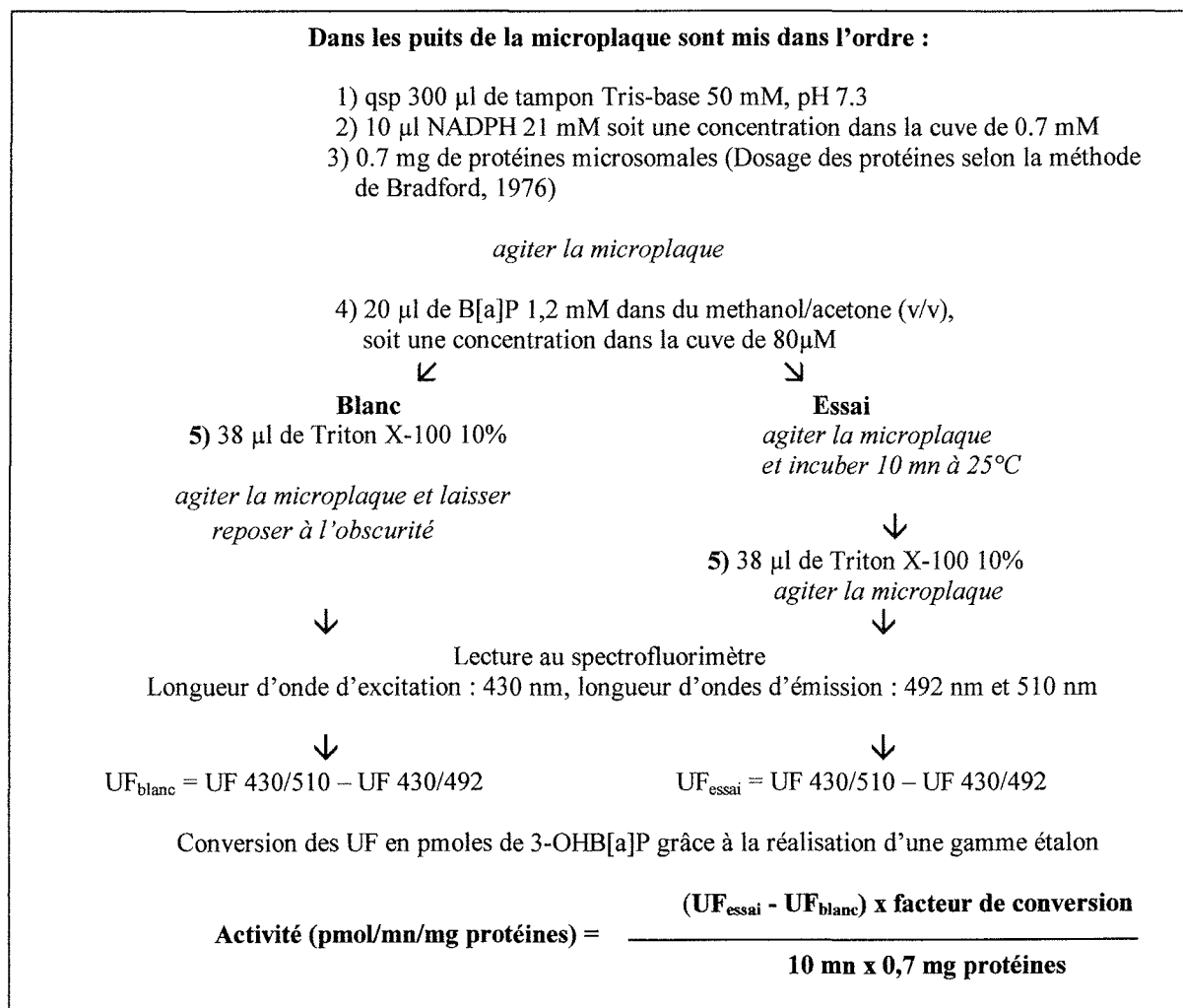


Figure 32 : Dosage de l'activité Benzo[a]pyrène hydroxylase (adapté par Burgeot d'après Michel et al, 1993). Principe : Le B[a]P est métabolisé par les microsomes de moule en différents métabolites dont le 3-OHB[a]P. La formation de celui-ci peut-être dosée par fluorimétrie par différence de fluorescence entre les longueurs d'ondes d'émission, 492 et 510 nm, pour une même longueur d'onde d'excitation à 430 nm.

### III. Résultats

Les résultats obtenus au cours de cette expérimentation sont présentés dans l'article 2 suivant :

**F. Akcha, C. Izuel, P. Venier, H. Budzinski, T. Burgeot, J-F. Narbonne. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in B[a]P-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* (sous presse).**

#### Résumé :

Le but de cette étude était 1) d'améliorer les connaissances sur les voies d'activation métabolique du B[a]P chez la moule et 2) d'étudier les relations entre le niveau d'adduits à l'ADN et l'activité de certains biomarqueurs enzymatiques. Un modèle d'exposition aux

polluants par la voie trophique a été développé pour l'organisme 'sentinelle', *Mytilus galloprovincialis*. Des moules ont ainsi été nourries pendant 4 semaines avec de la nourriture contaminée au B[a]P (50 mg/kg poids sec moule). La bioaccumulation de ce polluant a été déterminée par l'analyse par CG/SM de la concentration en B[a]P dans la moule entière. Différents biomarqueurs d'exposition ont été également mesurés pour l'estimation de l'état métabolique des animaux ainsi exposés. Le dosage immunochimique des protéines CYP1A-« like » et la mesure de l'activité Benzo[a]pyrène hydroxylase (BPH) ont été réalisés en tant qu'indicateurs des activités de biotransformation de phase I. L'activité Glutathion-S-transférase (GST) a été mesurée comme indicatrice des activités de conjugaison. Les activités Catalase (CAT) et DT-diaphorase (DTD) ont été étudiées en raison de leur proposition comme biomarqueurs potentiels du stress oxydatif, alors que l'activité Acéthylthiocholine estérase (AChE) a été mesurée comme un indicateur de la neurotoxicité possible du B[a]P. Le niveau d'adduits à l'ADN a été déterminé dans la glande digestive par l'application de la technique de post-marquage au <sup>32</sup>P avec enrichissement à la nucléase P1.

Pour les conditions d'exposition choisies, la concentration en B[a]P atteinte dans la moule entière fut très élevée (> 500 mg/kg p. s. moule) et des changements significatifs ont été mesurés pour chacun des biomarqueurs enzymatiques. Les activités BPH et CAT ont significativement augmenté avec l'exposition au B[a]P, alors que l'activité GST des branchies, la DTD et l'ACTC ont significativement diminué. A l'opposé, aucun changement n'a été observé dans la teneur en protéines CYP1A-« like ». Par la technique de post-marquage au <sup>32</sup>P, l'induction et l'augmentation avec le temps d'adduits à l'ADN a été démontrée dans la glande digestive malgré des niveaux assez faibles ( $0,269 \pm 0,082$  adduit/ $10^8$  dNps au maximum). Le niveau d'adduit à l'ADN ainsi que l'activité de tous les biomarqueurs enzymatiques mesurés, à l'exception faite de l'activité GST des branchies et de la glande digestive, ont montré une corrélation significative avec la concentration en B[a]P de la moule entière. Les activités BPH, CAT et ACTC ont également montré une forte corrélation avec le niveau d'adduits à l'ADN.

Ces résultats montre la neurotoxicité et la génotoxicité de l'exposition au B[a]P chez la moule. L'induction d'adduits à l'ADN démontre l'existence de voies d'activation déjà identifiées chez les vertébrés. Elle valide également l'utilisation de notre modèle d'exposition pour des études complémentaires sur le métabolisme du B[a]P chez la moule. Nos résultats confirment la proposition des activités BPH, CAT, DTD et AChE comme biomarqueurs d'exposition aux HAP pour cette espèce sentinelle.

**Article numéro 2 :**

**F. Akcha, C. Izuel, P. Venier, H. Budzinski, T. Burgeot, J-F. Narbonne (1999). Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in B[a]P-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* (sous presse).**

**Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in B[a]P-contaminated mussels, Mytilus galloprovincialis.**

F. Akcha<sup>1</sup>, C. Izuel<sup>1</sup>, P. Venier<sup>2</sup>, H. Budzinski<sup>1</sup>, T. Burgeot<sup>3</sup>, J-F. Narbonne<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratory of Physico and Toxicochemistry of natural systems, UPRESA 5472 CNRS, University of Bordeaux I, Avenue des Facultés, 33 405 Talence, France. Tel: + 33.556842456, Fax: +33.556848719, e-mail: fakcha@lptc.u-bordeaux.fr, h.budzinski@lptc.u-bordeaux.fr, jf.narbonne@lptc.u-bordeaux.fr.

<sup>2</sup>University of Padova, Department of Biology, Via Bassi 58/B, I-35131 Padova, Italy. Tel: +39.0498276284, Fax: +39.0498276280, e-mail: venier@civ.bio.unipd.it.

<sup>3</sup>IFREMER, Laboratory of Chemical Pollutants, Rue de l'Île d'Yeu, 44 300 Nantes Cedex, France. Tel: +33.240374051, Fax: +33.240374075, e-mail: Thierry.Burgeot@ifremer.fr.

## Abstract

The aim of this study was to improve the knowledge on the metabolic pathways involved in B[a]P activation and on the relationship between adduct levels and enzymatic biomarker activities. With this purpose, a model to assess pollutant exposure via food supply has been developed for the sentinel organism, *Mytilus galloprovincialis*. Mussels were fed during 4 weeks with B[a]P-contaminated feed (50 mg/kg dry weight mussel). Bioaccumulation was studied by determination of B[a]P concentration in whole mussel by GC/MS analysis. Different biomarkers of pollutant exposure were measured to assess the metabolic state of the exposed organisms. CYP1A-like immunopositive protein titration and Benzo[a]pyrene hydroxylase (BPH) activity were assessed as indicators of phase I biotransformation. Glutathione-S-Transferase (GST) activity was measured as an indicator of the conjugation activities. Catalase (CAT) and DT-diaphorase (DTD) activities were assessed as potential biomarkers of oxidative stress, whereas Acetylthiocholine esterase (AChE) activity was measured as an indication of possible neurotoxicity of B[a]P exposure. DNA adduct levels were determined in digestive gland DNA by applying the <sup>32</sup>P-postlabeling technique with nuclease P1 enhancement.

For the developed conditions of exposure, B[a]P concentration reached in whole mussel tissues was very high (> 500 mg/kg d.w. mussel) and significant B[a]P-induced changes were recorded for each enzymatic biomarkers. BPH and CAT activities were significantly increased by B[a]P exposure, whereas GST in the gills, DTD and AChE were significantly depressed. On the other hand, no change in CYP1A-like immunopositive protein content was observed. Induction and increase with time of bulky B[a]P-related DNA adducts were demonstrated in the digestive gland, although at low levels ( $0.269 \pm 0.082$  RAL at maximum) by the <sup>32</sup>P-postlabeling assay. DNA adduct level was significantly correlated with whole mussel tissue B[a]P concentration, so were all the enzymatic biomarkers measured except to GST activity in both gill and digestive gland tissues. BPH, DTD, CAT and AChE displayed a strong correlation with adduct levels.

These results demonstrate the neurotoxicity and the genotoxicity of B[a]P exposure in the mussel. The induction of bulky DNA adducts in mussels demonstrates the existence of activation pathways already identified in vertebrates. It validates also the suitability of this model for further studies on B[a]P metabolism in mussels. Our results support the proposal of BPH, CAT, DTD and AChE activities as suitable biomarkers of PAH exposure for these sentinel species.

Corresponding author: F. Akcha.

Abbreviations: PAHs, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; PCBs, Polychlorobiphenyls, B[a]P, benzo[a]pyrene; BPDE, Benzo[a]pyrene diol-epoxide; BPH, Benzo[a]pyrene Hydroxylase; CYP, Cytochrome P450; CAT, Catalase; DTD, DT-diaphorase; GST, Glutathione-S-Transferase; AChE, Acetylthiocholine esterase, ROS, Reactive oxygen species.

Keywords: Benzo[a]pyrene, DNA adducts, biotransformation, enzymatic biomarkers, Mytilus galloprovincialis.

## 1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the environment are known or suspect procarcinogens that require metabolic activation to exert their genotoxicity (Shaw and Connell, 1994). Some of the metabolites produced are highly reactive to intracellular nucleophiles like DNA, leading to covalent binding and DNA adduct formation. Among the biomarkers related to genetic damage, DNA adducts have been proposed as early markers of chemical carcinogenesis and hence for cancer risk assessment in mammals (La and Swenberg, 1996). Several studies have been conducted on the model compound, benzo[a]pyrene (B[a]P), to ascertain its activation in vertebrates and different pathways have been identified as involved in DNA adduct formation. The diol-epoxide and the radical cation pathways are well recognized in causing DNA damage. In the diol-epoxide pathway (Sims et al., 1974, Sims, 1981, Conney, 1982) B[a]P trans-dihydrodiols lead, via a P450 catalyzed two-electron oxidation, to the formation of a major stable adduct, BPDE-10 N<sup>2</sup>dG (Devanesan et al., 1992, RamaKrishna et al., 1992) and to a lesser extent to the formation of the depurinating adducts, BPDE-10 N<sup>7</sup>Gua and BPDE-10 N<sup>7</sup>Ade (Devanesan et al., 1996). An alternative pathway is proposed for trans-dihydrodiols that can be oxidized by dihydrodiol dehydrogenase to catechol, leading by autoxydation to B[a]P orthoquinones and excessive cycle redox production of reactive oxygen species (ROS) (Flowers et al., 1996, Penning, 1993). B[a]P can also lead to depurinating DNA adduct formation via a one-electron oxidation (Cavalieri et al., 1988, Cavalieri and Rogan, 1995, Stack et al., 1995) shown to be mediated by P450 (Cavalieri et al., 1990). It has been demonstrated in vitro in rat liver microsomes (Devanesan et al., 1992) and in vivo in mouse skin (Rogan et al., 1993) that the depurinating adducts produced, B[a]P-6-N<sup>7</sup>Gua, B[a]P-6-N<sup>7</sup>Ade and B[a]P-6-C<sup>8</sup>Gua, constituted up to 80 % of the total produced DNA adducts, for only 15-20 % accounted for bulky adducts like BPDE-10N<sup>2</sup>dG. Thus, the radical cation pathway has been proposed as predominant pathway of B[a]P-related DNA adduct formation in mammals.



In marine environment biomonitoring, bulky DNA adducts have been widely studied using the  $^{32}\text{P}$ -postlabeling assay (Randerath et al., 1981, Reddy and Randerath, 1986, Harvey and Parry, 1997, Pfau, 1997). DNA adduct detection can in fact be considered as a biomarker of both PAH exposure and effects (Van der Oost et al., 1994, French et al., 1996). Its usefulness as a cumulative index of current and past exposure to genotoxic compounds has already been demonstrated in a number of fish species (Stein et al., 1993, Sikka et al., 1990). DNA adduct formation has been less studied for the sentinel organism, *Mytilus* sp. Due to their filter-feeding activity, mussels efficiently accumulate PAHs (Mix et al., 1981, Botello et al., 1997). Although at low level, B[a]P metabolism in mussels has already been demonstrated both *in vitro* (Michel et al., 1992, Martinez and Livingstone., 1995) and *in vivo* (Stegeman, 1985, Michel et al., 1995). It leads to the production of B[a]P diols, quinones and phenols by respectively 17, 47 and 36 % (Michel et al., 1995). Mussels have been shown to activate benzo[a]pyrene to products which covalently bind to cellular macromolecules (Marsh et al., 1992, Michel et al., 1995). Nevertheless, Kurelec (1988) failed to detect, by the  $^{32}\text{P}$ -postlabeling assay with butanol enhancement, significant adduct levels following *in vitro* incubation of *Mytilus galloprovincialis* digestive gland homogenate with B[a]P.

Since, a time- and dose-response relationship has been demonstrated *in vivo* between DNA adduct level in *Mytilus galloprovincialis* gills, and two to three day exposure to 0.5-100 ppb of waterborne B[a]P by the nuclease P1-enhanced  $^{32}\text{P}$ -postlabeling assay (Venier and Canova, 1996a). In addition, low adduct levels ( $< 1$  adduct/ $10^8$  nucleotides) have been detected in mussels during a sampling program in the Venice lagoon using the  $^{32}\text{P}$ -postlabeling technique (Venier et al., 1996b). The existence of a CYP1A-like gene in mussel (Wootton et al., 1995, Porte et al., 1995) justifies the investigation of activation pathways previously identified in vertebrates. B[a]P may lead, like in vertebrates, to predominant depurinating adduct formation via a radical cation pathway. Hence, measurement of these types of adducts could be more relevant.

In this paper, a mesocosm model is proposed to assess pollutant exposure in mussel. Because contamination usually occurs via their filter-feeding activity, mussels have been exposed to B[a]P via the feed supply. During a 28-day exposure, kinetics of B[a]P bioaccumulation was assessed in whole mussel tissues and several biomarkers (BPH, GST, CAT, DTD, AChE and CYP1A-like immunopositive proteins) measured. Induction of B[a]P-related DNA adducts was studied by applying the <sup>32</sup>P-postlabeling assay. The results obtained support the use of this model and suggest further studies on DNA adduct formation in mussels.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Chemicals

1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), sodium salt of dichlorophenolindophenol (DPIP), 3,3'-methylene-bis-(4-hydroxycoumarin) (dicumarol), 5,5'-dithiobis-2-acid nitrobenzoic (DTNB), disodium salt of reduced form  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), acetylthiocholine, ultrapure reduced glutathione (GSH), Triton X-100, RNase A, rat spleen phosphodiesterase, sodium citrate balanced micrococcal nuclease (dialyzed in MilliQ water before use), sodium acetate balanced potato apyrase, SEVAG (chloroform: isoamyl alcohol, 24:1), 3-OHB[a]P and B[a]P were purchased from Sigma-Aldrich Chemical. RNase T1, Proteinase K, Nuclease P1 and T4 polynucleotide kinase were bought from Boehringer Mannheim. [ $\gamma$ <sup>32</sup>] ATP (specific activity of > 5,000 Ci/mmol) was purchased from Amersham. <sup>3</sup>H-anti ( $\pm$ )-trans-7,8-dihydroxy-anti-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene (<sup>3</sup>H-BPDE) was from NCI, Chemical Carcinogen Standard Repository, Bethesda, MD. Perdeuterated B[a]P was purchased from MSD Isotopes. Polyethyleneimine cellulose TLC plates were from Macherey-Nagel. Chromatography paper, nitrocellulose membrane msi, autoradiography and chemiluminescence hyperfilms were respectively from

Whatman International, Micron Separations Inc. and Amersham Life Sciences. Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus was from NEM Life Science Products. Affinity purified mouse IgG were purchased from Bioatlantic. Anti-cod (Gadus morhua) CYP1A antibodies were a gift from Prof Goksøyr (University of Bergen, Norway). Marine Liquify was bought from INTERPET. All other reagents were of analytical grade.

## 2.2 Animal treatment

Specimens of mussels, Mytilus galloprovincialis, used for this experiment were rope-growing mussels, originating from the Thau Bay (Etablissement Archimbaud, Mediterranean Sea, France). In the laboratory, individual mussels were selected to build up a group homogenous in size and maintained in two 35 ‰ seawater filled tanks. Water was directly pumped from the Bay of Arcachon (Atlantic Ocean, France). Its temperature varied between 16 and 17°C during the time of the experiment. The volume provided per individual (1.5 l per individual) was fixed in each tank: sampled animals were systematically replaced. Water was renewed every morning. Oxygen was provided by the use of a continuous air-bubbler system.

Animals were fed with Marine Liquify (INTERPET), a commercial nutritive solution for marine invertebrates. Regarding to the particle size filtered by mussel, the suitability of this solution has been previously checked by laser granulometry. Each individual received a daily amount of 28 mg equivalent d. w. of Marine Liquify. Feed was brought 8 hours a day into the tanks using a peristaltic pump. In the assay tank, feed was contaminated with B[a]P to reach a concentration of 1.786 µg B[a]P/mg d. w. Marine Liquify. Hence, each individual was nominally exposed to a daily theoretical dose of 50 mg B[a]P/kg d. w. mussel. This dose corresponds to the total PAH concentration recorded in whole mussel tissues from the highest contaminated sites of the french biomonitoring networks, RNO (Claisse et al., 1992).

A 4-day acclimatization period was observed before the beginning of the contamination. Experiments were conducted during 28 days. Regarding its duration, an estimated mortality of 10 % was taken into account for the sampling program. In each of the two tanks, assay and control ones, sampling occurred at day 0, 3, 6, 10, 17, 24 and 28 after the end of the acclimatization period. At each time point, 4 pools of 10 individuals were collected for the measurement of B[a]P-related DNA adducts in the digestive gland and 4 pools of 10 individuals for biomarker measurement. Two pools of 10 individuals were also collected for the chemical analysis and for the time-course study of the mean individual dry weight.

### 2.3 Determination of B[a]P concentration in whole mussel tissues

Focused microwave (FMW) assisted extraction of freeze dried tissues was performed at a frequency of 2450 MHz using a Maxidigest 350 apparatus (Prolabo, France), provided with a programmable heating power (from 30 W to 300 W). The freeze-dried samples, 100 mg for contaminated samples and 3 g for the blank ones, were placed in duplicate into the extraction vessels with 30 to 40 ml of dichloromethane for microwave irradiation. Internal perdeuterated standard (B[a]Pd<sub>12</sub>) used for quantification was added before the irradiation.

The total organic extract of each sample was reduced to a small volume using a rotary evaporator. The extract was then fractionated onto alumina and silica containing micro-columns to collect separately saturated and aromatic compounds, as described by Baumard et al. (1997). Then, normal phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis was performed on a Spherisorb 5 mm aminosilane (NH<sub>2</sub>) column (20 cm length, 4.7 mm i.d) eluted with n-pentane (2 ml/min) and followed with a UV-detector (Spectromonitor II, LDC) set at 254 nm. The aromatic fractions were collected, gently reduced in volume under nitrogen gas flow and then submitted to GC/MS (Gas Chromatography/Mass Spectrometry) analysis.

GC/MS analysis was conducted using an HP5890 series II gas chromatograph coupled to an HP5972 MSD mass spectrometer. The gas chromatograph was equipped with a splitless injector (purge delay 30 s, purge flow 60 ml/min, injection temperature = 270°C). The column used was a PTE5 (Supelco, France), 60 m x 0.2 mm i.d x 0.1 µm film thickness. Helium was used as carrier gas at a rate of 1 ml/min. The column was kept at 50°C for 2 min then programmed to 290°C at 5°C/min and kept at 290°C for 10 min. The interface was at 290°C. The mass spectrometer was operated under the selected ion monitoring mode (SIM) using the molecular ions of the studied PAH (Electron Impact at 70 eV, 2000 V, 1 scan/s). The quantification of B[a]P in each sample was performed accordingly to perdeuterated B[a]Pd<sub>12</sub>. Response factor was calculated with standard solutions.

#### 2.4 Time-course study of mean individual dry weight

At each sampling point, the individual dry weight of 10 whole mussels was gravimetrically determined by weighing the samples before and after a 48 hour period at 60°C in a drying oven.

#### 2.5 Enzymatic biomarker measurement

Digestive gland and gill samples (pools of 10 individuals) were stored at - 80°C prior to analyses. Preparation of subcellular fractions was carried out for both digestive gland (cytosol, microsomes) and gill (S9 : supernatant at 9,000g) tissues. Protein titration of each fraction was performed by the application of the method of Lowry et al. (1951), automated by Shuel and Shuel (1967).

**Benzo[a]pyrene hydroxylase (BPH)** activity was assessed in digestive gland microsomes by the adapted fluorometric method of Michel et al. (1993) for a microplate reader. Following incubation with B[a]P, the reaction was stopped by the addition of 10 % Triton X-100. Fluorescence of the sample was obtained by difference in fluorescence between the respective emission/excitation wavelengths of 492 nm/430 nm and 510 nm/430 nm. A known amount of 3-OHB[a]P was used

as internal standard in all samples to control for quenching. **Soluble Glutathione-S-Transferase** (GST) activity was measured in both digestive gland cytosol and gill S9 by the method of Habig et al. (1974). CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) was used as substrate and the occurrence of GSH-CDNB complex was followed at 340 nm. **Catalase** (CAT) activity was measured in digestive gland cytosol by the adapted method of Claiborne (1985). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disappearance was recorded at 240 nm. **DT-diaphorase** (DTD) activity, defined as the dicumarol inhibited part of the DCPIP (dichlorophenolindophenol) reductase activity, was measured at 600 nm in digestive gland cytosol as described by Benson et al. (1980). **Acetylthiocholine esterase** (AChE) activity was measured in gill S9 by applying the colorimetric method of Ellman (1961), adapted for a microplate reader by Galgani and Bocquené (1988).

The reaction mixtures of these activities were as follows: **BPH** 0.7 mM NADPH in 50 mM Tris, pH 7.3, 80 µM B[a]P in methanol/acetone (v/v), qsp 50 mM Tris, pH 7.3, 25°C, **GST** 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.5, 25°C, 20 mM CDNB in ethanol, 20 mM glutathione in 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, **CAT** 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4, 25°C, 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, **DTD** 50 mM Tris-HCl, 40 µM DCPIP in water, 0.15% NaOH or 0.1 mM dicumarol in 0.15% NaOH, 0.3 mM NAD(P)H in 100 mM Tris-HCl, **AChE** 90 mM Tris-HCl, pH 7, 0.53 mM DTNB in 0.1 mM Tris-HCl, pH 8, 2.8 mM acetylthiocholine in water.

## 2.6 CYP1A-like immunopositive protein titration

Digestive gland microsomal proteins (5 µg) were applied onto a nitrocellulose membrane previously soaked during 3 min in distilled water. Protein deposit was performed by the use of a Touzard & Matignon Apparatus. Following incubation for 30 min at 37°C in buffer E (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.0005% Tween 20, 5% BSA, pH 7.6), membrane was washed in 62.5 mM Tris-HCl, 20% SDS, 100 mM mercaptoethanol, pH 6.7 for 30 min at 46°C. Membrane was then incubated for 90 min at 37°C in buffer E, before three successive washes in buffer

F (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.0005 % Tween 20) of 15, 5 and 5 min respectively. Membrane was then incubated with anti-cod CYP1A monoclonal antibodies (800 times diluted solution in 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.0005% Tween 20, 1% BSA, pH 7.6) for 1 hour at room temperature. Following a few washes in F buffer, the membrane was incubated for 90 min with a solution of peroxidase-conjugate mouse anti-IgG (0.5 µg/ml). Immunodetection was carried out by using a western blot chemiluminescence reagent kit. The intensity of the spots evident on ECL films was then determined by using an image analyzer (Bioprofil, Vilber Lourmat).

### 2.7 Detection of bulky B[a]P- related DNA adducts

#### DNA extraction

Samples were stored at – 80° C prior to analysis. DNA was purified as described in Venier and Canova (1996) with some modifications. Each pool of digestive gland tissues was homogenized in 1 mM EDTA/1% SDS (10 ml per g tissue). An aliquot of 1 ml was recovered and briefly centrifuged at 500g, at 4°C. Samples of 500 µl of supernatant were incubated twice with a mix of RNAse A (600 µg/ml), RNAse T1 (100 U/ml), and α-amylase (10 µg/ml) for 15 and 30 min at 37°C. Protein digestion was then carried out by incubation twice with proteinase K (200 µg/ml) for 1 h at 45°C. Following SDS concentration adjustment to 1.5%, samples were heated up to 60°C for 10 min. After addition of 125 µl of 5 M sodium perchlorate, DNA was extracted with 700 µl of SEVAG (chloroform: isoamyl alcohol, 24 : 1) by mild and continuous reverse agitation at room temperature. Aqueous phase was recovered after centrifugation at 4°C for 15 min at 14,000g and DNA was precipitated overnight in 2 volumes of glacial absolute ethanol below 20°C. After centrifugation (4°C, 15 min, 14,000g), ethanol was removed and the DNA pellet dried by evaporation under low pressure. Each pellet was then resuspended in 500 µl TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) and let to dissolve for 1 h at 37°C. Following addition of 50 µl of 2.5 M sodium acetate and 1 volume glacial absolute ethanol, DNA was precipitated

again. After centrifugation (4°C, 20 min, 14,000g), the pellet was dried and resuspended in 500 µl MilliQ water. DNA titration was performed by UV spectrophotometry at 260, 280 and 230 nm (260/280 ratio  $1.8 \pm 0.5$ , 260/230 ratio  $\sim 2$ ).

#### <sup>32</sup>P- postlabeling assay

Each DNA sample was precipitated as indicated above and resuspended in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 to reach a final concentration of 2 µg DNA/µl. Digestion to 3'-monophosphate deoxyribonucleosides (dNps) was performed by incubation of 30 µg DNA for 3.5 h at 37°C with micrococcal nuclease (0.32 U/µg DNA) and spleen phosphodiesterase (0.003 U/µg DNA) in 20 mM sodium succinate, 10 mM calcium chloride, pH 6 (final concentrations). Normal dNps were dephosphorylated by incubation for 30 min at 37°C with nuclease P1 (0.375 µg/µg DNA) in 8.5 mM zinc chloride, 70.8 M sodium acetate, pH 5 (final concentrations). The reaction was stopped by addition of 2.5 µl 0.5 M Tris-HCl, pH 9. Adducted dNps ( $\sim 5$  µg DNA digest) were labeled by incubation for 40 min at 37°C with [ $\gamma$ <sup>32</sup>]ATP ( $> 20$  µCi) and 2.5 U kinase T4 in 10 mM bicine, pH 9.5, 10 mM magnesium chloride, 10 mM dithiothreitol, 1 mM spermidine (final concentrations). Excess of ATP was hydrolyzed by incubation with 0.05 U potato apyrase for 40 min at 37°C.

Multidimensional migration of each sample was conducted on polyethylenimine TLC (Thin Layer Chromatography) plates in a solvent system made of **D1** 1 M sodium phosphate pH 6.8, **D2** 5.3 M lithium formate, 8.5 M urea, pH 3.5, in the same direction as D1, **D3** 1.2 M lithium chloride, 0.5 M Tris-HCl, 8.5 M urea, pH 8, in perpendicular direction to D2 and **D4** 1.7 M sodium phosphate, pH 6, in the same direction as D3. Autoradiography of the TLC plates allowed a qualitative analysis of the bulky B[a]P-related DNA adducts of each sample. Quantification of the radioactive spots was carried out by Cerenkov counting of blank and radioactive areas. Results were expressed as number of adducts per  $10^8$  nucleotides (RAL, Relative Adduct Labeling).



## 2.8 Statistical analysis

Statistical analysis of raw data on animal weight and on the different biomarkers measured was conducted in the same way. An analysis of variances (Statistica Soft Inc.) was conducted taking as factors both time of the experiment (time maintained transplanted in the aquarium) and B[a]P exposure. Quantitative results on DNA adduct levels were analyzed by the application of a one-way ANOVA. Normality distribution of the variable was checked (Smirnov test) each time variance homogeneity was not verified (Hartley test). Each time an effect was shown significant, an a posteriori test, Newman Keuls test, was performed. Correlation matrix was also calculated to study the relationships between the different biomarkers measured (Statistica Soft Inc.).

## 3. Results

### 3.1 B[a]P concentration in whole mussel tissues

Results on B[a]P concentration in whole mussel tissues are presented in Figure 1. At each sampling point, one sample has been analyzed in duplicate for its B[a]P content. Values depicted in this figure are means calculated from these duplicate measures.

In the exposed mussels, B[a]P concentrations are higher than those recorded in control ones: in this latter experimental group, B[a]P concentrations are better expressed in ng/kg d. w. mussel ( $1.1 \pm 0.5$  ng/ kg d. w.), corresponding to more than two orders of magnitude less than those recorded in exposed animals. At the end of the experiment, a concentration of 581 mg/kg d. w. is reached. Validation of a linear mathematical model shows a linear increase of B[a]P concentration ( $R = 0.937$ ,  $p < 0.001$ ) with time of B[a]P exposure, despite the decrease observed at days 10 and 24. At the end of the experiment, some mussels, previously used to maintain the volume per individual stable, were available in the assay group. After

being exposed during respectively 22 and 25 days to B[a]P, 2 groups of mussels were maintained 4 days in clean sea water. For both groups, a decrease in B[a]P concentration of respectively 19 and 35 % is observed.

### 3.2 Time-course of mean individual dry weight

B[a]P exposure has no effect on the individual dry weight of mussel ( $p > 0.05$ ). Nevertheless, animal weight decreased during the experimentation ( $p < 0.001$ ). A *a posteriori* test (Newman-Keuls test) shows a significant effect from day 3 of experiment ( $p < 0.05$ ) without additional decrease beyond this point.

### 3.3 CYP1A-like immunopositive protein content and enzymatic biomarkers

Titration of the CYP1A-like immunopositive proteins shows no effect of B[a]P exposure on the level of the CYP1A-like protein expression in mussel digestive gland ( $p > 0.05$ ). Nevertheless, B[a]P exposure significantly increases the level of one of its related activities ( $p < 0.01$ ) as seen for BPH in Figure 2.

Exposure to B[a]P has no effect on GST activity in mussel digestive gland ( $p > 0.05$ ) whereas it significantly decreases it in gills ( $p < 0.05$ ) as shown in Figure 3. DTD and AChE activities, Figures 4 and 5, are significantly depressed by B[a]P exposure ( $p < 0.05$  and  $p < 0.001$  respectively). On the other hand, CAT activity is significantly increased in digestive gland cytosol as shown in Figure 6 ( $p < 0.05$ ). In parallel to B[a]P-related effects, all the biomarkers measured, except DTD activity, have been shown to evolve naturally with time during the animal transplantation. Hence, BPH increases significantly from day 24 of transplantation, whereas CYP1A-like immunopositive proteins are significantly depressed at day 17. GST activity in both gills and digestive gland and CAT activity increase significantly from respectively day 17 and day 28 in transplantation. AChE activity increases as soon as day 3.

When considering the correlation matrix obtained by using all the data from both the control and assay groups (Table 1), all the studied biomarkers are correlated to

B[a]P concentration except to GST activity in gills and to CYP1A-immunopositive protein content. AChE, CAT and BPH activities display a strong correlation ( $p < 0.001$ ) to B[a]P concentration. AChE is correlated to all the measured biomarkers, except to GST activity in gills and to CYP1A-immunopositive protein content. CAT and digestive gland GST activities are correlated to all the biomarkers except to DTD activity and to CYP1A-immunopositive protein content. A positive correlation is observed between GST activity in the gills and GST activity in the digestive gland. On the other hand, no correlation is recorded between BPH activity and CYP1A-like immunopositive protein content.

#### 3.4 Analysis of bulky B[a]P-related DNA adducts

<sup>32</sup>P-postlabeling of digestive gland DNA demonstrates adduct induction in the exposed-animals. The localization of these adducts is presented in the autoradiograph, Figure 7. The first adduct, close to the origin point, appears from day 10 of exposure. The second one, very weak and more diffuse, appears later, from day 24 of exposure. None of these two adducts were recorded in TLC plates of control digestive gland DNA.

Quantitative analysis was carried out by Cerenkov counting. Raw data were statistically analyzed by a one-way ANOVA, taking time of B[a]P exposure as a factor. As homogeneity of variances was not verified, data were normalized by log transformation. Results are summarized on Figure 8.

Either for adduct 1 ( $p < 0.001$ ), adduct 2 ( $p < 0.01$ ) or total adduct level ( $p < 0.001$ ), DNA adduct formation increases significantly with time. Increase is significant as soon as day 3 of exposure for adduct 1 and total adducts, only from day 24 of exposure for adduct 2. The maximum total adduct level reached during the exposure was  $0.269 \pm 0.082$  RAL. Adduct levels (adduct 1, adduct 2 and total adducts levels) are highly correlated to B[a]P concentration in whole mussel tissues ( $p < 0.001$ ).

Table 2 recapitulates the correlation coefficients obtained between adduct levels recorded in the digestive gland and data of both enzymatic and chemical biomarkers. BPH, DTD, AChE and CAT activities present a highly significant correlation coefficient with adduct level ( $p < 0.001$ ), either in terms of adduct 1, adduct 2 or total adducts. No significant relationship is observed between adduct level and GST activity in both gills and digestive gland, as it is the case for the CYP1A-like immunopositive proteins.

#### 4. Discussion

##### 4.1 B[a]P bioaccumulation

Results obtained from B[a]P concentration in whole mussel tissues show that B[a]P incorporated in feed was well absorbed and bioaccumulated in mussels for the exposure model developed. A plateau level is not reached after 28 days of exposure, although B[a]P concentration recorded is very high: 581 mg/ kg d. w. This result confirms the ability of mussels to bioconcentrate this aromatic compound. The decrease in concentration that was observed at day 10 and 24 remains unexplained. On the other hand, the decrease observed after a 4 day depuration period, demonstrates the ability of this organism to eliminate bioaccumulated B[a]P. Because of the lack of inter-sample standard deviation values on data presented, the significance of this decrease could not be determined. This is due to time and cost of chemical analysis. Nevertheless, the number of animals used (10 mussels) and the high accuracy of this analysis is thought to give reliable information.

##### 4.2 Time-course study of the individual dry weight

The decrease observed in the mean individual dry weight is not associated with B[a]P exposure but only with the transplantation conditions of the experiment.

The negative effect of the transplantation is recorded as soon as day 3, although a 4-day acclimatization period was observed before the beginning of the experiment. The stress produced by the animal transplantation and the artificial feed supply used in this experiment are probably responsible for the physiological impairing of mussels.

Regarding the B[a]P concentrations recorded in whole mussel tissues, absorption of feed is nevertheless obvious. Differences in color of the digestive gland homogenates are also highly indicative of dietary content. At day 0, homogenates display a dark green color due to the presence of microalgae (natural feed source in their environment) in the gut content, whereas from day 3, homogenates display a white color, color of the Marine Liquify solution used as feeding source in this experiment. As regulation of filtration rate has been demonstrated in relation to feed quantity and quality in bivalves (Ibarrola et al., 1998), filtration activity of mussels may have been reduced. The assimilation efficiency of different concentrated Marine Liquify solutions was however determined in a preliminary experiment to estimate the suitable daily amount per individual.

Decrease in the AChE activity of control mussels as soon as day 3 of the experiment corroborates the hypothesis that B[a]P independent-changes observed in biomarker levels, are related to transplantation. Due to its role in cholinergic type neurotransmission, this marker of neurotoxicity is believed to be highly sensitive to the physiological state of the animals. It seems important to extend the acclimatization period in such an experiment to enable the individuals to adapt to the feed supply and to the artificial environment.

#### 4.3 Response of the enzymatic biomarkers

BPH activity is based on the production of phenol metabolites from B[a]P oxidation by mussel digestive gland microsomes. Induction of mussel BPH activity (+ 63%) by 3-methylcholanthrene (major inducer of CYP1A subfamilies in mammals) demonstrated its possible use as a CYP1A specific activity (Michel

et al., 1993, 1994). Because PCBs and PAHs have been shown to induce this subfamily, BPH activity appears as a potential biomarker of these commonly distributed pollutants in the marine environment. In field studies, strong correlations have been demonstrated between BPH activity and both PAH and PCB concentration in the sediment, allowing site discrimination in accordance to pollution level (Michel et al., 1998). Solé et al. (1998) also reported elevated BPH activities in organic contaminated sites from the North Sea. They demonstrated a higher discrimination power for BPH turnover (BPH activity expressed per amount of cytochrome P450) and its correlation to the total PAH concentration in mussel. On the other hand, Nasci et al. (1989) and Solé et al. (1996) failed to report increased activities between sites of significant different level of PAHs.

In the present paper, we reported a significant increase of BPH activity by B[a]P exposure ( $p < 0.01$ ). This suggests an increase of the phase I biotransformation process and hence, a higher production of phase I metabolites. Among the metabolites produced, production of B[a]P-diols is directly involved in the diol-epoxide pathway and hence, in bulky DNA adduct formation. That may explain the strong correlation observed between BPH activity and DNA adduct levels ( $p < 0.001$ ) recorded in the digestive gland. BPH activity is highly correlated to B[a]P concentration in mussel ( $p < 0.001$ ). Lack of correlation between BPH activity and CYP1A-like immunopositive protein content may be explained by the technique of titration used in this experiment for this latter biomarker, as discussed further in the text. Presence of an internal standard explains the relatively high BPH activities reported in this paper. Values reported in the bibliography range from 1.1 to 25.0 pmol/min/mg prot (Ade et al., 1982, Moore et al., 1989, Michel et al., 1994) whereas the mean activity of the control group of this study is 101.0 pmol/min/mg prot. Development of a fluorometric method for a microplate reader is a promising advance for possible routine application. Nevertheless, further work is required for the validation of this method.

GST activity is part of the phase II of the metabolism process. This activity has already been purified and characterized in Mytilus edulis and Mytilus

galloprovincialis (Fitzpatrick and Sheehan, 1993, Fitzpatrick et al., 1995a, 1995b). In laboratory studies, GST activity of whole mussel cytosol has been shown to be significantly depressed by B[a]P at concentrations from 0 to 1.4  $\mu\text{mol}$  B[a]P/l/mussel (Michel et al., 1993). In field and transplantation studies, no correlation between GST activity and PAH pollution levels has been demonstrated in both mussel digestive gland and gills (Fitzpatrick et al., 1997, Solé et al., 1996, Livingstone et al., 1995). Nevertheless, an in situ study of Fitzpatrick et al. (1995b) reported a slight increase of this activity with increasing tissue concentration of chemical compounds in the digestive gland. These results illustrate the controversy associated with the PAH effects reported for this activity and the main reason that makes this measure a potential, but not effective biomarker of PAH exposure.

In this paper, a different effect of B[a]P exposure is observed on this activity depending on the tissue used to measure it. In fact, a significant decrease is observed with B[a]P exposure in mussel gills, whereas the same activity remains unchanged in the digestive gland. GST activity appears more sensitive to B[a]P exposure in the gills than in the digestive gland. Nevertheless, when looking at the correlation matrix displayed in Table 1, only digestive gland GST is correlated to B[a]P concentration. GST activity in gills appears to be indirectly inhibited by B[a]P exposure. Difference in sensitivity between tissue is not expected to be related to B[a]P tissue concentration. Exposure of mussels to different concentrations of waterborne B[a]P (0 to 1,000 ppb) (Canova et al., 1998) shows higher B[a]P concentrations in the digestive gland. The same experiment as the one described in this paper with [ $\text{H}^3$ ]B[a]P-contaminated feed supply also demonstrated higher concentrations in this latter organ (Akcha et al., 1999). Regarding the results on chemical analysis and on BPH activity measurement, there is no doubt of a B[a]P bioaccumulation and hence, biotransformation in mussel. Phase I metabolism is thought to have lead to the production of substrate metabolites for GST. Competition between endogenous substrates and those produced by B[a]P biotransformation could be responsible of an inhibition of GST. Differences between digestive gland and gill tissues could then be

associated to differences in B[a]P metabolism rate of phase I. Nevertheless, the data reported by Stegeman (1985) show that B[a]P metabolism (nmol produced metabolites/ min/ mg prot) is nearly 3 times higher in the digestive gland than in the gills. Some benzoquinones have already been identified as inhibitors of this activity (Van Ommen et al., 1991). Because quinones are known to be the major B[a]P metabolites produced by mussels (Stegeman, 1985), observation of Van Ommen et al., could be a possible assumption only if a different metabolite profile exists between the two different tissues. Nevertheless, the most probable explanation in B[a]P effect is based on differences in isoform properties between tissues. 4 isoenzymes have been reported in gills (Fitzpatrick et al., 1995a) and digestive gland (Fitzpatrick et al., 1995b) subcellular fraction with a predominant part of the activity in isoenzyme 1. Because of the expected decrease of B[a]P excretion, inhibition of GST activity in gills can result in an increased B[a]P toxicity. Difference observed for this activity from one tissue to another can explain the higher level of B[a]P-related DNA adduct formation in gills compared to digestive gland (Canova et al., 1998). In benthic fishes, increase in liver GST activity has been associated with relatively lower DNA binding of BPDE (Kirby and Hayes, 1992). Nevertheless, when looking at the correlation coefficients obtained for all the biomarkers measured (Table 2.) no correlation is demonstrated between GST activity and DNA adduct levels in the digestive gland.

CAT activity is one of the antioxidative enzymatic activities of the cell. It catalyses the transformation of the reactive oxygen specie, hydroperoxide, to molecular water. In a laboratory study, no variation of this activity has been recorded after 19 day exposure to 50 ppb of B[a]P (Livingstone et al., 1990). The increase in activity reported in this paper is nevertheless in agreement with the published data. *In vitro*, microsomal production of oxyradicals in mussels has been shown to be stimulated by a large variety of xenobiotics (Livingstone et al., 1990, Ribera et al., 1991, Lemaire and Livingstone, 1993) including B[a]P quinones (Martinez and Livingstone, 1995). In this experiment, accumulation and B[a]P biotransformation to quinones is thought to lead to the production of



reactive oxygen species as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. CAT activity in mussel digestive gland is highly correlated to B[a]P concentration in whole mussel (Table 1.). Such positive correlations have already been demonstrated *in situ* with PAH concentration (Solé et al., 1998, Porte et al., 1991), legitimating the use of this enzymatic activity as a suitable biomarker of PAH exposure. In this experiment, a highly positive correlation is also demonstrated between CAT activity and DNA adduct levels.

DTD activity is considered as an antioxidative activity and detoxification enzyme with respect to quinone metabolism. By catalyzing a two-electron reduction of quinones to hydroquinones, it prevents redox cycling with subsequent production of highly reactive superoxide anions (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and semiquinone radical formation (Cadenas, 1995, Halliwell and Cross, 1994). B[a]P quinones have been demonstrated to lead to the formation of ROS via redox cycling process in mussels (Sjölin and Livingstone, 1997). *In situ*, bibliographic data reported for DTD activity in mussels are controversial. A positive correlation between DTD activity and PAH concentration has been demonstrated in *Mytilus galloprovincialis* (Porte et al., 1991, Solé et al., 1995). On the other hand, no site variation of this activity has been reported during sampling programs in the Venice Lagoon (Livingstone et al., 1995) and in the area of the 'Aegean Sea' oil spill (Solé et al., 1996). In a laboratory study, no variation of this activity has been recorded after exposure for 19 days to 50 ppb B[a]P (Livingstone et al., 1990), although this activity has been reported to be induced by planar aromatic hydrocarbons such as B[a]P (Bayney et al., 1989).

In the present paper, a decrease in DTD activity is reported with B[a]P exposure. As DTD activity, NAD(P)H cytochrome P450 reductase is also involved in quinone metabolism, yielding highly reactive semiquinone radicals via a one-electron reduction. Quinone toxicity is thought to depend on the combined actions of both these two competitive activities (Nakamura and Hayashi, 1994). In hamsters presenting chemically-induced preneoplastic lesions, a significant decreased of DTD activity was recorded in parallel to a significant increase in NAD(P)H cytochrome P450 reductase activity (Segura-Aguillar et al., 1994).

Decrease observed in the described experiment could then be associated with substrate competition between these two enzymes. Measurement of NAD(P)H cytochrome P450 reductase would have been pertinent in this regard. When looking at the correlation matrix (Table 1. and Table 2), DTD is negatively correlated to both B[a]P concentration in whole mussel ( $p < 0.05$ ) and DNA adduct levels ( $p < 0.01$ ). DTD activity appears, therefore, as a potential biomarker of PAH exposure in mussel.

AChE activity is widely integrated in biomonitoring studies as a biomarker of both pesticide and heavy metal exposure (Bocquéné et al., 1993, Burgeot et al., 1996, Najimi et al., 1997). Little is known on PAH effects on this activity. Because of its role in neurotransmission, AChE is thought to be highly sensitive to biotic and abiotic changes. The decrease observed with B[a]P exposure can be seen as a general negative effect of B[a]P exposure. AChE activity is highly negatively correlated to both B[a]P concentration and DNA adduct level. AChE activity appears as a potential biomarker of PAH exposure, although the mechanisms of this inhibition is unknown.

#### 4.4 CYP1A-like immunopositive proteins

Cytochrome P450 is an essential enzyme in the oxidative metabolism of both endogenous and exogenous compounds. Existence of an inducible CYP1A gene by environmentally relevant pollutants in fish has been widely applied as a biomarker of both PAH and PCB exposure in biomonitoring studies (Goksøyr and Hus  y, 1992, Goksøyr, 1995, Livingstone, 1996). Presence of P450-dependent activities in mussels is established and widely used in marine environmental toxicology (Stegeman, 1985, Michel et al., 1993, Solé et al., 1998). Nevertheless, molecular evidence of its existence is recent and to date no sequence data is available. Use of antibodies from mammals and fish in western blot analysis allowed the demonstration of CYP1A, CYP2B, CYP2A, CYP3A and CYP4A-like protein in digestive gland microsomes of Mytilus galloprovincialis (Peters et al.,

1998). Porte et al. (1995) already showed the recognition by anti-CYP1A fish antibodies of a partially purified P450 from Mytilus edulis. These findings support the work of Wootton et al. (1995) who demonstrated by the use of cDNA probes (CYP1A1, CYP3A, CYP4A1, CYP11A1 from human, rat and fish) single mRNA hybridization in Mytilus species. All the above studies provide evidence of the molecular presence and expression of similar P450 gene subfamilies in mussel.

Among the P450 subfamilies, the CYP1A is known to be induced by planar PAHs and PCBs (Livingstone, 1991). Variation of CYP1A-like mRNA has already been demonstrated in Mytilus galloprovincialis in the field (Wotton et al., 1995), demonstrating the expression modulation of this gene in mussels. Similar observations were reported for the CYP1A immunopositive protein content. Following transplantation from a reference site to an industrial contaminated one, CYP1A immunopositive protein content was shown to increase by 63 % within a time-dependent manner (Peters et al., 1998). In a field study, higher levels were also reported in organisms from crude oil contaminated sites (Solé et al., 1996). In a laboratory study, Canova et al. (1998) also reported increased expression after B[a]P exposure to 50 and 1,000 ppb for 48 h and to 100 and 500 ppb for 72 h. On the other hand, Solé et al. (1998) failed to show any elevation of CYP1A expression after transplantation of animals from a reference to a contaminated site. In this later study, absence of effect was attributed to the low contamination level of the studied area, despite an increase in PAH concentration in mussel from 57 to 206 % after transplantation.

In the present study, no effect of B[a]P exposure was recorded on the level of the CYP1A-like immunopositive proteins of mussel digestive gland. As underlined by Solé et al. (1998), induction of the CYP1A-like gene in mussel might depend on the tissue dose of the known pollutant inducer and could be characterized so by the determination of a lowest effective (inducible) dose. In the study of Canova et al. (1998), a significant increase in CYP1A-like immunopositive proteins was recorded in mussels presenting whole tissue B[a]P concentration of 200, 339.3 mg/kg w. w. (48h exposure to 50 and 1,000 ppb) and 386.6 and 503.6 mg/kg w.w

(72 h exposure to 100 and 500 ppb). Because in the present experiment we reached an internal tissue concentration corresponding to 116 mg B[a]P/kg w. w., it is possible that the lowest inducible dose was not reached. Nevertheless, it is important to underline that in the study of Canova et al. (1998), significant induction of CYP1A-like immunopositive proteins was not observed for some higher or intermediate B[a]P concentrations.

Because of the significant effect of B[a]P exposure on BPH activity, another explanation to the absence of effects on this biochemical biomarker may be the occurrence of crossed reactions of the monoclonal anti-CYP1A antibodies with crude microsomal fraction. Anti-CYP1A antibodies could be not enough specific for dot-blotting analysis, requiring a previous separation of the different microsomal proteins.

Among the measured biomarkers, BPH, AChE and CAT activities show the highest correlation to both B[a]P concentration and DNA adduct level. On the other hand, GST activity doesn't appear as a potential biomarker of B[a]P exposure in this experiment. All the biomarkers studied, except DTD activity, evolve with time in relation to the time-course following animal transplantation. This evolution is totally independent of B[a]P exposure and changes in biochemical biomarker levels may be attributed to the stress and to the duration of animal transplantation. The natural time-course study of the biomarkers measured is of great importance to discriminate between pollution-related and naturally occurring changes in activity. This kind of study is required before a future application in routine.

#### 4.5 Bulky B[a]P-related DNA adduct formation

The results reported in the present paper confirm the previous evidence of DNA adduct formation in mussels (Venier and Canova, 1996, Canova et al., 1998). Existence of a P450-like enzyme and measures of putative epoxide hydrolase activity (Michel et al., 1993, Suteau and Narbonne, 1988) suggest the occurrence

of a vertebrate-like B[a]P diol-epoxide pathway in mussels. In the present work, no natural adducts (Kurelec, 1988) were detected at the beginning and at the end of the experiment in the control group.

A comparison with a similar study conducted by Canova et al. (1998) demonstrates the importance of the way of exposure in such an experiment (Table 3). In fact, under different exposure conditions (Table 3), a similar DNA adduct level is reached in the digestive gland at the end of the experiment:  $0.287 \pm 0.106$  and  $0.269 \pm 0.082$  RAL  $\times 10^8$  for the study of Canova et al. and for the present work respectively. In this study, the main adduct observed (adduct 1) appears less mobile in comparison to the previous published report. This apparent difference may be explained by procedural details. Interestingly, a second very weak adduct became evident from the day 24 of exposure in this study. Comparison by the Student t test of the DNA adduct levels measured in the two studies shows no significant difference ( $t = 0.23$ ,  $\gamma = 4$ ,  $p > 0.05$ ), although B[a]P concentrations recorded in whole mussels are different. In fact, B[a]P concentration reached in whole mussel in the experiment of Canova et al. (1998) is three times higher than the one described in this paper. Induction of DNA adduct formation seems to be faster via the water column than via trophic intake. Nevertheless, DNA adduct levels of similar order of magnitude are recorded in mussels following longer exposure to a lower amount of B[a]P. Because the same level of adducts is reached for an internal tissue dose two times lower, B[a]P transfer from tissue to DNA seems more efficient when it is accumulated via trophic intake. Because of the poor watersolubility of B[a]P, water contamination may appear not as closed to environmental exposure conditions than the ones proposed in this paper. Despite that the dose applied in water is high and not expected to be recorded in the natural field, water column contamination appears to be the quickest way to study DNA adduct formation mechanistically. On the other hand, experiment length seems to be highly relevant because of the possible induction with time of the biotransformation activities. In the present paper, B[a]P effects recorded for all the measured enzymatic biomarkers may be better explained by a more efficient transfer of B[a]P from tissue to DNA.

## 5. Conclusion

During the time-course of this experiment, B[a]P incorporated in feed has been absorbed and bioaccumulated : its concentration in whole mussel tissues increases linearly with time. At the end of the 28-day experiment, B[a]P concentration in whole mussel was 581 mg/kg d. w. mussel and no plateau value seems to be reached. Taking into account the theoretical amount of B[a]P available per individual during the entire experiment and the concentration recorded in whole mussel tissues, B[a]P transfer is estimated to be about 10 %. Nevertheless, this number is underestimated as B[a]P was not totally available for the organisms due to losses by adsorption on aquarium walls and mussel shells, photodegradation, evaporation and pseudofeces production. This calculation doesn't take into account the amount of B[a]P excreted.

B[a]P biotransformation leads to changes of all the measured enzymatic biomarkers. Increase in BPH activity is thought to indicate a higher production of phase I metabolites. B[a]P diols and quinones are highly relevant in terms of DNA damage. Increase of CAT activity and decrease of DTD activity with B[a]P exposure could be associated with the production of reactive oxygen species via redox cycling of B[a]P quinones. ROS are known to be responsible of lipid peroxidation, protein degradation, DNA damage and apoptosis in vertebrates. AChE inhibition may reflect a global negative effect of B[a]P exposure, independently of the stress provoked by the animal transplantation. Because of their strong correlation to B[a]P concentration in mussel and adduct level, BPH, CAT and AChE activities appear in this experiment as relevant biomarkers of B[a]P exposure. Induction and increase with time of two bulky B[a]P-related DNA adducts demonstrate the genotoxic effect of such an exposure.

Overall, these results validate the suitability of this model for the study of DNA adduct formation. Induction of bulky DNA adducts demonstrates the existence of activation pathways already identified in vertebrates. Further works will be

conducted to investigate the dose-response formation and the persistence of DNA adducts in mussels.

Acknowledgement: The authors thank Dr G. Bocquené and K. Le Menach for their respective help in AChE activity measurement and chemical analyses of the samples. This work was supported by the IFREMER (the French Research Institute for the Exploitation of the Sea) and the European program BIOMAR (ENV5-CT96-0300).

Ade, P., Banchelli Soldaini, M. G., Castelli, M.G., Chiesara, E., Clementi, F., Fanelli, E., et al. (1982). Comparative biochemical and morphological characterizations of microsomal preparations from rat, quail, trout, mussel and Daphnia magna. In: E. Hietanen, M. Laitinen, O. Hanninen (Editors), Cytochrome P-450 Biochemistry, Biophysics and Environmental Implications. Elsevier Biochemical Press B.V., pp. 387-390.

Akcha, F., Burgeot, T., Venier, P., Narbonne, J-F., 1998. Relationship between kinetics of benzo[a]pyrene bioaccumulation and DNA binding in the mussel Mytilus galloprovincialis. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 62: 455-462.

Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., 1997. Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry: application to mussels. J. Anal. Chem., 359: 502-509.

Bayney, R.M., Morton, M.R., Favreau, L.V., Pickett, C.B., 1989. Rat liver NAD(P)H: quinone reductase: regulation of quinone reductase gene expression by planar aromatic compounds and determination of the exon structure of the quinone reductase structural gene. J. Biol. Chem., 264: 21793-21797.

Benson, A.M., Hunkeler, M.J., Talalay, P., 1980. Increases of NAD(P)H: quinone reductase by dietary antioxidants. Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77: 5216-5220.

Bocquéné, G., Galgani, F., Burgeot, T., Le Dean, L., Truquet, P., 1993. Acetylcholinesterase levels in marine organisms along French coasts. Baseline, 26: 101-106.

Botello, A.V., Villanueva F, S., Diaz G, G., 1997. Petroleum pollution in the Gulf of Mexico and Caribbean Sea. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 153: 91-118.



Burgeot, T., Bocquéné, G., Porte, C., Dimeet, J., Santella, R.M., Garcia de la Parra, L.M., Pfohl-Leszkowicz, A., Raoux, C., Galgani, F., 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the Northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 131: 125-141.

Cadenas, E., 1995. Antioxydant and prooxidant functions of DT-Diaphorase in quinone metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, 49: 127-140.

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.*, 399: 17-30.

Cavalieri, E.L., Rogan, E.G., Cremonesi, P., Devanesan, P.D., 1988. Radical cations as precursor in the metabolic formation of quinones from benzo[a]pyrene and 6-fluorobenzo[a]pyrene. Fluoro substitution as a probe for one-electron oxidation in aromatic substrates. *Biochem. Pharmacol.*, 37 : 2173-2182.

Cavalieri, E.L., Rogan, E.G., Devanesan, P.D., Cremonesi, P., Cerny, R.L., Gross M.L., Bodell, W.J., 1990. Binding of benzo(a)pyrene to DNA by cytochrome P450 catalyzed one-electron oxidation in rat liver microsomes and nuclei. *Biochem.*, 29: 4820-4827.

Cavalieri, E.L. and Rogan, E.G., 1995. Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica.*, 25: 677-688.

Claiborne, A., 1985. In: R. A. Greenwald (Editor), *Handbook of methods for oxygen radical research*. C.R.C Press, Boca Raton, Florida, pp. 283-284.

Claisse, D., Joanny, M., Quintin, J-Y., 1992. Le réseau national d'observation de la qualité du milieu marin (RNO). *Analisis*, 20: 19-22.

Conney, A.H., 1982. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons. G.H.A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.*, 42: 4875-4917.

Devanesan, P.D., Ramakrishna, N.V.S., Todorovic, R., Rogan, E.G., Cavalieri E.L., Jeong, H., Jankowiak, R., Small, G.J., 1992. Identification and quantitation of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed by rat liver microsomes in vitro. *Chem. Res. Toxicol.*, 5: 302-309.

Devanesan, P.D., Higginbotham, S., Ariese, F., Jankowiak, R., Suh, M., Small G.J., Cavalieri, E.L., Rogan, E.G., 1996. Depurinating and bulky benzo(a)pyrene-DNA adducts formed in isolated rat liver nuclei. *Chem. Res. Toxicol.*, 9: 1113-1116.

Ellman, G.L., Courtney, K.O., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7: 88-95.

Fitzpatrick, P.J. and Sheehan, D., 1993. Separation of multiple forms of glutathione-S transferase from the blue mussel, Mytilus edulis. *Xenobiotica.*, 23: 851-861.

Fitzpatrick, P.J., Krag, T.O.B., Højrup, P., Sheehan, D., 1995a. Characterization of a glutathione S-transferase and a related glutathione-binding protein from gill of the blue mussel, Mytilus edulis. *Biochem. J.*, 305: 145-150.

Fitzpatrick, P.J., Sheehan, D., Livingstone D.R., 1995b. Studies on isoenzymes of glutathione S-transferase in the digestive gland of Mytilus galloprovincialis with exposure to pollution. *Mar. Environ. Res.*, 39: 241-244.

Fitzpatrick, P.J., O'Halloran, J., Sheehan, D., Walsh, A.R., 1997. Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of Mytilus edulis (L.), as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers*, 2: 51-56.

Flowers, L., Bleczynski, W.F., Burczynski, M.E., Harvey, R.G., Penny, T.M., 1996. Disposition and biological activity of benzo[a]pyrene-7,8-dione. A genotoxic metabolite generated by dihydrodiol dehydrogenase. *Biochem.*, 35: 13664-13672.

French, B.L., Reichert, W.L., Hom, T., Nishimoto, M., Sanborn, H.R., Stein, J.E. 1996. Accumulation and dose-response of hepatic DNA adducts in English sole (Pleuronectes vetulus) exposed to a gradient of contaminated sediments. *Aquat. Toxicol.*, 36: 1-16.

Galgani, F. and Bocquéné, G., 1988. A method for routine detection of organophosphorous and carbamates in sea water. *Environ. Technol. Lett.*, 10: 311-322.

Goksøyr, A. and Husøy, A. M., 1992. The cytochrome P4501A1 response in fish: Application of immunodetection in environmental monitoring and toxicological testing. *Mar. Env. Res.*, 34: 147-150.

Goksøyr, A., 1995. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Arch. Toxicol. Suppl.*, 17: 80-95.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jackoby, W.B., 1974. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249: 7130-7139.

Halliwell, B. and Cross, C.E., 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health. Perspect.*, 102: 5-12.

Harvey, J. S. and Parry, J. M., 1997. The detection of genotoxin-induced DNA adducts in the common mussel Mytilus edulis. *Mutagen.*, 12: 153-158.

Ibarrola, I., Navarro, E., Iglesias, J. I. P., 1998. Short-term adaptation of digestive processes in the cockle Cerastoderma edule exposed to different food quantity and quality. *J. Comp. Physiol.*, 168 B : 32-40.

Kirby, G.M. and Hayes, M.A., 1992. Significance of liver neoplasia in wild fish: assessment of pathophysiologic responses of a biomonitor specie to multiple stress factors. In : A. J. Niimi, M. C. Taylor (Editors), *Proceedings of the eighteenth annual aquatic toxicity workshop : september 30-october 3, 1991, Ottawa, Ontario. Canad. Techn. Rep. Fish. Aq. Sci.*, 106-116..

Kurelec, B., 1988. Post-labeling analysis of carcinogen-DNA adducts in mussel, Mytilus galloprovincialis. *Mar. Environ. Res.*, 24: 317-320.

La, D.K. and Swenberg, J.A., 1996. DNA adducts: biological markers of exposure and potential applications to risk assessment. *Mutat. Res.*, 365: 129-146.

Lemaire, P. and Livingstone, D.R., 1993. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder Platichthys flesus and the mussel Mytilus edulis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1: 1119-1150.

Livingstone, D.R., Garcia Martinez, P., Michel, X., Narbonne, J.F., O' Hara, S., Ribera, D., Winston, G., 1990. Oxyradical production as pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, Mytilus edulis L., and other mollusks. *Funct. Ecol.*, 4: 415-424.

Livingstone, D. R., 1991. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In: Gilles, D. R. (Ed.), *Advances in comparative and environmental physiology*. Sger Verlag, Berlin, pp. 45-185.

Livingstone, D.R., Lemaire, P., Matthews, A., Peters L.D., Porte, C., Fitzpatrick, P.J., Förlin, L., Nasci, C., Fossato, V., Wootton, N., Goldfarb, P., 1995. Assessment of the impact of organic pollutants on goby (Zosterisessor ophiocephalus) and mussel (Mytilus galloprovincialis) from the Venice Lagoon, Italy : Biochemical studies. *Mar. Environ. Res.*, 39: 235-240.

Livingstone, D. R., 1996. Cytochrome P-450 in pollution monitoring. Use of cytochrome P-450 1A (CYP1A) as a biomarker of organic pollution in aquatic and other organisms. In: M. Richardson (Editor), *Environmental xenobiotics*. Taylor and Francis Ltd, London, UK, pp. 143-160.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.

Marsh, J.W., Chipman, J.K., Livingstone, D.R., 1992. Activation of xenobiotics to reactive and mutagenic products by the marine invertebrates Mytilus edulis, Carcinus maenas and Asterias rubens. *Aquat. Toxicol.*, 22: 115-128.

Martinez, P.G. and Livingstone, D.R., 1995. Benzo[a]pyrene-dione stimulated oxyradical production by microsomes of digestive gland of the common mussel, Mytilus edulis L. *Mar. Environ. Res.*, 39: 185-189.

Michel, X.R., Cassand, P. M., Ribera, D.G., Narbonne, J.F., 1992. Metabolism and mutagenic activation of benzo(a)pyrene by subcellular fractions from mussel (Mytilus galloprovincialis) digestive gland and sea bass (Dicentrarchus labrax) liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, 103 C: 43-51.

Michel, X.R., Suteau, P., Robertson, L.W., Narbonne, J.F., 1993. Effects of benzo(a)pyrene, 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl and 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl on the xenobiotic-metabolizing enzymes in the mussel (Mytilus galloprovincialis). *Aquat. Toxicol.*, 27: 335-344.

Michel, X., Salaün, J-P., Galgani, F., Narbonne, J-F., 1994. Benzo[a]pyrene hydroxylase activity in the marine mussel Mytilus galloprovincialis: a potential marker of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbon type compounds. *Mar. Environ. Res.*, 38: 257-273.

Michel, X.R., Beasse, C., Narbonne, J.F., 1995. In vivo metabolism of benzo(a)pyrene in the mussel, Mytilus galloprovincialis. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 28: 215-222.

Michel, M., Narbonne, J.F., Mora, P., Daubèze, M., Ribera, D., Lafaurie, M., Budzinski, H., Garrigues, P., 1998. Indicateurs biochimiques de pollution des écosystèmes côtiers: Expérience du groupe interface chimie-biologie des écosystèmes marins (GICBEM). In: L. Lagadic, T. Caquet, J-C. Amiard, F. Ramade (Editors), *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*. Lavoisier TEC&DOC, Paris, pp. 9-32.

Mix, M.C., Schaffer, R.L., Hemingway, S.J., 1981. Polynuclear aromatic hydrocarbons in bay mussels (Mytilus edulis) from Oregon. In: C.J. Dawe et al. (Editors), *Phyletic approaches to cancer*. Japan SCI. SOC. Press, Tokyo, pp. 167-177.

Moore, M. N., Livingstone, D. R., Widdows, J., 1989. Hydrocarbons in marine mollusks: biological effects and ecological consequences. In: U. Varanasi (Editor), *Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, pp. 291-328.

Najimi, S., Bouhaimi, A., Daubèze, M., Zekhnini, A., Pellerin, J., Narbonne, J-F., Moukrim, A., 1997. Use of Acetylcholinesterase in Perna perna and Mytilus galloprovincialis as a biomarker of pollution in Agadir marine bay (South of Morocco). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 58: 901-908.

Nasci, C., Campesan, V.U., Fossato, F., Dolci, F., Menetto, A., 1989. Hydrocarbon content and microsomal BPH and reductase activity in mussel, Mytilus sp., from the Venice area, North-East Italy. Mar. Environ. Res., 28: 109-112.

Nakamura, M. and Hayashi, T., 1994. One- and two-electron reduction of quinones by rat liver subcellular fractions. J. Biochem., 115: 1141-1147.

Penning, T.M., 1993. Dihydrodiol dehydrogenase and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism. Chem. Biol. Interact., 89: 1-34.

Pfau, W., 1997. DNA adducts in marine and freshwater fish as biomarkers of environmental contamination. Biomarkers., 2: 145-151.

Peters, L. D., Nasci, C., Livingstone, D.R., 1998. Variation in levels of cytochrome P4501A, 2B, 2E, 3A and 4A-immunopositive proteins in digestive gland of indigenous and transplanted mussel Mytilus galloprovincialis in Venice Lagoon, Italy. Mar. Environ. Res., 46: 295-299.

Porte, C., Solé, M., Albaigès, J., Livingstone, D.R., 1991. Responses of mixed-function oxygenase and antioxidase enzyme system of Mytilus sp to organic pollution. Comp. Biochem. Physiol., 100 C: 183-186.

Porte, C., Lemaire, P., Peters, L.D., Livingstone, D.R., 1995. Partial purification and properties of cytochrome P450 from digestive gland microsomes of the common mussel Mytilus sp. Mar. Environ. Res., 39: 21-26.

Ramakrishna, N.V.S., Gao, F., Padmavathi, N.S., Cavalieri, E.L., Rogan, E.G., Cerny, R.L., Gross, M.L., 1992. Model adducts of benzo[a]pyrene and nucleosides formed from its radical cation and diol epoxide. *Chem. Res. Toxicol.*, 5: 293-302.

Randerath, K., Reddy, M.V., Gupta, R.C., 1981. <sup>32</sup>P- postlabeling test for DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78: 6126-6129.

Reddy, M.V. and Randerath, K., 1986. Nuclease P1-mediated increase of sensitivity of <sup>32</sup>P- postlabelling test for structural diverse DNA adducts. *Carcinogen.*, 7: 1543-1551.

Ribera, D., Narbonne, J-F., Michel, X.R., Livingstone, D.R., O'Hara, S., 1991. Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100 C: 177-181.

Rogan, E.G., Devanesan, P.D., Ramakrishna, N.V.S., Higginbotham, S., Padmavathi, N.S., Chapman, K., Cavalieri, E.L., Jeong, H., Jankowiak, R., Small, G.J., 1993. Identification and quantitation of benzo(a)pyrene-DNA adducts formed in mouse skin. *Chem. Res. Toxicol.*, 6: 356-363.

Segura-Aguilar, J., Cremades, A., Liombart-Bosch, A., Monsalve, E., Ernster, L., Romero, F.J., 1994. Activity and immunochemistry of DT-diaphorase in hamster and human kidney tumours. *Carcinogen.*, 15: 1631-1636.

Shaw, G.R. and Connell, D. WT., 1994. Prediction and monitoring of the carcinogenicity of polycyclic aromatic compounds (PACs). *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 135: 1-62.

Shuel, H. and Shuel, A., 1967. Automated determination of protein in the absence of sucrose. *Anal. Biochem.*, 20: 86-93.



Sikka, H.C., Rutkowski, J.P., Kandaswami, C., Kumar, S., Earley, K., Gupta, R.C., 1990. Formation and persistence of DNA adducts in the liver of brown bullheads exposed to benzo[a]pyrene. *Cancer. Lett.*, 49: 81-87.

Sims, P., Grover, P.L., Swaisland, A., Pal, K., Hewer, A., 1974. Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol epoxide. *Nature.*, 252: 326-328.

Sims, P., 1981. The metabolic activation of some polycyclic hydrocarbons: the role of dihydrodiols and diol-epoxides. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 136 A: 487-500.

Sjörlin, A.M. and Livingstone, D.R., 1997. Redox cycling of aromatic hydrocarbon quinones catalyzed by digestive gland microsomes of the common mussel (*Mytilus edulis* L.). *Aquat. Toxicol.*, 38: 83-99.

Solé, M., Porte, C., Albaigès, J., 1995. Seasonal variation in the mixed- function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14: 157-164.

Solé, M., Porte, C., Biosca, X., 1996. Effects of the 'Aegean Sea' oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 113 C: 257-265.

Solé, M., Peters, L.D., Magnusson, K., Sjölin, A., Grammo, A., Livingstone, D.R., 1998. Responses of the cytochrome P450-dependent monooxygenase and other protective enzyme systems in digestive gland of transplanted common mussel (*Mytilus edulis* L.) to organic contaminants in the Skagerrak and Kattegat (North Sea). *Biomarkers.*, 3: 49-62.

Stack, D.E., Cremonesi, P., Hanson, A., Rogan, E.G., Cavalieri, E.L., 1995. Radical cations of benzo[a]pyrene and 6-substituted derivatives: reaction with nucleophiles and DNA. *Xenobiotica.*, 25: 755-760.

Stegeman, J.J., 1985. Benzo(a)pyrene oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel (Mytilus edulis) and other bivalve mollusk species from the Western North Atlantic. *Mar. Biol.*, 89: 21-30.

Stein, J.E., Reichert, W.L., French, B., Varanasi, B.U., 1993. <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of DNA adduct formation and persistence in English sole (Pleuronectes vetulus) exposed to benzo[a]pyrene and 7H-dibenzo[c, g]carbazole. *Chem. Biol. Interact.*, 88: 55-69.

Suteau, P. M. and Narbonne, J-F., 1988. Preliminary data on PAH metabolism in the marine mussel Mytilus galloprovincialis from Arcachon Bay, France. *Mar. Biol.*, 98: 421-425.

Van der Oost, R., Van Schooten, F-J., Ariese, F., Heida, H., Satumalay, K. Vermaulen, N.P.E., 1994. Bioaccumulation, biotransformation and DNA binding of PAHs in feral eel (Anguilla anguilla) exposed to polluted sediments: a field survey. *Env. Toxicol. Chem.*, 13: 859-870.

Van Ommen, B., Ploemen, J. H., Bogaards, J. J., Monks, T. J., Gau, S. S., Van Bladeren, P. J., 1991. Irreversible inhibition of rat glutathione S-transferase 1-1 by quinones and their glutathione conjugates. Structure-activity relationship and mechanism. *Biochem. J.*, 15: 661-666.

Venier, P. and Canova, S., 1996a. Formation of DNA adducts in the gill tissue of Mytilus galloprovincialis treated with benzo(a)pyrene. *Aquat. Toxicol.*, 34: 119-133.

Venier, P., Canova, S., Levis, A.G., 1996b. DNA adducts in Mytilus galloprovincialis and Zosterisessor ophiocephalus collected from PAC-polluted and reference sites of the Venice Lagoon. *Poly. Arom. Comp.*, 11: 67-73.

Wootton, A.N., Herring, C., Spry, J.A., Wiseman, A., Livingstone, D.R., Goldfarb, P.S., 1995. Evidence for the existence of cytochrome P450 gene families (CYP1A, 3A, 4A, 11A) and modulation of gene expression (CYP1A) in the mussel Mytilus sp. Mar. Environ. Res., 39: 21-26.

Table 1. Correlation matrix of enzymatic biomarkers and B[a]P concentration data of both assay and control groups.

	<b>DTD</b>	<b>AChE</b>	<b>CAT</b>	<b>GST G<sup>1</sup></b>	<b>GST DG<sup>1</sup></b>	<b>BPH</b>	<b>P450<sup>2</sup></b>	<b>B[a]P<sup>3</sup></b>
<b>DTD</b>	1	0.27*	-0.07	0.02	0.04	-0.22	0.27*	-0.40*
<b>AChE</b>		1	-0.39**	-0.01	-0.35**	-0.38**	0.06	-0.52***
<b>CAT</b>			1	0.33*	0.60***	0.29*	-0.01	0.53***
<b>GST G</b>				1	0.27*	0.02	-0.13	0.27
<b>GST DG</b>					1	0.28	0.23	0.32*
<b>BPH</b>						1	0.10	0.50***
<b>P450<sup>3</sup></b>							1	-0.16
<b>B[a]P<sup>2</sup></b>								1

<sup>1</sup>G: Gills, DG: Digestive gland. <sup>2</sup>P450: immunopositive protein titration. <sup>3</sup>B[a]P: B[a]P concentration mg/kg d. w. \*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01, \*\*\*: p < 0.001.

Table 2. Correlation coefficients between adduct levels and B[a]P concentration and enzymatic activity data of both control and assay groups

	<b>Adduct 1</b>	<b>Adduct 2</b>	<b>Total adducts</b>
<b>DTD</b>	-0.40**	-0.35**	-0.39**
<b>AChE</b>	-0.47***	-0.46***	-0.47***
<b>CAT</b>	0.44***	0.50***	0.47***
<b>GST G<sup>1</sup></b>	0.08	0.13	0.10
<b>GST DG<sup>1</sup></b>	0.25	0.25	0.26
<b>B[a]P<sup>2</sup></b>	0.81***	0.79***	0.81***
<b>BPH</b>	0.64***	0.55***	0.61***
<b>P450<sup>3</sup></b>	-0.10	-0.07	-0.09
<b>Adduct 1</b>	1	0.93***	0.99***
<b>Adduct 2</b>		1	0.98***
<b>Total adducts</b>			1

<sup>1</sup>G: Gills, DG: Digestive gland. <sup>2</sup>B[a]P: B[a]P concentration mg/kg d. w. mussel.

<sup>3</sup>: P450 immunopositive protein titration.

Table 3. Inter-comparison study of DNA adduct formation in mussel digestive gland following B[a]P exposure in mesocosm.

Conditions of exposure	Present work	Canova et al., 1998
Way of exposure	trophic intake	Water column
B[a]P Dose/concentration	50 mg/kg d. w./day	1000 ppb <sup>1</sup>
Exposure	Static, daily renewal of water	Water renewed 3 time a day
Duration	28 days	48 hours <sup>1</sup>
B[a]P concentration in whole mussel	116 µg/g w.w.	339.3 µg/g w.w. <sup>2</sup>
DNA adduct level (RAL x 10 <sup>8</sup> )	0.269 ± 0.082	0.287 ± 0.106

<sup>1</sup>: among the doses and exposure times tested in this study, the conditions selected are that leading to the DNA adduct level the more similar to our result. <sup>2</sup>: resulting from the addition of the B[a]P concentrations measured in the digestive gland, in the gills and in the rest.

Figure captions.

Fig. 1. Kinetics of B[a]P bioconcentration in exposed mussels. Concentrations recorded in control mussels, closed to 0, are represented by the bold line on the abscissa axis. At each point, the standard deviation value is calculated from the duplicate measurement of a unique sample.

Fig. 2. Effect of B[a]P exposure on mean BPH activity of mussel digestive gland.

Fig.3. Effect of B[a]P exposure on mean GST activity of mussel gills.

Fig. 4. Effect of B[a]P exposure on mean DTD activity of mussel digestive gland.

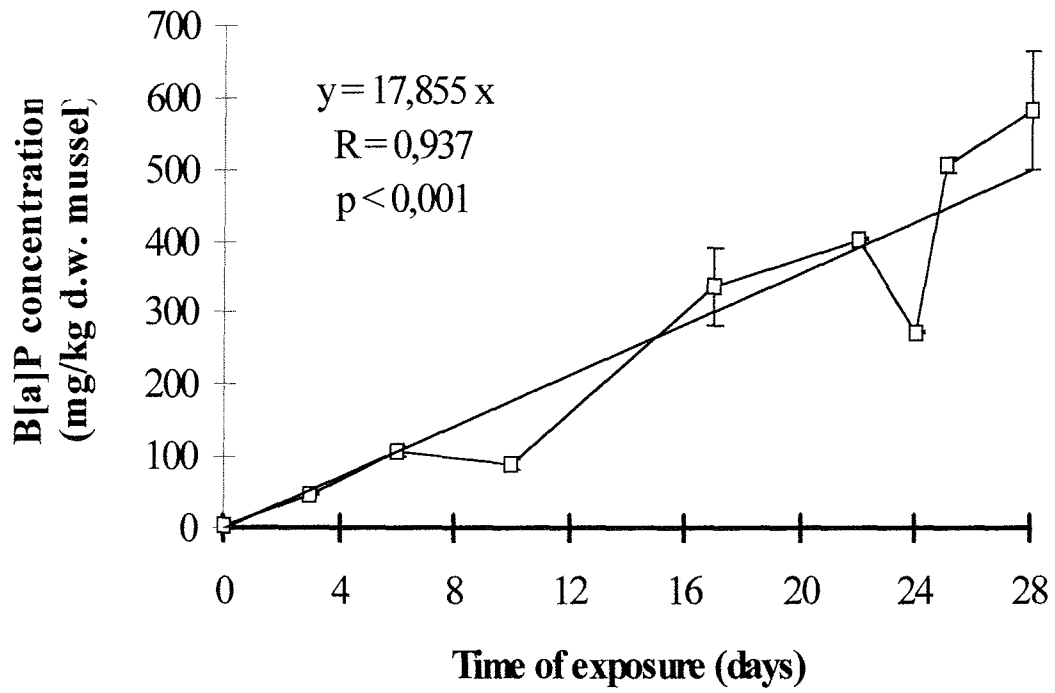
Fig. 5. Effect of B[a]P exposure on mean ACHE activity of mussel gills.

Fig.6. Effect of B[a]P exposure on mean CAT activity of mussel digestive gland.

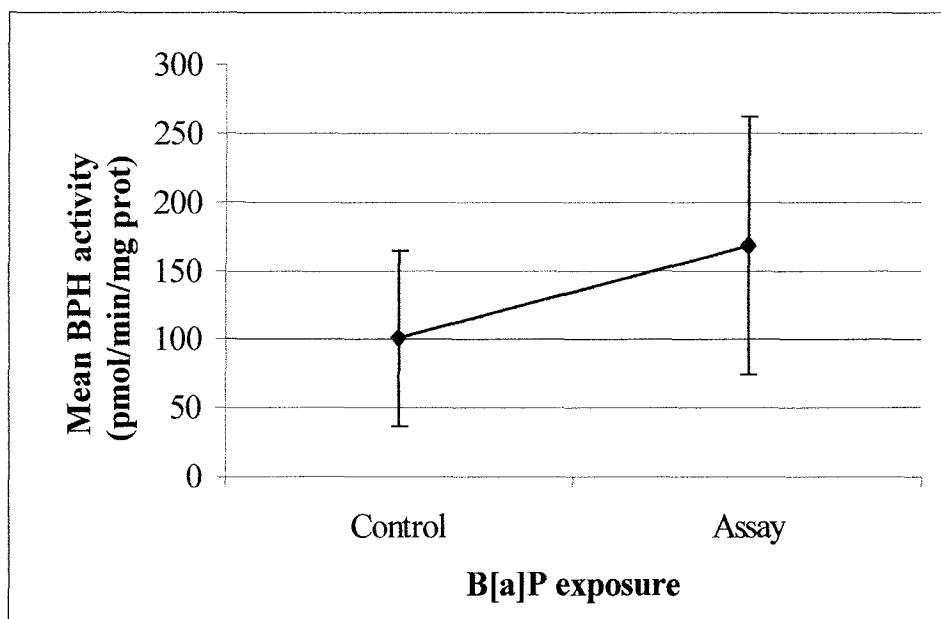
Fig. 7. Representative autoradiograph of the induced B[a]P-related DNA adducts in mussel digestive gland.

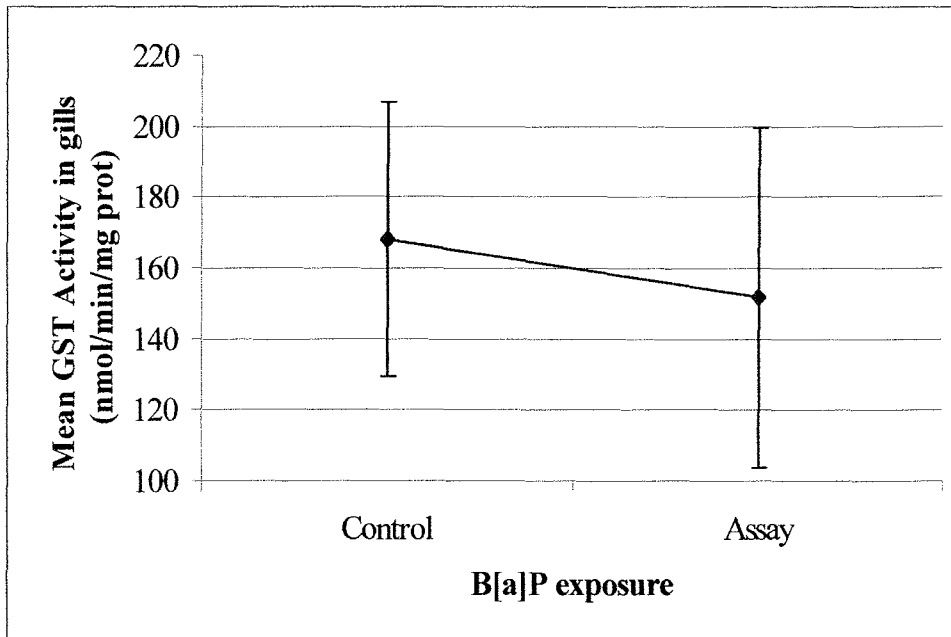
Fig. 8. Time-course study of DNA adduct formation with B[a]P exposure in mussel digestive gland. Analysis by conduction of an one-way ANOVA on log transformed data. □ (adduct 2), # (adduct 1), \* (total adducts): significant at  $p < 0.05$ .

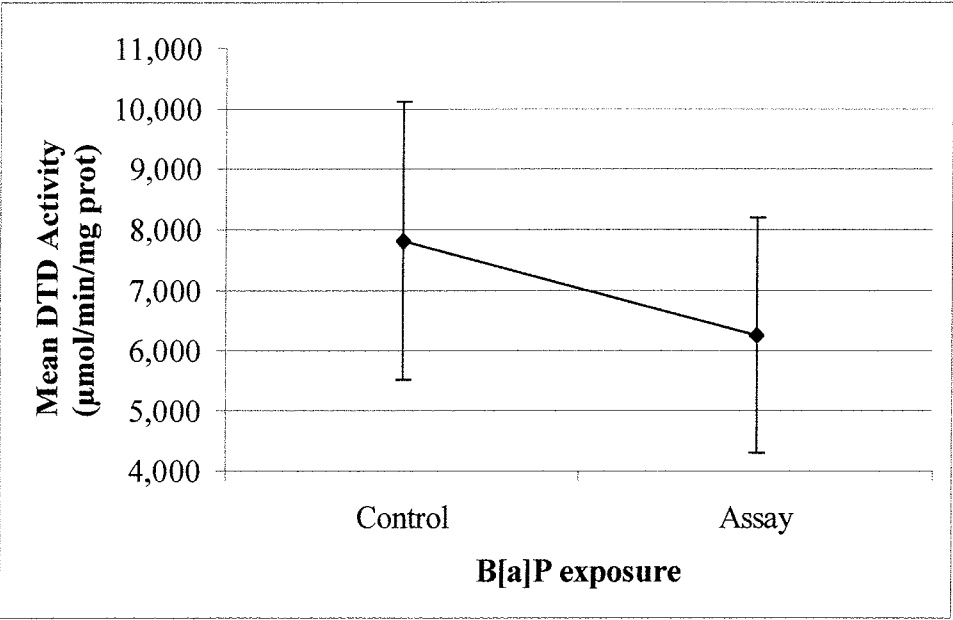
### Kinetics of B[a]P bioaccumulation in the exposed mussels

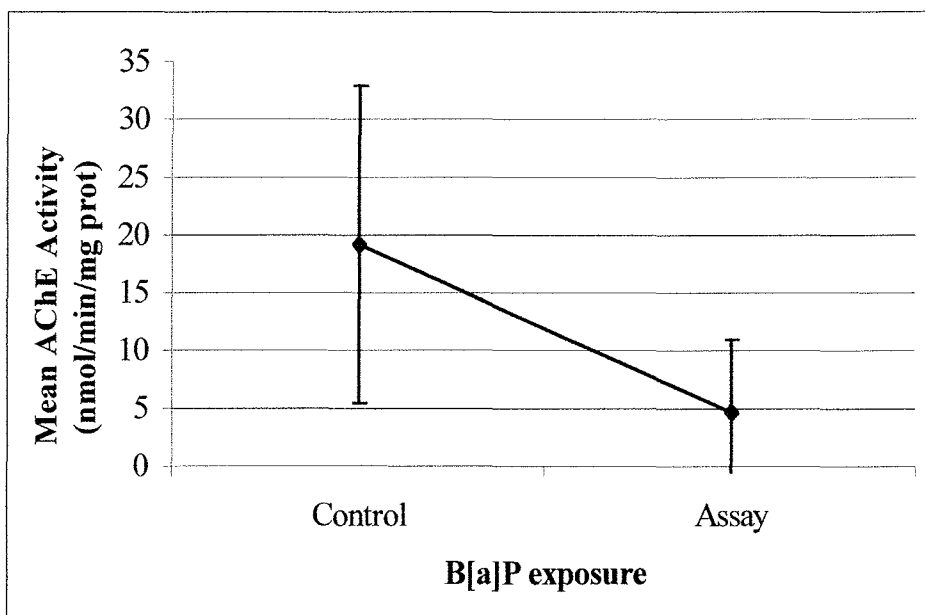


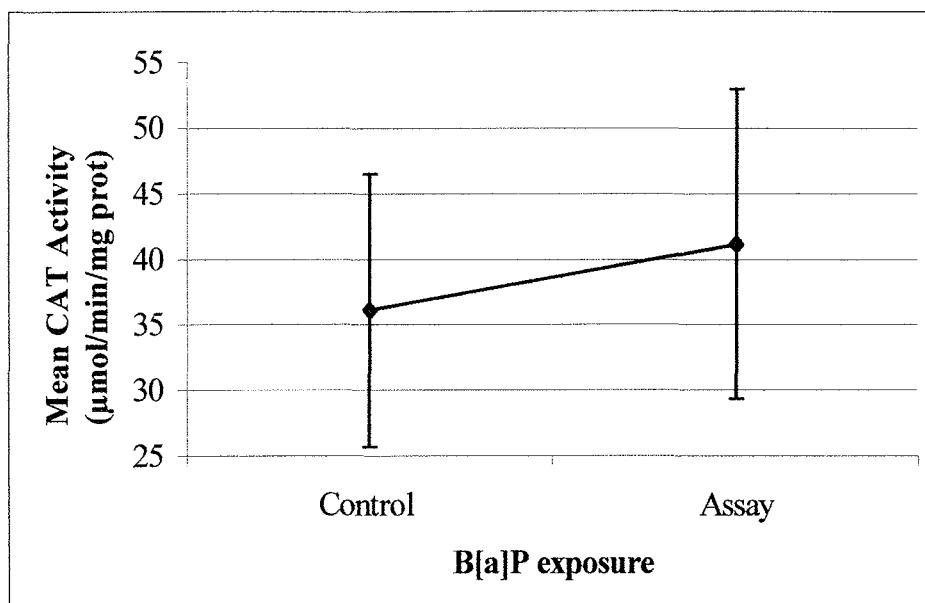


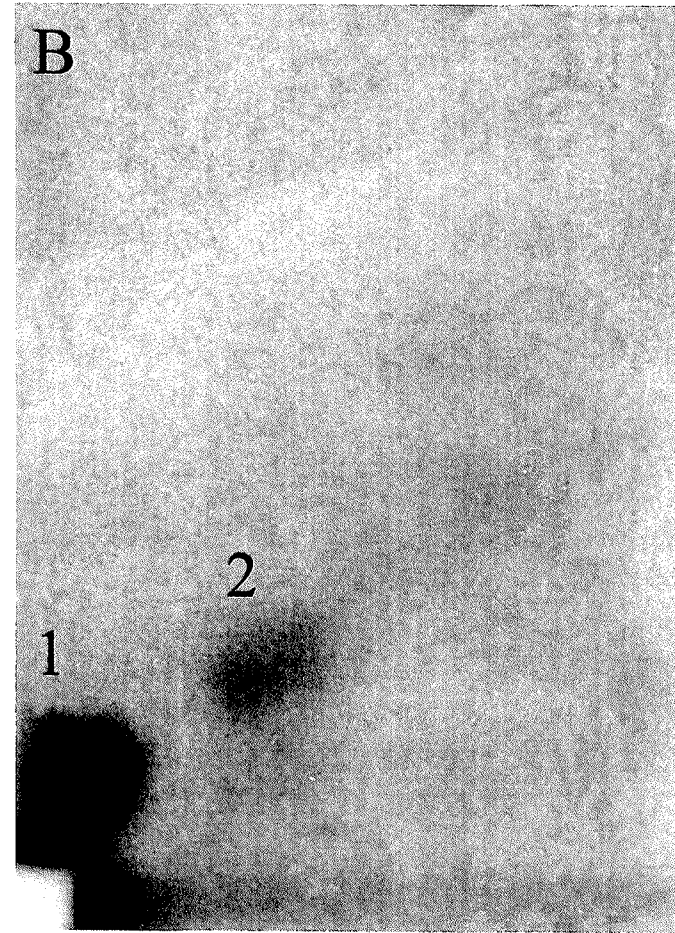
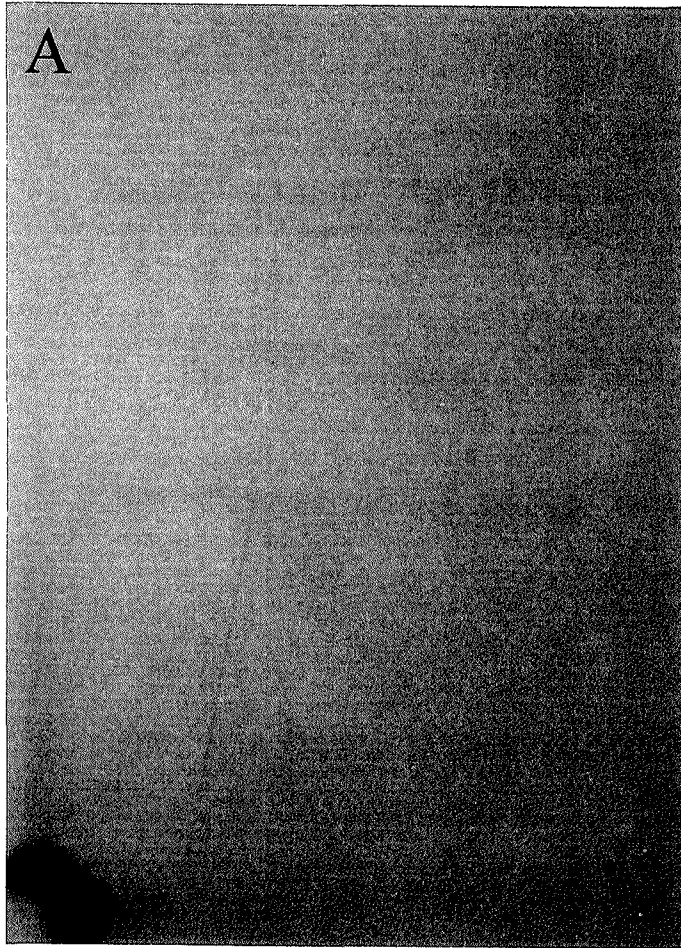




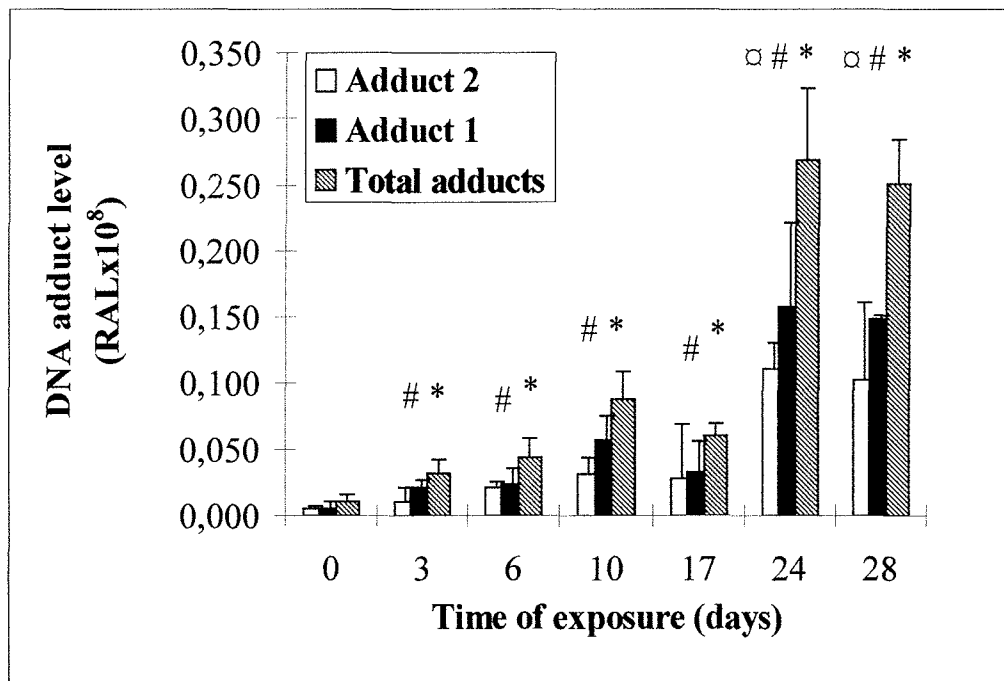








A: Typical autoradiograph of digestive gland DNA of control mussels. B: Typical autoradiograph of digestive gland DNA of B[a]P-exposed mussels at the end of the 28-day of exposure. 1: adduct 1 recorded from day 10 of exposure. 2: adduct 2 observed from day 24 of exposure.







## **CHAPITRE 3**

**Induction de la 8-oxodGuo et d'adduits à l'ADN de branchies de moule après exposition au B[a]P : mesure par CLHP-DE et post-marquage au  $^{32}\text{P}$**



## I. Objectifs du travail

Après avoir observé l'induction d'adduits du B[a]P dans la glande digestive de moule, nous avons recherché la présence d'adduits à l'ADN dans les branchies de ces mêmes animaux. La glande digestive et les branchies présentant un équilibre différent entre les activités métaboliques de phase I (activités de biotransformation) et de phase II (activités de conjugaison), la comparaison des niveaux d'adduits mesurés dans ces deux tissus peut en effet permettre de mieux cerner le rôle des différents paramètres biochimiques impliqués dans l'activation du B[a]P chez la moule. Cette comparaison peut également permettre l'identification d'un tissu cible en terme de sensibilité à la formation d'adduits à l'ADN.

Dans l'expérience précédente, l'observation, chez les animaux exposés, de changements significatifs dans les activités catalase et DT-diaphorase peut indiquer une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) chez la moule. Les ERO étant directement impliqués dans la formation de 8-oxodGuo, l'induction de ce type de dommages oxydatifs à l'ADN pouvait être suspectée. De ce fait, le niveau de 8-oxodGuo des échantillons de branchies a donc été également déterminé par CLHP-DE.

## II. Matériel et Méthode

L'ensemble des informations relatives au travail effectué est présenté dans l'article 3. On peut noter ici que suite aux valeurs de 8-oxodGuo obtenues, un travail méthodologique sur la mesure de cette lésion oxydative à l'ADN a été réalisé et présenté dans cet article.

Pour complément d'information, un profil chromatographique type de la 8-oxodGuo et des différentes bases de l'ADN est présenté figure 33.

## III. Résultats :

L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'article 3 suivant :

**F. Akcha, S. Ruiz, C. Zamperon, P. Venier, T. Burgeot, J. Cadet, J. F. Narbonne. Benzo[a]pyrene-induced DNA damage in *Mytilus galloprovincialis*. Measurement of bulky DNA adducts and DNA oxidative damage in term of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Soumis pour publication dans Biomarkers.***

### Résumé :

La formation d'adduits à l'ADN et de 8-oxodGuo a été respectivement mesurée dans des branchies de moules exposées au B[a]P (50 mg/kg p. s./jour) par la technique de post-marquage au <sup>32</sup>P et par CLHP/DE. L'évolution au cours du temps de ces deux biomarqueurs fut étudiée et leur utilisation potentielle pour la biosurveillance de l'environnement marin discutée pour la présente espèce sentinelle. Dans les branchies, une corrélation positive entre le niveau d'adduits du B[a]P à l'ADN et la concentration en B[a]P de la moule entière a été ainsi démontrée, le niveau d'adduits étant directement dépendant du temps d'exposition. La comparaison des niveaux d'adduits mesurés dans les branchies ( $0,149 \pm 0,079$  à  $0,480 \pm$

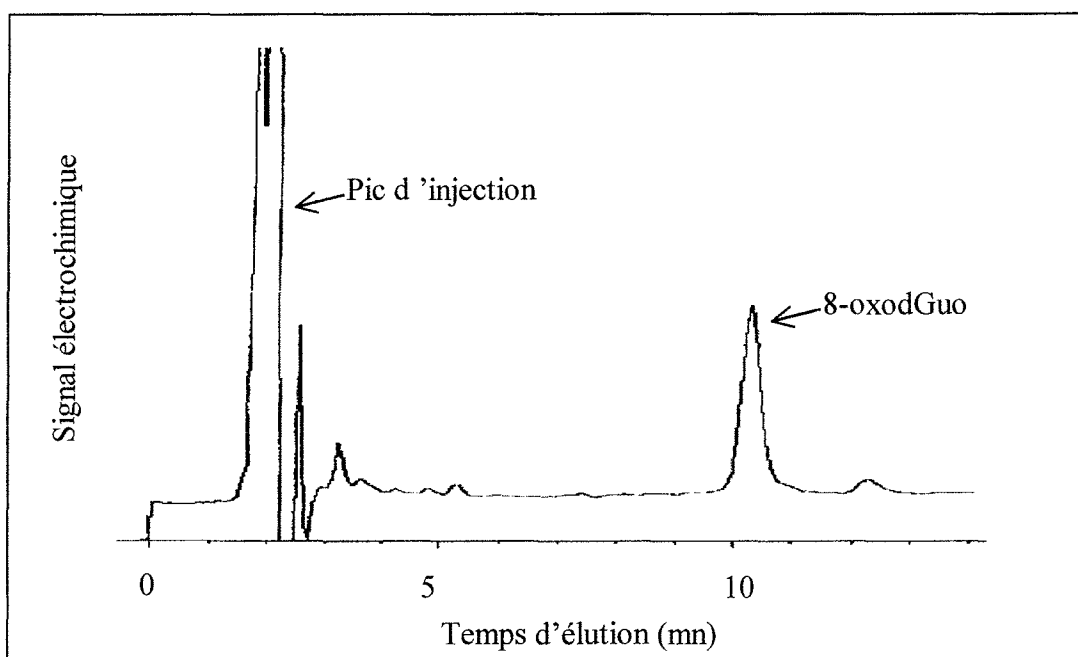
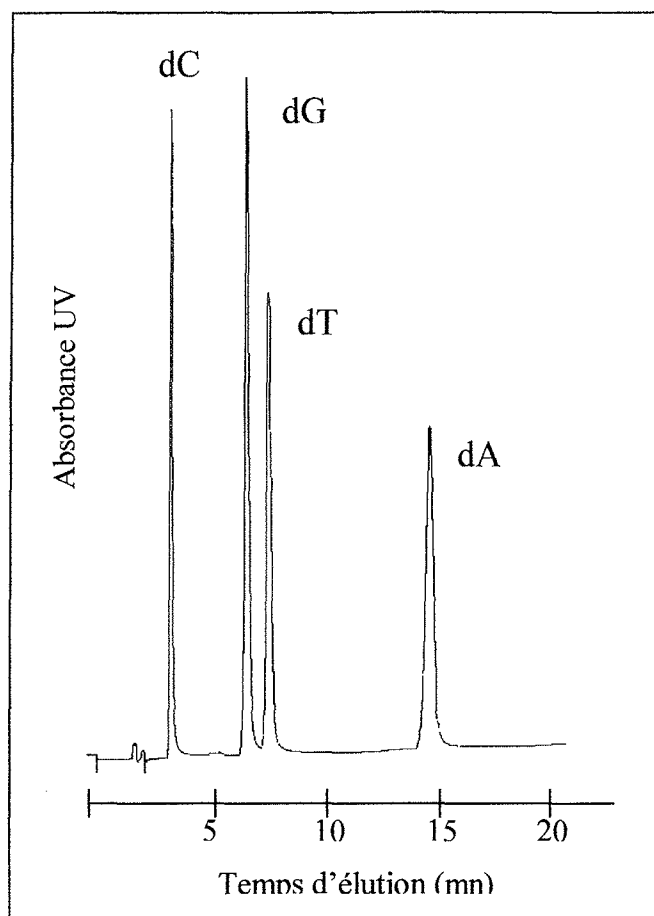


Figure 33 : Profil chromatographique type des différentes bases de l'ADN et de la 8-oxodGuo. Séparation sur pré-colonne Supelguard LC-18-S (Supelco, 20 x 4 mm) et colonne Satisfaction C8+ (CIL Cluzeau, 15 x 4.6 mm). Elution en mode isocratique (méthanol 10%, acide citrique 10 mM, acétate de sodium 25 mM, hydroxyde de sodium 30 mM, acide acétique 10mM).

0,139 adduit/10<sup>8</sup> dNps) avec ceux déjà obtenus dans la glande digestive de ces même animaux (0,010 ± 0,005 à 0,251 ± 0,062 adduit/10<sup>8</sup> dNps) a mis en évidence des niveaux d'adduits du B[a]P plus élevés dans les branchies. Les branchies apparaissant plus sensibles que la glande digestive aux effets du B[a]P, l'application de la technique de post-marquage au <sup>32</sup>P dans ce tissu pourrait permettre une détection plus précoce des effets génotoxiques des polluants.

Aucune augmentation du niveau de 8-oxodGuo avec l'exposition au B[a]P n'a été observée dans les branchies. Cette absence d'effet peut être expliquée par une oxydation artéfactuelle de l'ADN lors de la préparation des échantillons. Par une augmentation du bruit de fond et donc une surestimation des mesures, ces artéfacts peuvent en effet être défavorables à l'observation des dommages oxydatifs présumés de l'exposition au B[a]P. Les résultats d'un travail méthodologique ont clairement mis en évidence un effet du protocole d'extraction de l'ADN sur la mesure de la 8-oxodGuo. Alors qu'aucune différence dans les niveaux de 8-oxodGuo n'a été observée entre les protocoles d'extraction au Sevag et au phénol/chloroforme de l'ADN de glande digestive (34.8 ± 9.3 et 25.6 ± 4.8 8-oxodGuo/10<sup>5</sup> dGuo) et de branchies (6.6 ± 0.8 et 7.3 ± 2.4 8-oxodGuo/10<sup>5</sup> dGuo), la méthode chaotrope a permis la mesure de niveaux significativement plus faibles dans ces deux tissus (8.30 ± 2.03 et 4.8 ± 1.1 8-oxodGuo/10<sup>5</sup> dGuo respectivement).

**Article numéro 3 :**

**F. Akcha, S. Ruiz, C. Zamperon, P. Venier, T. Burgeot, J. Cadet, J. F. Narbonne (1999). Benzo[a]pyrene-induced DNA damage in *Mytilus galloprovincialis*. Measurement of bulky DNA adducts and DNA oxidative damage in term of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Soumis pour publication dans Biomarkers.***

**Benzo[a]pyrene-induced DNA damage in *Mytilus galloprovincialis*. Measurement of bulky DNA adducts and DNA oxidative damage in term of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine.**

F. Akcha†\*, S. Ruiz†, C. Zamperon‡, P. Venier‡, T. Burgeot‡, J. Cadetφ, J. F. Narbonne†

†Laboratoire de Physico- et Toxicochimie des Systèmes Naturels, UPRESA 5472 CNRS, Université de Bordeaux I, Avenue des Facultés, 33405 Talence, France. *e-mail* : [f.akcha@lptc.u-bordeaux.fr](mailto:f.akcha@lptc.u-bordeaux.fr), [jf.narbonne@lptc.u-bordeaux.fr](mailto:jf.narbonne@lptc.u-bordeaux.fr)

‡IFREMER, Laboratoire des Polluants chimiques, Rue de l'Île d'Yeu, 44300 Nantes cedex, France. *e-mail* : [Thierry.Burgeot@ifremer.fr](mailto:Thierry.Burgeot@ifremer.fr)

‡University of Padova, Department of Biology, via Bassi 58/B, Padova, Italy. *e-mail* : [zampi@civ.bio.unipd.it](mailto:zampi@civ.bio.unipd.it), [venier@civ.bio.unipd.it](mailto:venier@civ.bio.unipd.it)

φDépartement de Recherche Fondamentale sur la Matière Condensée, SCIB, Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques, Centre d'Energie Atomique, 17 Rue des Martyrs, F-38054 Grenoble cedex 9, France. *e-mail*: [cadet@drfmc.ceng.cea.fr](mailto:cadet@drfmc.ceng.cea.fr)

**DNA adduct and 8-oxodGuo in B[a]P-exposed mussels**

Bulky DNA adducts and 8-oxodGuo were measured in gill DNA of B[a]P-exposed mussels (50 mg/kg d. w./day), respectively by the  $^{32}\text{P}$  post-labeling technique and the HPLC/ECD assay. A time-course study was performed for both biomarkers and their potential use for marine biomonitoring discussed for the sentinel species studied. In gills, B[a]P-related DNA adducts were positively correlated with B[a]P concentration in whole mussel, and were produced in a time-dependent manner relative to exposure. Comparison of adduct levels recorded in this paper in gills ( $0.149 \pm 0.079$  to  $0.480 \pm 0.139$  RAL) with previous measures carried out in the digestive gland of the same animals ( $0.010 \pm 0.005$  to  $0.251 \pm 0.062$  RAL), showed higher levels in the former tissue. As gills appeared more sensitive to B[a]P effects than the digestive gland, applying the post-labeling technique in gill DNA may allow an earlier detection of pollutant genotoxic effects. No increase in the level of 8-oxodGuo by B[a]P exposure was recorded in gill DNA, probably due to artefactual oxidation during sample processing that could have masked the presumed B[a]P oxidative damage. A methodological study clearly demonstrated the effect of DNA extraction procedure on 8-oxodGuo measurement. No difference in 8-oxodGuo levels was observed between the SEVAG and the phenol/chloroform DNA extraction protocols for digestive gland ( $34.8 \pm 9.3$  and  $25.6 \pm 4.8$  8-oxodGuo/10e5 dGuo) and gill ( $6.6 \pm 0.8$  and  $7.3 \pm 2.4$  8-oxodGuo/10e5 dGuo) tissues, whereas by the chaotropic method lower 8-oxodGuo levels were measured for both tissue ( $8.30 \pm 2.03$  and  $4.8 \pm 1.1$  8-oxodGuo/10e5 dGuo respectively).

*Keywords:* *Mytilus galloprovincialis*, Benzo[a]pyrene, adducts, 8-oxodGuo.

*Abbreviations:* B[a]P, benzo[a]pyrene, PAH, polycyclic aromatic hydrocarbon, ROS, reactive oxygen species, 8-oxodGuo, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, 8-oxoGua, 8-oxo-7,8-dihydroguanine, 8-oxoAde, 8-oxo-7,8-dihydroadenine, 5OHCyt, 5-hydroxycytosine, RAL, relative adduct labeling, MFO, mixed-function oxygenase, CAT, catalase, NAD(P)H,  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form, NADH,  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide reduced form.



## Introduction

Marine pollution by petroleum and its derivatives is of great environmental concern as annual inputs are estimated in the range of million tons per year for the global ocean, with around 28% infesting highly productive coastal waters (UNEP 1990). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are widely studied crude oil components known for their bioconcentration and biomagnification in aquatic organisms, especially bivalves (Botello *et al.* 1997, Moy and Walday 1996, Neff 1984). In exposed animals, several deleterious effects have already been identified, at different levels of biological organization, as a pollution-mediated toxicity of this predominant class of pollutants (Peters *et al.* 1998, Solé *et al.* 1996, Bolognesi *et al.* 1996, Gardner *et al.* 1992, Lowe and Pipe 1986). The development of the biomarker concept at the beginning of the eighties – molecular, biochemical, histological or physiological alterations in organisms susceptible to be used for the assessment of either pollutant exposure within their environment or pollution-induced effects (Michel *et al.* 1998) – has led to an important increase in the number of studies carried out in environmental toxicology. Because of its bioecological particularities, *Mytilus sp.* is an organism of choice for the marine environment biomonitoring (Viarengo and Canesi 1991, Ostapczuk *et al.* 1997), and many pollution biomarkers have already been proposed for this sentinel species.

Promising results for PAH-DNA adduct formation in human and vertebrates motivated the investigations on this type of DNA damage as a possible biomarker for coastal water biomonitoring. As PAH model in chemical carcinogenesis studies (Phillips 1983), Benzo[a]pyrene (B[a]P) metabolic activation to DNA adducts is well documented in vertebrates. Different pathways of DNA adduct formation have been identified (Sims *et al.* 1974, Conney 1982, Cavalieri *et al.* 1988, 1990, Cavalieri and Rogan 1995, Flesher *et al.* 1990, Flesher and Myers 1991, Stansbury *et al.* 1994), particularly the diol-epoxide one (Grover 1986). Following oxidation by P450-dependent monooxygenases and hydration by epoxide hydrolase, B[a]P is biotransformed into B[a]P *trans*-dihydrodiols. The latter metabolites can be subjected to P450 oxidation, leading to highly reactive B[a]P diol-epoxides that can covalently bind to DNA to produce bulky aromatic DNA adducts. The major stable adduct formed by this pathway results from *trans* addition of (+)-anti-B(a)P-*trans*-7,8-dihydrodiol-9,10 epoxide to the exocyclic N<sup>2</sup> amino group of guanine. PAH-DNA adducts have been extensively studied by the highly sensitive <sup>32</sup>P post-labeling technique (Gupta *et al.* 1982, Randerath *et al.* 1988, 1989). The formation of persistent B[a]P-DNA adducts in target tissues has been shown to be closely related to cancer development in humans and rodents (Smith *et al.* 1993, Culp *et al.* 1996, Lee

*et al.* 1998). As DNA adducts are responsible of base pair substitutions and frameshift mutations (Loechler 1995, De Vries *et al.* 1997), they are thought to be involved in the initiation of the multi-stage cancer process by inducing mutations in the p53 tumor-suppressor gene (Wolterbeek *et al.* 1995, Quan and States 1996) and in the *ras* proto-oncogene (Stern *et al.* 1993, Chaturvedi and Lakshman 1996). As the formation of DNA adducts involves toxicokinetic parameters such as absorption, tissue distribution, metabolism, detoxification and DNA repair, they may be a powerful molecular dosimeter for genotoxic compound exposure and cancer risk assessment (La and Swenberg 1996).

Among the types of DNA damage induced by pollutant exposure, oxygen radical injury would appear to be highly relevant for environmental biomonitoring. This damage results from the production of reactive oxygen species (ROS) that can react directly or indirectly with DNA, causing base modifications, apurinic/apyrimidinic site formation, DNA strand breaks and protein-DNA crosslinks. ROS are endogenously produced by cellular metabolism as well as by exogenous sources such as chemical carcinogen exposure (Li and Trush 1995, Kim and Lee 1997). Reactive oxygen species include singlet oxygen ( $O_2$ ), the superoxide anion radical ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and the highly reactive hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ). Base modifications have been widely studied, particularly the prevalent 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) that is the main oxidation product of the reaction of singlet oxygen and hydroxyl radical with DNA (Ravanat and Cadet 1995, Cadet *et al.* 1997a). It has been determined that ROS play a role in carcinogenesis, mutagenesis and aging processes (Halliwell and Cross 1994, Wang *et al.* 1995, Wiseman *et al.* 1995, Klaunig *et al.* 1998). Like bulky adducts, they can affect the expression of several genes either by modification of the DNA methylation pattern or by mutations in proto-oncogenes and tumor suppressor genes (Cerda and Weitzman 1997). Different analytical methods have been developed to measure oxidized DNA base levels. In this respect, the accurate High Performance Liquid Chromatography coupled to electrochemical detection (HPLC/ECD) has received numerous applications for the measurement of 8-oxodGuo (Floyd *et al.* 1986).

In the present paper, bulky DNA adducts and 8-oxodGuo were measured in gill tissue from benzo[a]pyrene-contaminated mussels using the  $^{32}P$  post-labeling technique and the HPLC/ECD assay respectively. A time-course study was performed for both biomarkers, and their potential use in coastal biomonitoring was considered for the sentinel species studied. Mussels were exposed according to a model previously used for DNA adduct study (Akcha *et al.* 1999). Enzymatic biomarker measurements relative to DNA adduct levels in the digestive

gland and B[a]P bioaccumulation for mussels studied in this experiment have been reported elsewhere (Akcha *et al.*, *in press*). Results reported in the present paper in gills were so enlightened by these previous findings. 8-oxodGuo levels were measured in mussel gills, and a methodological study was carried out in collaboration with the Laboratory of Pr J. Cadet (Grenoble, France). Three different DNA extraction protocols were applied to gill and digestive gland tissue to determine the effect of the DNA extraction procedure on 8-oxodGuo measurement. In fact, artefactual DNA oxidation can lead to an overestimation of oxidized base levels, complicating interstudy comparisons and the detection of ROS effects. As phenol has been pointed out as a causative agent of artefactual oxidation, a phenol- and a non-phenol-based protocol were tested as well as the promising chaotropic method (Helbock *et al.* 1998). The comparison of 8-oxodGuo levels measured by each protocol enabled us to improve the proposed HPLC/ECD assay for 8-oxodGuo measurement in mussels.

## Materials and methods

### *Chemicals*

<sup>32</sup>P-Post-labeling reagents: RNase A, rat spleen phosphodiesterase, micrococcal nuclease, and potato apyrase were purchased from Sigma-Aldrich Chemical. RNase T1, Nuclease P1, proteinase K and T4 polynucleotide kinase were bought from Roche Molecular Biochemicals. [ $\gamma^{32}$ ] ATP (specific activity of > 5,000 Ci/ mmol) and Hyperfilm MP were purchased from Amersham Pharmacia Biotech. <sup>3</sup>H-*anti*-( $\pm$ )-*trans*-7,8-dihydroxy-*anti*-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene (<sup>3</sup>H-BPDE) was from NCI, Chemical Carcinogen Standard Repository, Bethesda, MD. Polyethylenimine cellulose TLC plates were from Macherey-Nagel. Kodak XAR-5 films were purchased from Eastman Kodak.

HPLC/ECD reagents: RNase A, Proteinase K, protease, 2'-deoxycytidine (dCyd), 2'-deoxyguanosine (dGuo), 2'-deoxyadenosine (dAdo), thymidine (dThd), 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo), alkaline phosphatase, sodium iodide, SEVAG (chloroform: isoamyl alcohol, 24: 1), chloroform, isopropanol alcohol and deferoxamine mesylate were purchased from Sigma-Aldrich Chemical. Nuclease P1 and RNase T1 were from Roche Molecular Biochemicals and HPLC grade methanol from Riedel-de-Haën AG.

All other reagents were of analytical grade. Marine Liquifry was obtained from Interpet.

### *Animal treatment*

*Mytilus galloprovincialis* individuals were rope-growing mussels originating from Thau Bay (Etablissement Archimbaud, Bouzigues, France). After explantation from their natural environment, they were kept in 35% seawater filled glass aquariums. Water was directly pumped from the Bay of Arcachon (Atlantic Ocean, France) and oxygenated by a continuous air-bubbler system. Water (1.5 l per individual) was renewed daily, and each sampled animal was systematically replaced to maintain a constant load in the aquarium. Temperature was 16-17°C during the experiment. Each individual was fed daily with 28 mg equivalent d. w. of Marine Liquifry, a commercial nutritive solution for marine invertebrates. A peristaltic pump was used 8 h a day to bring feed into the aquariums.

Animals were contaminated with benzo[a]pyrene via their food supply at a daily individual dose of 50 mg/kg d.w. mussel. This dose corresponds to the total PAH concentration recorded in whole mussels from the highest contaminated sites of the French Biomonitoring Networks RNO (Claisse *et al.* 1992).

Mussels were exposed for 28 days after an acclimatization period of 4 days. Sampling was performed in both control and assay aquariums at day 0, 3, 6, 10, 17, 24 and 28. Four pools of 10 individual gills were collected each time for bulky DNA adduct analysis and 8-oxodGuo measurement. Samples were stored at -80°C prior to analysis.

### *DNA extraction*

DNA was isolated in the same way for bulky DNA adduct and 8-oxodGuo analysis. The protocol used was a slightly modified version of that of Venier and Canova (1996). Each sample was homogenized in 1 mM EDTA/0.5 % SDS (10 ml per g of tissue). A 1 ml aliquot was briefly centrifuged at 500g for 30 s at 4°C and 500 µl supernatant were recovered. Samples were digested with a total amount of 600 µg RNase A, 1000 U RNase T1 and 10 µg α-amylase for 45 min at 37°C. Protein digestion was carried out by incubation at 37°C for 2 h with 200 µg proteinase K. RNA and protein digestions were performed in two stages by adding half of the enzyme amount at mid-incubation. Following adjustment of SDS concentration to 1%, samples were heated for 10 min at 60°C with 125 µl of 5 M sodium perchlorate. DNA was extracted once with 700 µl of SEVAG. After 30 min of mild shaking at room temperature, samples were centrifuged at 14,000 rpm for 15 min at 4°C. The aqueous phase was recovered and precipitated overnight in 2 vol. of glacial absolute ethanol. DNA pellets were recovered after centrifugation at 14,000 rpm for 20 min at 4°C and precipitated in ethanol (1 vol.) once

more after the addition of 50  $\mu$ l of 2.5 M sodium acetate. Each DNA pellet was dried with a Speedvac (Savant Bioblock Scientific) and resuspended in 400  $\mu$ l sterile MilliQ water. DNA titration was performed by UV spectrophotometry at 260, 280 and 230 nm (260/280 ratio was  $1.8 \pm 0.5$  and 260/230 ratio around 2). Samples were stored below 20°C prior to analysis.

#### *<sup>32</sup>P-postlabeling assay*

DNA samples were precipitated as indicated above and resuspended in 2 mM Tris-HCl, pH 7.5, to reach a final concentration of 2  $\mu$ g DNA/ $\mu$ l. DNA (5  $\mu$ g) was then hydrolyzed to 3'-monophosphate deoxyribonucleosides (dNPs) by addition of 1.6 U micrococcal nuclease and 0.015 U spleen phosphodiesterase in 100 mM sodium succinate, 50 mM calcium chloride, pH 6 and incubation for 3.5 h at 37°C. Normal dNPs were dephosphorylated by addition of 1.9  $\mu$ g nuclease P1 in 30 mM zinc chloride, 0.25 M sodium succinate, pH 5 and incubation for 30 min at 37°C. Reaction was stopped with 2.5  $\mu$ l 0.5 M Tris-HCl, pH 9. Adducted dNPs were labeled by incubation for 40 min at 37°C with [ $\gamma$ <sup>32</sup>]ATP (2  $\mu$ l/sample) and kinase T4 (2.5 U/sample) in 10 mM bicine, pH 9.5, 10 mM magnesium chloride, 10 mM dithiothreitol, 1 mM spermidine. The <sup>32</sup>P-ATP excess was then hydrolyzed by incubation with 0.05 U potato apyrase for 40 min at 37°C.

Thin layer chromatography was conducted on polyethylenimine plates in the following buffers: D1 1M sodium phosphate pH 6.8; D2 5.3 M lithium formate, 8.5 M urea, pH 3.5; D3 1.2 M lithium chloride, 0.5 M Tris-HCl, 8.5 M urea, pH 8; D4 1.7 M sodium phosphate, pH 6. Autoradiography of the TLC plates allowed a qualitative analysis of the bulky B[a]P-related DNA adducts of each sample. Quantification of the radioactive spots was carried out by Cerenkov counting of blank and radioactive areas. Results are expressed in RAL (relative adduct labeling), *i.e.* adducts/10<sup>8</sup> normal nucleotides. Because the assay is time-consuming and expensive, DNA adduct levels were assessed in control animals only at day 0 and 28.

#### *HPLC/ECD assay*

HPLC/ECD assay was conducted according to the protocol of Melamede *et al.* (1996). Each DNA sample was reprecipitated and resuspended in Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8, to reach a final concentration of 1  $\mu$ g DNA/ $\mu$ l. For each sample, 50  $\mu$ g DNA were digested to 2'-deoxyribonucleosides for 8-oxodGuo determination. Following denaturation for 5 min at 90°C, samples were rapidly cooled in ice. Then, 5  $\mu$ l of sodium acetate 0.5 M, pH 5.1 were added per sample before digestion for 1 h at 37°C with 5 U nuclease P1. After the addition of 20  $\mu$ l Tris-HCl 0.4 M, pH 8, and 6 U alkaline phosphatase, samples were incubated for 1 h at 37°C.

Proteins were precipitated by centrifugation with half a volume of chloroform for 8 min at 12,000g. Supernatants were recovered and dried with a speedvac. Pellets were suspended in 100 µl MilliQ water and stored in the dark at - 20 °C prior to injection.

8-oxodGuo determination was carried out by HPLC (Philips PU 4100) coupled to electrochemical detection (Kontron 405). Separation of 8-oxodGuo from 2'-deoxyribonucleosides was performed on a Supelguard LC-18-S pre-column (Supelco, 20 x 4 mm) and a Satisfaction C8+ column (CIL Cluzeau, 15 x 4.6 mm). Elution was performed in isocratic mode using a mobile phase composed of methanol 10%, citric acid 10 mM, sodium acetate 25 mM, sodium hydroxide 30 mM and acetic acid 10 mM. The elution flow rate was set at 1ml/min. The detection sensitivity of the electrochemical detector was 0.5 nA/V for an oxidation potential of 650 mV. 8-oxodGuo quantification was done in accordance with a calibration curve previously obtained with known pmole amounts of authentic 8-oxodGuo. For standard expression in number of 8-oxodGuo residues per 10<sup>5</sup>dGuo, deoxyguanosine was also quantified by coupling a UV detector (Philips PU 40218520) at the output of the HPLC column. The UV apparatus was set at a wavelength of 260 nm. A calibration curve was also obtained for this compound in the nmole range. For the conditions described, the retention times of both 8-oxodGuo and dGuo were respectively of 10.5 and 7.0 min.

#### *Methodological development on 8-oxodGuo measurement*

##### Chaotropic DNA extraction method

The method applied was derived from that of Helbock *et al.* (1998). Typically, 100-150 mg of tissue per sample were homogenized in 2 ml buffer A (320 mM sucrose, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM deferoxamine mesylate, 1 % triton X-100, pH 7.5) and centrifuged at 1,500g for 10 min at 4°C. The supernatant was then discarded and the pellet washed with 2 ml buffer A. Following centrifugation for 10 min at 1,500g, the pellet was recovered and resuspended in 600 µl 5 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, 0.15 mM deferoxamine mesylate (pH 8). After addition of 35 µl 10 % SDS, RNA digestion was performed by incubation with 60 µg RNase A and 10 U RNase T1 for 15 min at 50°C. Protein digestion was carried out by incubation with 600 µg protease for 1 h at 37°C. Sample was then centrifuged at 5,000g for 15 min at 4°C and the supernatant was recovered in a 5 ml sterile tube. Following addition of a 1.2 ml sodium iodide solution (20 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 7.6 M NaI, 40 mM Tris-HCl, 0.3 mM deferoxamine mesylate, pH 8) and 2 ml isopropanol, the tube was centrifuged for 15 min at 5,000g. The pellet was then recovered and resuspended in 2 ml 40 % isopropanol. Following centrifugation, the

pellet was washed in 2 ml 70 % ethanol and resuspended in 100  $\mu$ l 0.1 mM deferoxamine mesylate. Samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  prior to digestion.

#### SEVAG and phenol/chloroform DNA extraction method

The SEVAG and phenol/chloroform methods used to study the effect of phenol on 8-oxodGuo level differed only in the nature of the organic solvent used to extract DNA.

Mussel samples were homogenized in 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5% SDS, 2.5 mM deferoxamine mesylate (10 ml/g tissue). In a subsequent step, 1 ml of homogenate was recovered and centrifuged for 30 s at 500g. DNA extraction was then carried out on 500  $\mu$ l of homogenate. RNA digestion was performed by incubation for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$  with 600  $\mu$ g RNase A and 1,000 U RNase T1. Protein digestion was carried out by incubation for 2 h at  $37^{\circ}\text{C}$  with 325  $\mu$ g proteinase K. Total enzyme amount was reached in two stages, with half added at mid-incubation course. Following the addition of 25  $\mu$ l 10% SDS, the sample was heated to  $60^{\circ}\text{C}$  for 10 min and the proteins were precipitated with 125  $\mu$ l 5 M sodium perchlorate. *SEVAG*: DNA was extracted with 800  $\mu$ l of SEVAG. After a mild agitation for 20 min at room temperature, sample was centrifuged at 14,000 rpm for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and the aqueous phase was recovered. *Phenol/chloroform*: DNA was extracted by addition of 800  $\mu$ l phenol/chloroform (1:1). Following agitation for 5 min at room temperature, the 14,000 rpm supernatant fraction was recovered and the extraction then proceeded for two additional periods. DNA extraction was then achieved by three successive extractions with 800  $\mu$ l chloroform. DNA was precipitated from the aqueous phase by addition of 50  $\mu$ l 2.5 M sodium acetate and 2 vol. of glacial absolute ethanol and overnight storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Following centrifugation at 14000 rpm for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , DNA pellets were recovered and dried with a speedvac. DNA was then resuspended in 400  $\mu$ l MilliQ water and the DNA was UV quantified. Samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  prior to digestion.

#### Enzymatic digestion

For samples prepared by the SEVAG and the phenol/chloroform methods, 100  $\mu$ g DNA were digested to desoxyribonucleosides. With the chaotropic method, the 100  $\mu$ l DNA solution was entirely digested. DNA digestion was proceeded as follows. After the addition of 10 U nuclease P1 (1U/ $\mu$ l in 300 mM sodium acetate, 1 mM  $\text{ZnSO}_4$ , pH 5.5) and 1U alkaline phosphatase, samples were incubated for 90 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . Proteins were precipitated with 100  $\mu$ l chloroform. Then, the samples were centrifuged at 10,000g for 5 min and the supernatants recovered for injection.

### *Statistical analysis*

DNA adduct levels recorded in mussel gills were analyzed by calculating correlation coefficients with respect to B[a]P exposure time and B[a]P concentration in whole mussel (Statistica Soft Inc.). Data on 8-oxodGuo measurement were subjected to a two factor analysis of variances, ANOVA, using both the time period animals were kept transplanted in the aquarium and B[a]P exposure as factors (Statistica Soft Inc.). The comparison of the 8-oxodGuo levels measured in each tissue by the different protocols was performed by Student t tests for paired samples. For each protocol, intertissue comparison of 8-oxodGuo levels was performed by a multiple factor ANOVA, taking both tissue nature and pool identification as factors.

## **Results**

### *Detection of B[a]P-related DNA adducts in gill tissue*

DNA adduct levels measured in gills of the exposed mussels are reported in Table 1. To allow the comparison of the DNA adduct levels recorded in both gills and digestive gland tissue of mussels from the same experiment, adduct levels recorded in the digestive gland are also provided in this table (Akcha *et al.*, *in press*). B[a]P concentrations in whole mussel are also cited to give an idea of the internal tissue dose reached during exposure (Akcha *et al.*, *in press*). A positive correlation was found in the present study between DNA adduct level in gill tissue and time of B[a]P exposure ( $R = 0.747$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 1). As in the digestive gland, B[a]P-related DNA adducts were produced in a time-dependent manner relative to exposure, and adduct level was positively correlated with B[a]P concentration in whole mussel ( $R = 0.714$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 2). One-way ANOVA relative to DNA adduct levels of both digestive gland and gill tissue demonstrated higher DNA adduct levels in the latter tissue ( $p < 0.001$ ). A positive correlation was also found between adduct levels in gills and the digestive gland ( $R = 0.673$ ,  $p = 0.01$ ).

### *Measurement of 8-OHdG in gill DNA*

#### Laboratory exposure

8-oxodGuo levels recorded in both control and B[a]P exposed animals are indicated in Table 2. No stress-related 8-oxodGuo formation was observed during the time animals were kept



transplanted in the aquariums ( $p = 0.827$ ). In exposed animals, no effect of B[a]P exposure on 8-oxodGuo level in gill DNA was observed ( $p = 0.051$ ), despite the high B[a]P concentration reached during this experiment in whole mussel tissues. The mean 8-oxodGuo level was  $25.83 \pm 6.26/10e5$  dGuo. This absence of effect explains the lack of correlation between 8-oxodGuo level and B[a]P concentration ( $p > 0.05$ ).

#### Methodological development

The results are reported in Table 3. No difference in 8-oxodGuo levels was observed between the SEVAG and the phenol/chloroform DNA extraction protocols for digestive gland ( $34.8 \pm 9.3$  and  $25.6 \pm 4.8$  8-oxodGuo/10e5 dGuo) and gill ( $6.6 \pm 0.8$  and  $7.3 \pm 2.4$  8-oxodGuo/10e5 dGuo) tissues ( $0.2 < p < 0.3$  and  $0.6 < p < 0.7$  respectively). The 8-oxodGuo levels recorded by the chaotropic method were significantly lower in both digestive gland and gill DNA ( $8.30 \pm 2.03$  8-oxodGuo/10e5 dGuo for  $0.02 < p < 0.05$ , and  $4.8 \pm 1.1$  8-oxodGuo/10e5 dGuo for  $0.02 < p < 0.05$  respectively) than with the phenol/chloroform method.

Intertissue comparisons showed the existence of higher 8-oxodGuo levels in digestive gland than gill DNA for samples extracted either with SEVAG or phenol/chloroform ( $p < 0.001$ ). Differences between tissues were not so apparent with the chaotropic method.

## Discussion

### *B[a]P-related DNA adduct formation*

Induction of DNA adduct formation by B[a]P exposure may be linked with the production of B[a]P diol-epoxide metabolites, which are known to be ultimate carcinogens of B[a]P metabolism. The correlation observed between DNA adduct level in gills and digestive gland and internal B[a]P mussel content supports that DNA adducts are a potential biomarker of PAH exposure in mussels. The exposure time-dependent formation of B[a]P-DNA adducts provides similar conclusion. As demonstrated by Canova *et al.* (1998) and Harvey and Parry (1997) in water-column contamination studies, the highest levels of B[a]P-DNA adducts were not recorded in the digestive gland but in the gills, which appear to be more sensitive to B[a]P exposure. However, in a preliminary toxicokinetic study conducted in the same conditions as in this paper, but using [ $^3$ H]B[a]P, digestive gland displayed the highest B[a]P bioconcentration and DNA binding value in mussel (Akcha *et al.* 1999). As animals were exposed to contaminant in their feed, digestive gland was the main target tissue and showed the highest

B[a]P concentration. Digestive gland is also the main tissue for biotransformation in the mussel (Livingstone and Pipe 1992), being characterized by higher phase I activities due to the presence of both a mixed function oxygenase (MFO) system and a microsomal flavine monooxygenase (FMO) system. Therefore, our observation of a higher DNA adduct level in the gills than in the digestive gland appears to be contrary to these previous findings, although there are several possible explanations for the differences observed. DNA adduct formation can be regarded as the result of two opposite processes (activation and elimination). Because digestive gland showed higher B[a]P uptake and phase I activities than gills, the differences between the two tissues is probably related to the elimination rather than the activation process. In this manner, a decrease in conjugation activities could lead to an unbalanced ratio between phase I and phase II activities, resulting in an increased adduct level. In fact, Glutathione-S-transferase (GST) activity in gills of exposed mussels was found to be significantly depressed by B[a]P exposure, whereas the same activity in the digestive gland remained unchanged (Akcha *et al.*, *in press*). Another possible explanation relates to differences in B[a]P activation pathways between tissues. It has been shown in vertebrates that B[a]P can be metabolized either by the diol-epoxide or the radical cation pathways (Cavalieri *et al.* 1990). The latter activation pathway involved a P450 catalyzed one-electron oxidation leading to the production of B[a]P radical cations that can react directly with DNA to yield depurinating DNA adduct formation. This kind of adducts, which is not detected by the standard <sup>32</sup>P post-labeling assay, is thought to constitute up to 80 % of the total adducts produced in vertebrates (Rogan *et al.* 1993). As B[a]P radical cations have been demonstrated to be the precursors of B[a]P quinones (Cavalieri *et al.* 1988) and since quinones are the major metabolites of B[a]P biotransformation in mussel (Michel *et al.* 1995), the radical cation pathway may also be important in bivalves. It is possible that the low bulky DNA adduct levels recorded in the digestive gland were mainly due to a predominant radical cation pathway in this tissue. However, the presence of the same adduct pattern in both tissues tends to indicate that differences in the diol-epoxide activation pathway could be quantitative but not qualitative. Nevertheless, this assumption cannot account for the higher DNA binding value observed in the digestive gland. In fact, depurinating adducts are lost during classical DNA extraction procedure and thus do not contribute to the binding index. To date, depurinating DNA adducts have not been investigated in the mussel, and data on B[a]P metabolite profile have not been obtained in individual tissues.

An observed difference in adduct level between tissues is important for applications in biomonitoring studies. As gills appear to be more sensitive than digestive gland to genotoxic exposure, as indicated by the measurement of bulky DNA adducts, a post-labeling assay in gills

may allow an earlier detection of the exposure-related genotoxic effects. Moreover, Harvey and Parry (1997) noted the existence of a higher DNA adduct level in the mantle. Measurement of DNA adduct in this tissue, because of its role in mussel reproduction, could be more relevant from an ecotoxicological point of view.

With respect to laboratory experimental data, it should also be determined whether the adduct levels reached during exposure are truly significant, which can be checked by comparing available reference *in situ* data. Few field studies have reported DNA adduct levels in mussel tissue. During a sampling program in the Venice Lagoon, Venier et al (1996) recorded a DNA adduct level ( $0.346 \pm 0.064$ ) in mussel gills from the most PAH-polluted site studied similar to that found in the same tissue in our experiment ( $0.480 \pm 0.140$ ). Unfortunately, the lack of chemical data in the latter study did not allow comparison of the pollutant body burden associated with these adduct levels. Solé *et al.* (1996) also reported DNA adduct levels but in the digestive gland of mussels from the “Aegean Sea” oil spill area. In this study, DNA adduct levels recorded in the digestive gland are high, up to  $128 \pm 37.3$  RAL against  $0.251 \pm 0.062$  RAL for mussel digestive gland exposed 28 days to a daily B[a]P dose of 50 mg/kg d. w. mussel. Only the furthest site from the oil spill area (Meiras, Spain), displayed a DNA adduct level of the same order ( $0.200 \pm 0.160$ ). However, the DNA adduct levels reported by Solé *et al.* (1996) seem overestimated in terms of the value obtained for the vehicle- dosed rat ( $18.1 \pm 5.8$ ). Results concerning the chemical analysis are in the same line. Total PAH concentrations in mussel digestive gland for the different sampling sites are quite low for the DNA adduct levels reported. Concentrations are up to 2,000 times less than the B[a]P concentration reached in whole mussel from our experiment, even at Meiras. These results illustrate the difficulty of using DNA adducts in a field study. In fact, the levels recorded by Solé *et al.* (1996) did not followed the oil gradient indicated by PAH mussel content, *i.e.* the site with the highest PAH concentration did not display the highest PAH-related DNA adduct level. Such a result is difficult to explain since animals in the field are exposed to a mixture of compounds. Dose-response studies performed with pure compounds and pollutant mixtures could elucidate these results by identifying possible inhibitory effects on P450 activities involved in the diol-epoxide pathways and hence affecting stable DNA adduct formation. Knowledge on other PAH activation pathways and DNA repair processes is also lacking for a full understanding and correct interpretation of results on DNA adducts in bivalves.

### *8-oxodGuo measurement in mussel gills*

Oxyradical production has been proposed as a possible mechanism for pollutant toxicity in aquatic organisms (Livingstone *et al.* 1990). Different processes have been identified as stimulators of pollutant oxyradical production, including uptake directly or indirectly (following biotransformation processes) of redox cycling xenobiotics, redox reactions with transition metals or other organic free radicals, and induction of cytochrome P450 content and biotransformation enzymes such as NAD(P)H-dependent flavoprotein reductases that can respectively generate  $O_2^-$  and/or  $H_2O_2$  and  $O_2^-$  through their own catalytic cycle. As B[a]P appears to stimulate oxyradical production in mussel, it is quite surprising that 8-oxodGuo level is not affected when mussels are exposed to B[a]P. In fact, as a filter-feeding organism, the mussel is a high bioaccumulator of organic pollutants such as PAHs (Mix *et al.* 1981, Akcha *et al.* 1999). B[a]P metabolism has been demonstrated both *in vitro* (Michel *et al.* 1993, Stegeman, 1985) and *in vivo* (Michel *et al.* 1995) in *Mytilus sp.*, leading to the formation of predominant B[a]P dione metabolites constituting up to 70-82 % and 47 % of the total metabolites produced respectively *in vitro* and *in vivo* by mussel MFO. The potential of benzo(a)pyrene diones and known cycling compounds to stimulate *in vitro* oxyradical production has been well-demonstrated in mussel digestive gland microsomes. NADH- and NADPH-dependent  $O_2^-$  production (the SOD-inhibitable part of NAD(P)H-dependent cytochrome c reduction) was stimulated by the redox model cycling quinone, menadione (Livingstone *et al.* 1989), and the nitroaromatic compounds, nitrofurantoin and 4-nitroquinoline N-oxide (Garcia Martinez *et al.* 1995a, 1992). Following one-electron reduction by NAD(P)H cytochrome c reductase, quinone or the quinone metabolite is reduced to a semiquinone radical that reacts spontaneously with  $O_2$  to regenerate the parent quinone, thereby releasing  $O_2^-$  ( $NAD(P)H + H^+ + Q \rightarrow NAD(P)^+ + Q^-$  and  $Q^- + O_2 \rightarrow Q + O_2^-$  for reduction and autooxidation reaction respectively). Hydroxyl radical formation has also been studied in the mussel by indirect assessment of ethylene production from 2-keto-4-methylbutyric acid (KMBA) oxidation by  $\cdot OH$ . The reaction was conducted in the presence of the Fe/EDTA complex as a promoter of the Haber-Weiss reaction ( $O_2^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 + \cdot OH + OH^-$ ). Hence, both 1,6-, 3,6- and 6,12-B[a]P diones stimulated  $\cdot OH$  production in the mussel (Garcia Martinez and Livingstone 1995b, Sjölin and Livingstone 1997). As for  $O_2^-$ , the increase was higher for NADH- than for NADPH-dependent production. SOD and CAT inhibition studies have indicated the involvement of both  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  in NADPH-dependent  $\cdot OH$  production. For this latter cofactor, oxyradical production via redox cycling and the Haber-Weiss reaction was clearly demonstrated for B[a]P diones, with  $H_2O_2$  probably generated by spontaneous

dismutation of  $O_2^-$  ( $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ). For NADH-dependent production, the absence of a SOD inhibitory effect suggests that other free radical interactions occur in mussel (Garcia Martinez and Livingstone 1995b). Among the processes related to oxyradical production, induction of cytochrome P450 content and cytochrome c reductase have also been noted for B[a]P and aromatic hydrocarbon exposure (Michel *et al.* 1993, Livingstone, 1988, Gilewicz *et al.* 1984). Although a positive correlation between total PAH tissue concentration and P450 content/cytochrome P450 reductase activity has been reported (Solé *et al.* 1996, Solé *et al.* 1994), the effects were generally weak and not recorded in all experiments.

In our study, B[a]P-stimulated oxyradical production apparently occurred, given the high B[a]P bioconcentration reached in whole mussel. The induction of benzo(a)pyrene hydroxylase activity after B[a]P exposure is indicative of higher phase I metabolism and thus higher B[a]P metabolite production, including B[a]P diones (Akcha *et al.*, *in press*). Yet measurement of NADPH-dependent cytochrome P450 reductase in digestive gland microsomes revealed no increase (data not shown), whereas a rise in CAT activity after B[a]P exposure was highly significant in exposed mussels, indicating increased  $O_2^-$  production (Akcha *et al.*, *in press*). The absence of oxidative DNA damage was thus not consistent with our *in vitro* and *in vivo* findings, and few data in the literature are helpful in clarifying these results. Marsh *et al.* (1993) reported 8-oxodGuo levels in mussel digestive gland DNA following *in vivo* exposure to two redox cycling compounds, namely menadione and nitrofurantoin. For each compound, animals were exposed for 2 to 4 days via the water column to a concentration of 100 ppb, and 8-oxodGuo level was determined by HPLC/ECD assay. No increase in 8-oxodGuo level was noted in menadione- and nitrofurantoin-exposed animals, with values ranging from  $22 \pm 6$  8-oxodGuo/ $10^5$  dGuo (control animals) to  $46 \pm 35$  8-oxodGuo/ $10^5$  dGuo (menadione-exposed animals). Induction of oxidative damage by menadione exposure in mussel was however demonstrated by Livingstone *et al.* (1990) in term of lipid peroxidation. Values reported in this laboratory experiment were not different from 8-oxodGuo levels measured in endogenous animals from the Plymouth area (16 to 46 8-oxodGuo/ $10^5$  dGuo). Canova *et al.* (1998) studied the effects of different waterborne B[a]P concentrations (0.5 to 1,000 ppb) on 8-oxodGuo level in digestive gland and gill DNA. Increased 8-oxodGuo levels were observed in gill DNA after exposure for 48 h to 5, 50 and 100 ppb and for 72 h to 5, 50, 100 and 1,000 ppb, with values ranging from  $2.24 \pm 0.27$  (72 h, control) to  $7.66 \pm 0.69$  8-oxodGuo/ $10^5$  dGuo (72 h, 100 ppb). In the digestive gland, increased levels were also reported for 48 h exposure to 100 and 1,000 ppb and 72 h exposure from 0.5 ppb. Levels were higher in the digestive gland with values

ranging from  $10.85 \pm 3.77$  (control) to  $28.51 \pm 1.85$  8-oxodGuo/ $10^5$  dGuo (72 h, 100 ppb). However, the dose-dependent increase of oxidized base level was non-linear for both tissues since decreased or insignificant levels were observed at higher/intermediate doses. The performance of B[a]P chemical analysis in individual mussel tissues allowed an estimation of whole mussel B[a]P concentration in terms of the usual tissue weight distribution values. Hence, the B[a]P concentration recorded in whole mussel tissues in our study (about 100 mg/kg w.w.) was similar to those found by Canova et al (1998) with the 1,000 ppb B[a]P concentration (111.9 mg/kg w.w. at 72 h exposure). This suggests that in our study, increased 8-oxodGuo levels could have been observed in gills for the B[a]P concentration reached in whole mussel.

Different assumptions may account for the lack of a B[a]P effect on 8-oxodGuo levels. As in the case of CAT activity, an increase in antioxidant defenses could have overcome B[a]P-stimulated oxyradical production and limited its toxic effects. However, the absence of oxidative DNA damage was probably related to the HPLC/ECD assay, particularly to the DNA extraction procedure used for the analysis. In fact, methodological problems have been observed in 8-oxodGuo measurement, mainly concerning artefactual oxidation of DNA during workup process, leading to an overestimation of measured 8-oxodGuo levels (Cadet *et al.* 1997b). The lack of a standard assay is responsible for the confusing data that make interstudy comparisons difficult (Collins *et al.* 1997). Briefly, artefactual oxidation can arise from two main sources: the analytical method used for measurement of oxidized base levels and the DNA extraction protocol applied to sample preparation. Differences in 8-oxodGuo levels have been observed between GC/EIMS (Gas Chromatography/Electron Impact Mass spectrometry) and HPLC/ECD assays. The former tends to overestimate oxidized base levels because of artefactual oxidation of unmodified bases during the derivatization step required prior to GC/EIMS analysis (Ravanat *et al.* 1997, Douki *et al.* 1996). DNA bases are in fact not volatile enough to be directly separated by GC and need to be heated at high temperature in acetonitrile/N-bis (trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (1:1) for gas separation. In calf thymus DNA, comparison of basal oxidized base levels showed values for 8-oxodGuo, 5-OHCyt and 8-oxoAde respectively 23, 3 and 14 times as high for GC/EIMS as for HPLC/ECD analysis (Ravanat *et al.* 1997). However, it has been shown that GC/EIMS artifacts can be minimized or prevented respectively by derivatization under N<sub>2</sub> atmosphere and HPLC pre-purification (Douki *et al.* 1996, Ravanat *et al.* 1997). Moreover, the nature of the organic solvent used in the DNA extraction protocol and exposure to air have been implicated in 8-oxodGuo overestimation in many studies. Phenol has been shown to produce artefactual DNA oxidation

by DNA sensitization to O<sub>2</sub> (Claycamp 1992). Although O<sub>2</sub> contact increases the 8-oxodGuo level of a standard 2'-deoxyguanosine solution 7-fold, prior use of phenol increases the 8-oxodGuo level 20-fold. Comparisons of different DNA extraction protocols have also indicated that phenol can lead to overestimation (Finnegan *et al.* 1996). Fortunately, efforts to prevent artefactual oxidation have led to more suitable DNA extraction protocols for such measurements (Hofer and Möller, 1998, Helbock *et al.* 1998). Their application has resulted in decreased values and an estimated background level for 8-oxodGuo of less than 1 8-oxodGuo/10<sup>6</sup> dGuo for cellular DNA (Cadet *et al.* 1997b). In the present study and in that from Marsh *et al.* (1993), 8-oxodGuo levels recorded in mussels appear to be quite high. The occurrence of artefactual oxidation seems evident, as demonstrated by the lower values reported by Canova *et al.* (1998). The results of the methodological work presented in this paper support these earlier findings. The addition of a stronger ionic chelator in the homogenization buffer and the reduction of the number of DNA precipitation steps led to a decrease in the 8-oxodGuo level recorded by the SEVAG method in gill tissue (6.6 against 25.8 8-oxodGuo/10<sup>5</sup> dGuo). Although no difference in level was observed between phenol- and SEVAG-extracted gill and digestive gland DNA, the chaotropic method allowed detection of significant lower values in both tissues. As in the study of Canova *et al.* (1998), higher 8-oxodGuo values were recorded in the digestive gland by both the SEVAG and phenol/chloroform extraction method. With the chaotropic method, the differences between levels in the two tissues were not always apparent. The absence of any effect on 8-oxodGuo reported in this paper vary probably due to artefactual oxidation that could have masked the presumed B[a]P oxidative effects.

The induction and time-dependent increase of B[a]P DNA adducts in mussel gills confirm that DNA adduct measurement is as a promising biomarker of genotoxicity in aquatic organisms. The higher DNA adduct levels observed in gills as compared to digestive gland indicate the greater sensitivity of the former tissue to macromolecular adduct formation. Thus, measurement of bulky aromatic adduct formation appears to be more pertinent for mussel gills than digestive gland since it allows earlier detection of marine pollutant genotoxic effects. The absence of B[a]P effects on 8-oxodGuo level in mussel gill DNA is mainly due to artefactual oxidation during sample processing. Although 8-oxodGuo measurement represents a potent biomarker for oxidative stress in aquatic biomonitoring, further studies are needed to fully assess the trace level of oxidative damage to DNA in aerobic organisms.

## **Acknowledgments**

This work was supported by the IFREMER (French Research Institute for Exploitation of the Sea) and a European BIOMAR program (ENV5-CT96-0300). The authors are grateful to Dr Thierry Douki and Dr Jean-Christophe Garcin for their assistance and advice on 8-oxodGuo measurement.



## References

- Akcha, F., Burgeot, T., Venier, P. AND Narbonne, J-F. (1999) Relationship between kinetics of Benzo[a]pyrene bioaccumulation and DNA binding in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **62**, 455-462.
- Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T. AND Narbonne, J-F. (1999) Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in B[a]P contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *In press in Aquatic Toxicology*.
- Aruoma, O. I. (1998) Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in Human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **75**, 199-212.
- Bolognesi, C., Rabboni, R. AND Roggeri, P. (1996) Genotoxicity biomarkers in *M. Galloprovincialis* as indicators of marine pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **113 C**, 319-323.
- Botello, A. V., Villanueva, F. S. AND Diaz, G. G. (1997) Petroleum pollution in the Gulf of Mexico and Caribbean Sea. *Review of Environmental Contamination and Toxicology*, **153**, 91-118.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T. AND Ravanat, J-L. (1997a) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biological significance. *Review of Biochemical and Physiological pharmacology*, **131**, 1-87.
- Cadet, J., Douki, T. AND Ravanat, J-L. (1997b) Artifacts associated with the measurement of oxidized DNA bases. *Environmental Health Perspectives*, **105**, 1034-1039.
- Canova, S., Degan, P., Peters, L. D., Livingstone, D. R., Voltan, R. AND Venier, P. (1998) Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. *Mutation Research*, **399**, 17-30.
- Cavalieri, E. L., Rogan, E. G., Cremenosi, P. AND Devanesan, P. D. (1988) Radical cations as precursor in the metabolic formation of quinones from benzo[a]pyrene and 6-fluorobenzo[a]pyrene. Fluor substitution as a probe for one-electron oxidation in aromatic substrates. *Biochemical Pharmacology*, **37**, 2173-2182.
- Cavalieri, E. L., Rogan, E. G., Devanesan, P. D., Cremenosi, P., Cerny, R. L., Gross, M. L. AND Bodell, W. J. (1990) Binding of benzo(a)pyrene to DNA by Cytochrome P450 catalyzed one-electron oxidation in rat liver microsomes and nuclei. *Biochemistry*, **29**, 4820-4827.

- Cavaliere, E. L. AND Rogan, E. G. (1995) Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica*, **25**, 677-688.
- Cerda, S. AND Weitzman, S. A. (1997) Influence of oxygen radical injury on DNA methylation. *Mutation Research*, **386**, 141-152.
- Chaturvedi, S. AND Lakshman, M. K. (1996) Site-specific modification of the human N-ras proto-oncogene with each diol epoxide metabolite of benzo[a]pyrene and thermal denaturation studies of the adducted duplexes. *Carcinogenesis*, **17**, 2747-2752.
- Claisse, D., Joanny, M. AND Quintin, J-Y. (1992) Le réseau national d'observation de la qualité du milieu marin (RNO). *Analisis*, **20**, 19-22.
- Claycamp, H. G. (1992) Phenol sensitization of DNA to subsequent oxidative damage in 8-hydroxyguanine assays. *Carcinogenesis*, **13**, 1289-1292.
- Collins, A., Cadet, J., Epe, B. AND Gedik, C. (1997) Problems in the measurement of 8-oxoguanine in human DNA, Report of a workshop, DNA oxidation, held in Aberdeen, UK, 19-21 January, 1997. *Carcinogenesis*, **18**, 1833-1836.
- Conney, A. H. (1982) Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons. G. H. A Clowes Memorial Lecture. *Cancer Research*, **42**, 4875-4917.
- Culp, S. J., Gaylor, D. W., Sheldon, W. G., Goldstein, L. S. AND Beland, F. A. (1996) DNA adduct measurements in relation to small intestine and forestomach tumor incidence during the chronic feeding of coal tar or benzo[a]pyrene to mice. *Polycyclic Aromatic Compounds*, **11**, 161-168.
- De Vries, A., Dollé, M. E. T., Broekhof, J. L. M., Muller, J. J. A., Dinant Kroese, E., Van Kreijl, C. F., Capel, P. J. A., Vijg, J. AND Van Steeg, H. (1997) Induction of DNA adducts and mutations in spleen, liver and lung of XPA-deficient/lacZ transgenic mice after oral treatment with benzo[a]pyrene: correlation with tumor development. *Carcinogenesis*, **18**, 2327-2332.
- Douki, T., Delatour, T., Bianchini, F. AND Cadet, J. (1996) Observation and prevention of an artefactual formation of oxidized DNA bases and nucleosides in the GC-EIMS method. *Carcinogenesis*, **17**, 347-353.
- Finnegan, M. T. V., Herbert, K. E., Evans, M. D., Griffiths, H. R. AND Lunec, J. (1996) Evidence for sensitization of DNA to oxidative damage during isolation. *Free Radical Biology and Medicine*, **20**, 93-98.
- Flesher, J. W., Myers, S. R. AND Stansbury, K. H. (1990) The site of substitution of the methyl group in the bioalkylation of benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis*, **11**, 493-496.

- Flesher, J. W. AND Myers, S. R. (1991) Rules of molecular geometry for predicting carcinogenic activity of unsubstituted polynuclear aromatic hydrocarbons. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, **11**, 41-54.
- Floyd, R. A., Watson, J. J., Wong, P. K., Altmiller, D. H. AND Rickard, R. C. (1986) Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Radical Research Communications*, **1**, 163-172.
- Garcia Martinez, P., Winston, G. W., Metosh-Dickey, C., O'Hara, S. C. M. AND Livingstone, D. R. (1995a) Nitrofurantoin-stimulated reactive oxygen species production and genotoxicity in digestive gland microsomes and cytosol of the common mussel (*Mytilus edulis* L.). *Toxicology and Applied Pharmacology*, **131**, 332-341.
- Garcia Martinez, P. AND Livingstone, D. R. (1995b) Benzo[a]pyrene-dione-stimulated oxyradical production by microsomes of digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Marine Environmental Research*, **39**, 185-189.
- Garcia Martinez, P., Hajos, A. K. D., Livingstone, D. R. AND Winston, G. W. (1992) Metabolism and mutagenicity of 4-nitroquinoline N-oxide by microsomes and cytosol of digestive gland of the mussel *Mytilus edulis* L. *Marine Environmental Research*, **34**, 303-307.
- Gardner, G. R., Pruell, R. J. AND Malcom, A. R. (1992) Chemical induction of tumors in oysters by a mixture of aromatic and chlorinated hydrocarbons, amines and metals. *Marine Environmental Research*, **34**, 59-63.
- Gilewicz, M., Guillaume, J. R., Carles, D., Leveau, M. AND Bertrand, J. C. (1984) Effect of petroleum hydrocarbons on the cytochrome P-450 content of the mollusk bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Biology*, **80**, 155-159.
- Grover, P. L. (1986) Pathways involved in the metabolism and activation of polycyclic hydrocarbons. *Xenobiotica*, **16**, 915-931.
- Gupta, R. C., Reddy, M. V. AND Randerath, K. (1982) <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts. *Carcinogenesis*, **3**, 1081-1092.
- Halliwell, B. AND Cross, C. E. (1994) Oxygen-derived species: Their relation to Human disease and environmental stress. *Environmental Health Perspect*, **102**, 5-12.
- Harvey, J. S. AND Parry, J. M. (1997) The detection of genotoxin-induced DNA adducts in the common mussel *Mytilus edulis*. *Mutagenesis*, **12**, 153-158.
- Helbock, H. J., Beckman, K. B., Shigenaga, M. K., Walter, P. B., Woodall, A. A., Yeo, H. C. AND 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*, **95**, 288-293.
- Hofer, T. AND Möller, L. (1998) Reduction of oxidation during the preparation of DNA and analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Chemical Research in Toxicology*, **11**, 882-887.
- Kim, K. B. AND Lee, B. M. (1997) Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. *Cancer Letters*, **113**, 205-212.
- Klaunig, J. E, Xu, Y., Isenberg, J. S., Bachowski, S., Kolaja, K. L., Jiang, J., Stevenson, D. E. AND Walborg, E. F. (1998) The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, **106**, 289-295.
- La, D. K. AND Swenberg, J. A. (1996) DNA adducts: biological markers of exposure and potential applications to risk assessment. *Mutation Research*, **365**, 129-146.
- Lee, B. M., Jang, J. J. AND Kim, H. S. (1998) Benzo[a]pyrene diol-epoxide-I-DNA and oxidative DNA adducts associated with gastric adenocarcinoma. *Cancer Letters*, **125**, 61-68.
- Li, Y. AND Trush, M. A. (1995) Oxidative stress and its relationship to carcinogen activation. In *Oxidative Stress and Aging*, R. G. Cutler, L. Packer, J. Bertram and A. Mori, eds. (Birkhauser Verlag, Basel.), pp. 203-220.
- Livingstone, D. R. (1988) Responses of microsomal NADPH-cytochrome c reductase activity and cytochrome P-450 in digestive glands of *Mytilus edulis* and *Littorina littorea* to environmental exposure to pollutants. *Marine Ecology Progress Series*, **46**, 37-43.
- Livingstone, D.R., Garcia Martinez, P. AND Winston, G. W. (1989) Menadione-stimulated oxyradical formation in digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Aquatic Toxicology*, **15**, 213-236.
- Livingstone, D. R., Garcia Martinez, P., Michel, X., Narbonne, J. F., O' Hara, S., Ribera, D., AND Winston, G. (1990) Oxyradical production as a pollution mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other mollusks. *Functional Ecology*, **4**, 415-424.
- Livingstone, D. R. AND Pipe, R. K. (1992) Mussels and environmental contaminants: Molecular and cellular aspects. In *The mussel, Mytilus edulis: Ecology, physiology, genetics and culture*, E. Grosling, ed. (Elsevier, Amsterdam.), pp. 425-464.
- Loechler, E. L. (1995) How are potent bulky carcinogens able to induce such a diverse array of mutations ?. *Molecular Carcinogenesis*, **13**, 213-219.

- Lowe, D. M. AND Pipe, R. K. (1986) Hydrocarbon exposure in mussels: a quantitative study of the responses in the reproductive and nutrient storage cell system. *Aquatic Toxicology*, **8**, 265-272.
- Marsh, J.W., Chipman, J. K. AND Livingstone, D. R. (1993) Formation of DNA adducts following laboratory exposure of the mussel, *Mytilus edulis*, to xenobiotics. *The Science of the Total Environment*, Supplement 1993, 567-572.
- Melamede, R. J., Kow, Y. W., Bespalov, I. A. AND Wallace, S. S (1996) Detection of oxidative DNA base damages. Immunochemical and electrochemical approaches. In *Technologies for detection of DNA damage and mutations*, G. P. Pfeifer, ed. (Plenum Press, New York.), pp. 103-115.
- Neff, J. M. (1984) Bioaccumulation of organic micropollutants from sediments and suspended particulates by aquatic Animals. *Fresenius Z Analytical Chemistry*, **319**, 132-136.
- Michel, X. R., Cassand, P. M. AND Narbonne, J-F. (1993) Activation of benzo[a]pyrene and 2-aminoanthracene to bacteria mutagens by mussel digestive gland postmitochondrial fraction. *Mutation Research*, **301**, 113-119.
- Michel, X. R., Beasse, C. AND Narbonne, J-F. (1995) *In vivo* metabolism of benzo[a]pyrene in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **28**, 215-222.
- Michel, X. R., Narbonne, J-F., Mora, P., Daubèze, M., Ribera, D., Lafaurie, M., Budzinski, H. AND Garrigues, P. (1998) Indicateurs biochimiques de pollution des écosystèmes côtiers: Expérience du groupe interface chimie-biologie des écosystèmes marins (GICBEM). In *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, L. Lagadic, T. Caquet, J-C. Amiard, F. Ramade, coords, (Lavoisier TEC&DOC, Paris.), pp. 9-32.
- Mix, M. C., Schaffer, R. L. AND Hemigway, S. J. (1981) Polynuclear aromatic hydrocarbons in bay mussels (*Mytilus edulis*) from Oregon. In *Phylogenic Approach in Cancerogenesis*, C. J. Dawe et al, eds. (Japan SCI. SOC. Press, Tokyo.), pp. 167-177.
- Moy, F. E. AND Walday, M. (1996) Accumulation and depuration of organic micro-pollutants in marine hard bottom organisms. *Marine Pollution Bulletin*, **33**, 56-63.
- Ostapczuk, P., Burow, M., May, K., Mohl, C., Froning, M., Süßenbach, B., Waidman, E., AND Emons, H. (1997) Mussels and algae as bioindicators for long-term tendencies of element pollution in marine ecosystems. *Chemosphere*, **34**, 2049-2058.
- Peters, L. D., Nasci, C. AND Livingstone, D. R. (1998) Variation in levels of Cytochrome P4501A, 2B, 2E, 3A and 4A-immunopositive proteins in digestive gland of indigenous

- and transplanted mussel *Mytilus galloprovincialis* in Venice Lagoon, Italy. *Marine Environmental Research*, **46**, 295-299.
- Phillips, D. H. (1983) Fifty years of benzo(a)pyrene. *Nature*, **303**, 468-472.
- Quan, T. AND States, J. C. (1996) Preferential DNA damage in the p53 gene by benzo[a]pyrene metabolites in cytochrome P4501A1-expressing xeroderma pigmentosum group A cells. *Molecular Carcinogenesis*, **16**, 32-43.
- Randerath, K., Padmavathi, S., Moorthy, B., Aston, J. P., Baan, R. A., Van den Berg, P. T. M., Booth, E. D. AND Watson, W. P. (1988) Comparison of immunoaffinity chromatography enrichment and nuclease P1 procedures for <sup>32</sup>P-postlabelling analysis of PAH-DNA adducts. *Chemico-Biological Interactions*, **110**, 85-102.
- Randerath, K., Randerath, E., Danna, T. F., Van Golen, K. L. AND Putman, K. L. (1989) A new sensitive <sup>32</sup>P-postlabeling assay based on the specific enzymatic conversion of bulky DNA lesions to radiolabeled dinucleotides and nucleoside 5'-monophosphates. *Carcinogenesis*, **10**, 1231-1239.
- Ravanat, J-L. AND Cadet, J. (1995) Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterization of the main oxidation products. *Chemical Research in Toxicology*, **8**, 379-388.
- Ravanat, J-L., Douki, T., Turesky, R. AND Cadet, J. (1997) Measurement of oxidized bases in DNA. Comparison between HPLC-EC and GC-MS assays. *Journal de Chimie Physique*, **94**, 306-312.
- Rogan, E. G., Devanesan, P. D., Ramakrishna, N. V. S., Higginbotham, S., Padmavathi, N. S., Chapman, K., Cavalieri, E. L., Jeong, H., Jankowiak, R. AND Small, G. J. (1993) Identification and quantitation of benzo(a)pyrene-DNA adducts formed in mouse skin. *Chemical Research in Toxicology*, **6**, 356-363.
- Sims, P., Grover, P. L., Swaisland, A., Pal, K. AND Hewer, A. (1974) Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol epoxide. *Nature*, **252**, 326-328.
- Sjölin, A. M., AND Livingstone, D. R. (1997) Redox cycling of aromatic hydrocarbon quinones catalysed by digestive gland microsomes of the common mussel (*Mytilus edulis* L.). *Aquatic Toxicology*, **38**, 83-99.
- Smith, B. A., Fullerton, N., F., Aidoo, A., Heflich, R. H. AND Beland, F. A. (1993) DNA adduct formation in relation to lymphocyte mutations and lung tumor induction in F344 rats treated with the environmental pollutant 1,6-dinitropyrene. *Environmental Health Perspectives*, **99**, 277-280.

- Solé, M., Porte, C. AND Albaigés, J. (1994) Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: its relation with contaminant body burdens. *Aquatic Toxicology*, **30**, 271-283.
- Solé, M., Porte, C., Biosca, X., Mitchelmore, C. L., Chipman, J. K., Livingstone, D. R. AND Albaigés, J. (1996) Effects of the "Aegean Sea" oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **113 C**, 257-265.
- Stansbury, K. H., Flesher, J. W. AND Gupta, R. C. (1994) Mechanism of Aralkyl-DNA adduct formation from Benzo[a]pyrene *in vivo*. *Chemical Research in Toxicology*, **7**, 254-259.
- Stegeman, J. J. (1985) Benzo[a]pyrene oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel (*Mytilus edulis*) and other bivalve mollusk species from the Western North Atlantic. *Marine Biology*, **89**, 21-30.
- Stern, S. J., Degawa, M., Martin, M. V., Guengerich, F. P., Kaderlik, R. K., Ilett, K. F., Breau, R., McGhee, M., Montague, D., Lyn-Cook, B. AND et al (1993) Metabolic activation, DNA adducts, and H-ras mutations in human neoplastic and non-neoplastic laryngeal tissue. *Journal of Cell Biochemistry Supplement*, **17F**, 129-137.
- UNEP (1990) GESAMP, The status of the Marine Environment. UNEP Regional Seas. In *Report and studies N°115*, (United Nations Environmental Program, Paris.).
- Venier, P. AND Canova, S. (1996). Formation of DNA adducts in the gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* treated with benzo[a]pyrene, **34**: 119-133.
- Venier, P., Canova, S. AND Levis, A. G. (1996) DNA adducts in *Mytilus galloprovincialis* and *Zosterisessor ophiocephalus* collected from PAC-polluted and reference sites of the Venice lagoon. *Polycyclic Aromatic Compounds*, **11**, 67-73.
- Viarengo, A. AND Canesi, L. (1991) Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture*, **94**, 225-243.
- Wang, Y-J., Ho, Y-S., Lo, M-J. AND Lin, J-K. (1995) Oxidative modification of DNA bases in rat liver and lung during chemical carcinogenesis and aging. *Chemico-Biological Interactions*, **94**, 135-145.
- Wiseman, H., Kaur, H. AND Halliwell, B. (1995) DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer Letters*, **93**, 113-120.
- Wolterbeek, A. P., Roggenband, R., Baan, R. A., Feron, V. J. AND Rutten, A. A. (1995) Relation between benzo[a]pyrene-DNA adducts, cell proliferation and p53 expression in tracheal epithelium of hamsters fed a high beta-carotene diet. *Carcinogenesis*, **16**, 1617-1622.

Table 1. B[a]P-related DNA adduct levels in gills and digestive gland of B[a]P-contaminated mussels. ♣ B[a]P concentration recorded in whole mussel.

B[a]P exposure (days)	Gills		Digestive gland		B[a]P Concentration ♣
	Mean RAL	Std dev	Mean RAL	Std dev	mg B[a]P/kg d. w.
0	0.149	0.079	0.010	0.005	0.005
3	0.186	0.041	0.032	0.015	48.363
6	0.254	0.011	0.044	0.015	107.724
10	0.227	0.069	0.088	0.030	90.47
17	0.302	0.040	0.060	0.062	337.344
24	0.405	0.236	0.269	0.082	274.231
28	0.480	0.139	0.251	0.062	581.057



Table 2. Mean 8-oxodGuo level (number of lesions/10<sup>5</sup> dGuo) in gill DNA of both control and B[a]P-exposed mussels.

Time of experiment (d)	Control mussels		B[a]P-exposed mussels	
	mean	Std dev	Mean	Std dev
0	25.8	3.3	25.8	3.3
3	23.1	0.8	29.4	9.1
6	21.7	6	24.9	4.5
10	19.3	2.4	24.9	8.6
17	18.9	2.7	27.6	7.2
24	23.3	4.9	25.9	6.0
28	25.2	3.5	22.3	5.1

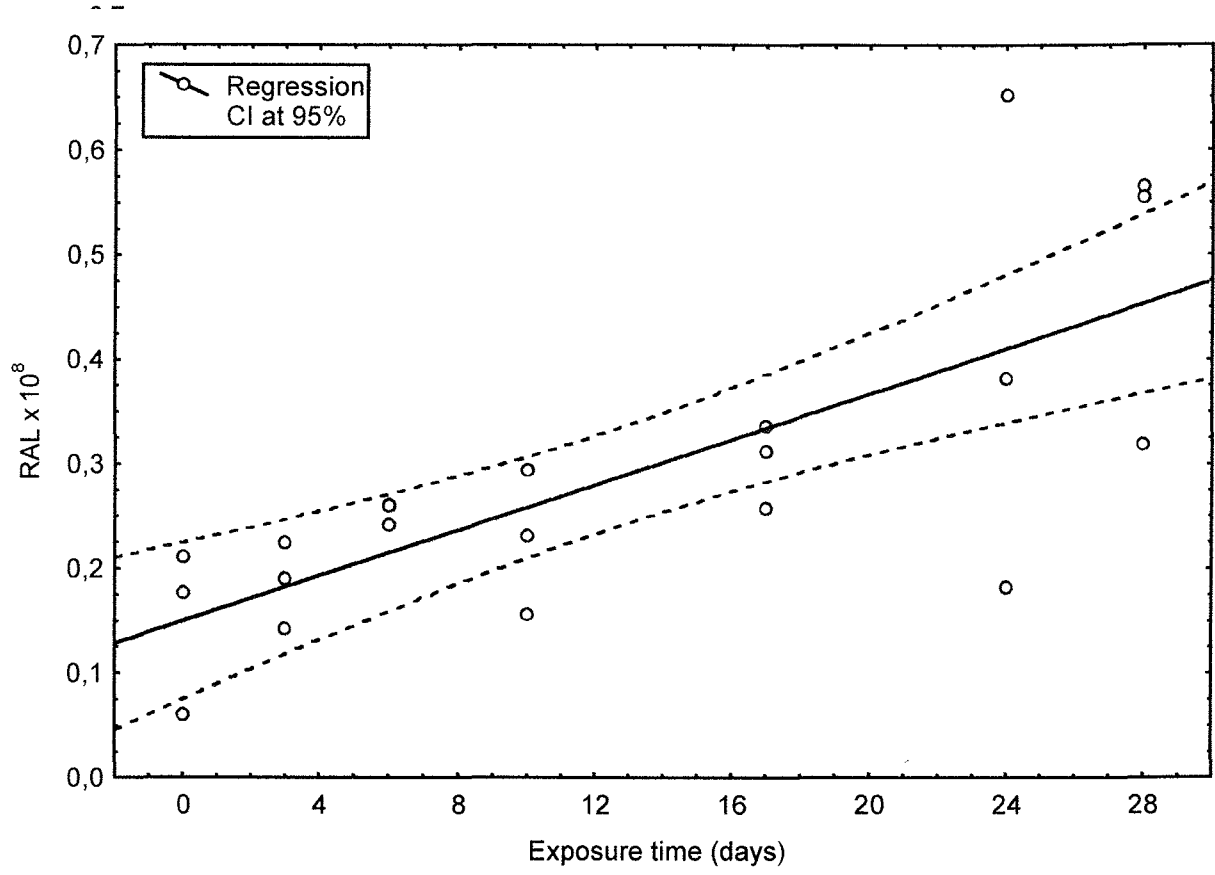
Table 3. Effect of DNA extraction procedure on 8-oxodGuo (number of lesions/10<sup>5</sup> dGuo) measurement. ♣: dependent samples

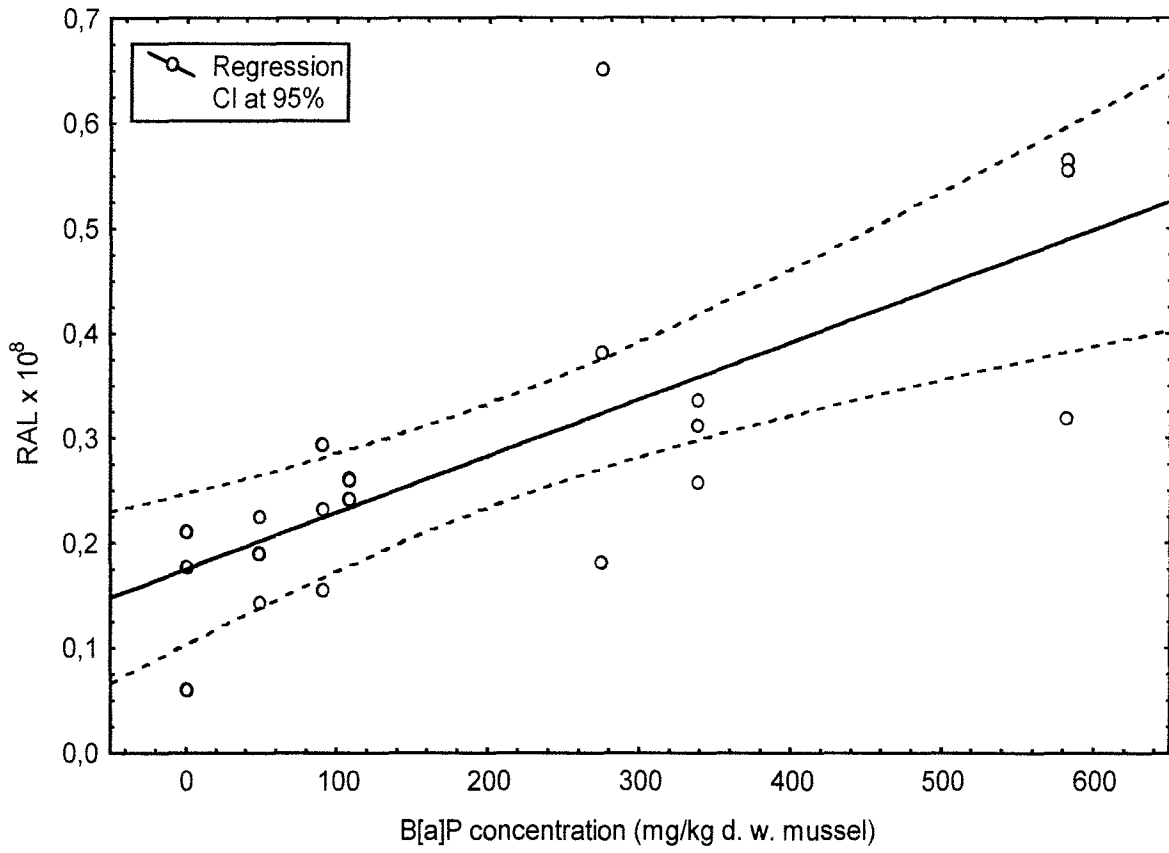
Mussel origin	DNA extraction protocol	Gills	Digestive gland
Rya de la Rosa, Spain	Phenol/chloroform SEVAG	7.3 ± 2.4 ♣ 6.6 ± 0.8	25.6 ± 4.8 ♣ 34.8 ± 9.3
Rya de la Rosa, Spain	Chaotropic Phenol/chloroform	4.8 ± 1.1 ♣ 13.9 ± 3.7	8.30 ± 2.03 ♣ 34.31 ± 9.50
Banc d'Arguin, France	Chaotropic	1.3 ± 0.6	3.5 ± 1.7

## Figure captions

Figure 1: Time-dependent formation of B[a]P-related DNA adducts in mussel gills.  $RAL \times 10^8 = 0.150 + 0.011 * \text{Exposure time (days)}$ ,  $r = 0.747$ ,  $p < 0.001$ .

Figure 2: Correlation between DNA adduct level in gill DNA and whole mussel B[a]P concentration.  $RAL \times 10^8 = 0.175 + 0.001 * \text{B[a]P concentration}$ ,  $r = 0.714$ ,  $p < 0.001$ .







## **CHAPITRE 4**

### **Cinétique de formation et d'élimination des adduits du B[a]P à l'ADN et de la 8-oxodGuo**





## I. Objectifs

Le but de ce travail était l'étude parallèle chez la moule du caractère dose-réponse de la formation d'adduits du B[a]P à l'ADN et de 8-oxodGuo. L'analyse des adduits à l'ADN a été réalisée dans les branchies en raison de leur sensibilité à former ce type de lésions à l'ADN. L'application de la méthode de post-marquage au  $^{32}\text{P}$  a été réalisée au cours d'un séjour au sein du laboratoire du Professeur Annie Leszkowicz (ENSAT, Toulouse).

Les mesures de 8-oxodGuo ont été réalisées dans les deux tissus étudiés au cours de cette thèse : la glande digestive et les branchies. Compte tenu des résultats obtenus lors de notre mise au point méthodologique, les échantillons d'ADN ont été préparés selon la méthode chaotropique. L'application d'un protocole d'extraction adapté devait en effet nous permettre d'effectuer, pour la première fois, des mesures suffisamment sensibles à l'observation d'un effet possible du B[a]P sur le niveau de 8-oxodGuo.

Pour chacun de ces types de dommages à l'ADN, l'effet d'une période d'épuration a été également étudié pour apporter des informations sur l'existence possible de mécanismes de réparation de ces lésions à l'ADN chez la moule.

## II. Matériel et méthodes

L'ensemble des informations relatives aux techniques utilisées a été décrit dans l'article 4 suivant. On peut néanmoins apporter ici, quelques informations complémentaires :

1. Parce que les niveaux d'adduits que nous avons mesuré au cours de nos expériences sont relativement faibles, nous avons choisi d'exposer les moules à des doses de B[a]P plus élevées.
2. Notre modèle d'exposition a été légèrement modifié. L'utilisation de filtres externes devait en effet permettre une maintenance plus simple des aquariums. Sur les trois doses testées (50, 75 et 100 mg B[a]P/kg p. s. moule/jour), les résultats obtenus pour la dose à 75 n'ont malheureusement pu être utilisés en raison d'un dysfonctionnement du filtre de cet aquarium qui a entraîné une forte mortalité.

## III. Résultats

Les résultats obtenus au cours de cette expérience sont présentés dans l'article 4 :

**F. Akcha, T. Burgeot, A. Pfohl-Leszkowicz, H. Budzinski, J-F. Narbonne (1999). Induction and elimination of bulky B[a]P-related DNA adducts and 8-oxodGuo in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed *in vivo* to B[a]P-contaminated feed. Soumis pour publication dans *Marine Ecology Progress Series*.**

### Résumé :

Des moules, *Mytilus galloprovincialis*, ont été exposées par la voie trophique à différentes doses de B[a]P (50 et 100 mg/kg p. s. moule/jour) pendant 21 jours. La cinétique d'accumulation du B[a]P a été déterminée dans chaque groupe et l'étude dose-réponse des adduits à l'ADN de branchies et de la 8-oxodGuo (branchies, glande digestive) a été réalisée. L'exposition a été suivie d'une période d'épuration de 10 jours au cours de laquelle les capacités de la moule à réparer les dommages à l'ADN ainsi induits ont été étudiées.

Bien que le B[a]P ait été absorbé et accumulé à de très fortes concentrations dans la moule (> 300 mg B[a]P/kg p. s. moule), aucun plateau n'a été atteint dans les deux groupes. Quelle que soit la dose de B[a]P, plusieurs adduits à l'ADN ont été induits dans la zone diagonale

radioactive typique des HAP (DRZ) et une augmentation linéaire du niveau total d'adduits avec le temps d'exposition et la concentration en B[a]P de la moule entière a été observée. Pendant la période d'épuration, l'existence de mécanismes de réparation des adduits à l'ADN chez la moule a été admise. Néanmoins, des différences de réparation ont été observées entre les adduits formés lors de l'exposition.

Alors que le B[a]P n'a aucun effet sur le niveau de 8-oxodGuo à l'ADN de branchies, une augmentation significative de cette lésion a été observée dans l'ADN de glande digestive en fonction de la dose de B[a]P appliquée. Pendant la période d'épuration, une diminution du niveau de la 8-oxodGuo jusqu'à des valeurs semblables à celles des témoins a démontré la capacité de la moule à réparer également les dommages oxydatifs à l'ADN.

L'analyse des résultats obtenus au cours de ce travail a permis de discuter la proposition des adduits à l'ADN et de la 8-oxodGuo comme biomarqueurs de génotoxicité des HAP chez la moule.

**Article numéro 4 :**

**F. Akcha, T. Burgeot, A. Pfohl-Leszkowicz, H. Budzinski, J-F. Narbonne (1999). Induction and elimination of bulky B[a]P-related DNA adducts and 8-oxodGuo in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed *in vivo* to B[a]P-contaminated feed. *Soumis pour publication dans Marine Ecology Progress Series.***

**Induction and elimination of bulky B[a]P-related DNA adducts and 8-oxodGuo in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed *in vivo* to B[a]P-contaminated feed.**

F. Akcha<sup>1</sup>, T. Burgeot<sup>2</sup>, H. Budzinski<sup>1</sup>, A. Pfohl-Leszkowicz<sup>3</sup>, J-F. Narbonne<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Physico- et Toxicochimie des Systèmes Naturels, UPRESA 5472 CNRS, Université de Bordeaux 1, Avenue des Facultés, 33405 Talence, France. E-mail: f.akcha@lptc.u-bordeaux.fr, h.budzinski@lptc.u-bordeaux.fr, jf.narbonne@lptc.u-bordeaux.fr, Tel: +(00) 33 556848732, Fax: +(00) 33 556848719.

<sup>2</sup> IFREMER, Laboratoire des Polluants chimiques, Rue de l'Île d'Yeu, 44300 Nantes Cedex, France. E-mail: Thierry.Burgeot@ifremer.fr, Tel: +(00) 33 240374051, Fax: +(00) 33 240374075.

<sup>3</sup> ENSAT, Laboratoire de Toxicologie et de Sécurité Alimentaire, Avenue de l'Agrobiopôle, BP107, Auzeville Tolosane, 31326 Castanet-Tolosane Cedex, France. E-mail: leszkowi@ensat.fr, Tel/Fax: +(00) 33 562193947.

## Abstract

Specimens of the mussel *Mytilus galloprovincialis* were exposed for 21 days to different doses of B[a]P (50 and 100 mg B[a]P/kg dry weight mussel/day) via trophic intake. The kinetics of B[a]P concentration in whole mussel tissues was determined in both groups, and a dose-response study was conducted for both gill B[a]P-related DNA adducts and 8-oxodGuo formation in gill and digestive gland DNA. Exposure was followed by a 10-day depuration period to study mussel ability to recover from induced DNA damage.

Although B[a]P was absorbed and bioaccumulated to very high concentrations in mussels (> 300 mg B[a]P/kg d. w. mussel), plateau values were not reached in either assay group. Regardless of the exposure dose of B[a]P, several bulky DNA adducts were induced in the typical PAH diagonal radioactive zone (DRZ). For both doses, a positive correlation was found between total DNA adduct level and exposure time and B[a]P concentration in whole mussel tissues. DNA repair during depuration differed among the B[a]P-induced DNA adducts.

B[a]P exposure had no effect on gill 8-oxodGuo level, but led to a significant dose-dependent increase in the number of oxidative lesions in mussel digestive gland DNA. The decrease with depuration in digestive gland 8-oxodGuo levels to control values was indicative of mussel ability to recover from oxidative DNA damage.

Key words: B[a]P, mussel, DNA adducts, 8-oxodGuo, DNA repair

## Introduction

Presence of various pollutants in the different compartments of the marine environment (Neff, 1984, La Rocca et al, 1998, Penry and Weston, 1998, Regoli, 1998) may cause pathologies, including cancer, by accumulation in living organisms (Gardner, 1993), and some have been proved carcinogenic for rodents and man (Cavalieri and Rogan, 1992, Borlak et al, 1996). In mollusks, a cause-effect relationship has been clearly demonstrated in field and laboratory studies between exposure to pollutants [polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), chlorinated hydrocarbons, polychlorobiphenyls (PCBs), heavy metals] and the development of histopathological lesions and tumors (Yevich et al, 1987, Auffret, 1988, Gardner et al, 1991, 1992). Conduction of more extensive studies in fish tended to extend the theory of mammalian chemical carcinogenesis (Barrett, 1992) to marine organisms. In benthic fish, positive correlation has been found *in situ* between the development of hepatic neoplasms and PAH concentration in sediment (Landahl et al, 1990, Myers et al, 1994). Cancerous lesions have been induced in the laboratory following exposure to some PAHs, including benzo[a]pyrene (Hendricks et al, 1985, Fong et al, 1993), and *K-ras* oncogenes have been activated in induced neoplasms (Wirgin et al, 1989, Mac Mahon et al, 1990, Fong et al, 1993). As predominant pollutants in the environment, PAH-induced DNA damage has been extensively studied in vertebrates for the model compound B[a]P (Colapietro et al, 1993, Cheng et al, 1996, De Vries et al, 1997). As causes of mutations and potential initiators of the multi-stage cancer process, DNA adduct formation (Jelinsky et al, 1995, Shukla et al, 1999) and DNA base oxidation (Kuchino et al, 1987, Cheng et al, 1992), *e. g.* 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo), have been proposed respectively as biomarkers of genotoxicity (La and Swenberg, 1996) and genotoxicity/oxidative stress in vertebrates (Shigenaga and Ames, 1991, Simic, 1994).

The present study was conducted in the context of a research program on B[a]P-induced DNA damage involving the formation of bulky DNA adducts and 8-oxodGuo in *Mytilus species* used as sentinel organisms for biomonitoring of the marine environment (Goldberg, 1975, Viarengo and Canesi, 1991). The purpose of the program was to determine whether these types of DNA damage can be used as biomarkers of PAH genotoxicity in mussels.

Initially, in this program, a B[a]P exposure model was developed for the mussel *Mytilus galloprovincialis* via trophic supply (Akcha et al, 1999a). The suitability of this model for

DNA adduct analysis was validated by confirming B[a]P bioavailability for the exposed organisms and covalent binding of [<sup>3</sup>H]-B[a]P to gill and digestive gland DNA.

Mussels were then exposed for 28 days to a daily theoretical dose of B[a]P (50 mg/kg d. w. mussel) corresponding to the highest total PAH concentration recorded in these animals by French biomonitoring networks. Bulky B[a]P-related DNA adducts were measured in the digestive gland by the nuclease P1-enhanced <sup>32</sup>P-postlabeling assay (Akcha et al, 1999b). Enzymatic biomarkers were also measured to assess the metabolic state of the exposed organisms. Two adducts were induced during the experiment, respectively from day 3 and 24 of exposure. Total adduct level increased significantly with time and was correlated with B[a]P concentration in whole mussel tissues. Benzo[a]pyrene Hydroxylase (BPH), DT-diaphorase (DTD), Catalase (CAT) and Acetylthiocholine esterase (AChE) activities were significantly correlated with adduct level and B[a]P concentration. Significant increase and decrease respectively in CAT and DTD activities were considered to indicate increased production of reactive oxygen species (ROS), qualifying this model for the study of the effects of B[a]P exposure on 8-oxodGuo formation in the mussel.

The levels of B[a]P-related DNA adducts and 8-oxodGuo were then studied in mussel gill DNA (Akcha et al, 1999c). Time-related increase in total DNA adduct level and correlation with B[a]P concentration were also demonstrated in gills. Although the adduct pattern was the same as in digestive gland, significantly higher levels of adducts were recorded in gill than digestive gland DNA, suggesting that gills have greater sensitivity to adduct formation and may allow an earlier detection of B[a]P genotoxic effects. A high performance liquid chromatography/electrochemical detection (HPLC/ED) assay detected no effects of B[a]P exposure on 8-oxodGuo level in mussel gill DNA, possibly because of artefactual oxidation of the samples during the workup process, resulting in a high background level inadequate for observation of subtle B[a]P-effects. A methodological study clearly indicated the effect of DNA extraction protocol on measured levels of 8-oxodGuo and the chaotropic method developed by Helbock et al (1998) appeared to be more suitable for the measurement of DNA base oxidation in mussel (Akcha et al, 1999c).

The present work focused on a dose-response study of both gill B[a]P-related DNA adducts and gill and digestive gland 8-oxodGuo formation. Mussels were exposed to B[a]P for 21 days, followed by a 10-day depuration period to assess their ability to recover from genotoxic damage. With regard to our previous findings, results presented in this paper were discussed

on the possible applications in mussels of both biomarkers for the biomonitoring of the marine environment.

## **Material and methods**

### **Chemicals**

#### *HPLC/ED assay:*

Deferoxamine mesylate, RNase A, protease, sodium iodide, alkaline phosphatase, isopropanol, chloroform, 2'-deoxyguanosine and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine were purchased from Sigma-Aldrich Chemical; nuclease P1 and RNase T1 from Roche Molecular Biochemicals; and methanol from Riedel-de-Haën AG.

#### *P<sup>32</sup> Post-labeling assay:*

RNase A, RNase T1, proteinase K, bovine spleen phosphodiesterase and micrococcal nuclease were purchased from Sigma-Aldrich Chemical; nuclease P1 and polynucleotide kinase T4 from Boehringer Mannheim; [ $\gamma^{32}$ ]ATP (specific activity 5 mCi/ml) from Amersham Pharmacia Biotech; rotiphenol (Tris-HCl saturated phenol) from Carl Roth GmbH; isoamyl alcohol and chloroform from Prolabo; cellulose from Machery Nagel; polyethylenimine from Virginia Chemical; photographic films, revealing and fixative solutions from Eastman Kodak; and intensifying screens from Dupont de Nemours.

Marine Liquify was obtained from Interpet, and perdeuterated B[a]P from MSD Isotopes. All other reagents were of analytical grade.

### **Animal treatment**

Specimens of the mussel *Mytilus galloprovincialis*, purchased at La Teste (Atlantic Ocean, France) from Les Viviers d'Aquitaine, were originally from Rya de la Rosa (Gallice, Spain) and were kept in wet docks before being commercialized. In the laboratory, the animals were selected to form a group homogeneous in size. Three groups of 122 individuals were constituted and kept in glass aquariums filled with 35 ‰ seawater. Water (1 l per individual) was pumped from the Bay of Arcachon and oxygenated by a common air-bubbler system. Water temperature was stabilized at 17°C by an air conditioner. Mussels were fed daily (24 mg equivalent d. w./individual) with Marine Liquify, a commercial nutritive solution for marine invertebrates. Feed was distributed to each aquarium 8 h per day by a peristaltic pump. During the rest of the day, water was filtered through an active charcoal (Actikool) column by an external pump (Rena, 9l/min). Thus, water was never renewed during the experiment.



After one week of acclimation, mussels were contaminated with B[a]P via their feed supply. One group was used as a control, and the other two were exposed respectively to a daily theoretical individual dose of 50 and 100 mg B[a]P/kg d. w. The first dose was representative of the highest total PAH content recorded in *Mytilus galloprovincialis* from the French Mediterranean coasts (RNO, 1995). Considering the relatively low adduct levels induced in mussels with this dose (Akcha et al, 1999b, 1999c), a second higher dose was used for experimental purposes.

The contamination experiment lasted 21 days and was followed by a 10-day depuration period. Samples were collected in each aquarium at day 3, 10 and 21 of exposure and at day 5 and 10 of depuration. Day 0 samples were collected at the end of the acclimation period by taking animals in all four tanks. An estimated mortality of 10% was assumed for the sampling program. At each sampling point, 12 individuals were collected for GC/MS analysis of the B[a]P concentration in whole mussel tissues. Three pools of 3 individual tissues were also sampled for measurement of both bulky DNA adducts in gills and 8-oxodGuo in gill and digestive gland DNA.

### **Chemical analysis of whole mussel tissues**

Focused microwave (FMW)-assisted extraction of freeze-dried tissues was performed at a frequency of 2450 MHz using a Maxidigest 350 apparatus (Prolabo, France) with programmable heating power (from 30 W to 300 W). The freeze-dried samples (100 mg for contaminated samples and 3 g for blanks), were placed in duplicate in extraction vessels with 30 to 40 ml of dichloromethane for microwave irradiation. Internal perdeuterated standard (B[a]Pd<sub>12</sub>) was added for quantification before irradiation.

The total organic extract of each sample was reduced to a small volume using a rotary evaporator and fractionated onto alumina and silica microcolumns for separate collection of saturated and aromatic compounds, as described by Baumard et al. (1997). Normal-phase HPLC analysis was then performed on a 5-mm Spherisorb aminosilane (NH<sub>2</sub>) column (20 cm length, 4.7 mm i.d) eluted with n-pentane (2 ml/min) and followed with a UV-detector (Spectromonitor II, LDC) set at 254 nm. Aromatic fractions were collected, gently reduced in volume under nitrogen gas flow and subjected to gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis using an HP5890 series II gas chromatograph coupled to an HP5972 MSD mass spectrometer. The gas chromatograph was equipped with a splitless injector (purge delay 30 s, purge flow 60 ml/min, injection temperature = 270°C). The column used was a PTE5 (Supelco, France), 60 m x 0.2 mm i.d x 0.1 µm film thickness. Helium was used as

carrier gas at a rate of 1 ml/ min. The column was kept at 50°C for 2 min, programmed to 290°C at 5°C/min, and finally maintained at 290°C for 10 min. The interface was at 290°C. The mass spectrometer was operated under the selected ion monitoring mode (SIM) using the molecular ions of the studied PAH (electron impact at 70 eV, 2000 V, 1 scan/s). Quantification of B[a]P in each sample was performed accordingly to perdeuterated B[a]Pd<sub>12</sub>. The response factor was calculated with standard solutions.

### **8-oxodGuo measurement**

#### DNA extraction

The method applied was derived from that of Helbock *et al.* (1998). Typically, 100-150 mg of tissue per sample were homogenized in 2 ml buffer A (320 mM sucrose, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM deferoxamine mesylate, 1 % triton X-100, pH 7.5) and centrifuged at 1,500g for 10 min at 4°C. The supernatant was then discarded and the pellet washed with 2 ml buffer A. Following centrifugation for 10 min at 1,500g, the pellet was recovered and resuspended in 600 µl 5 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, 0.15 mM deferoxamine mesylate (pH 8). After addition of 35 µl 10 % SDS, RNA digestion was performed by incubation with 60 µg RNase A and 10 U RNase T1 for 15 min at 50°C. Protein digestion was carried out by incubation with 600 µg protease for 1 h at 37°C. The sample was then centrifuged at 5,000g for 15 min at 4°C, and the supernatant was recovered in a 5-ml sterile tube. Following addition of a 1.2 ml sodium iodide solution (20 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 7.6 M NaI, 40 mM Tris-HCl, 0.3 mM deferoxamine mesylate, pH 8) and 2 ml isopropanol, the tube was centrifuged for 15 min at 5,000g. The pellet was then recovered and resuspended in 2 ml 40 % isopropanol. Following centrifugation, the pellet was washed in 2 ml 70 % ethanol and resuspended in 100 µl 0.1 mM deferoxamine mesylate. Samples were stored at -20°C prior to digestion.

#### HPLC/ED assay

The 100 µl DNA solution was entirely digested to deoxyribonucleosides. After addition of 10 U nuclease P1 (1U/µl in 300 mM sodium acetate, 1 mM ZnSO<sub>4</sub>, pH 5.5) and 1U alkaline phosphatase, samples were incubated for 90 min at 37°C. Proteins were precipitated with 100 µl chloroform. Then, the samples were centrifuged at 10,000g for 5 min, and the supernatants recovered for injection.

8-oxodGuo determination was carried out by HPLC (System Gold 118, Beckman) coupled to electrochemical detection (Kontron 405). Separation of 8-oxodGuo from 2'-deoxyribonucleosides was performed on an Ultrasphere C18 pre-column (Interchrom, ODS,

45 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) and an Uptisphere column (Interchrom, ODB, 250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m). Elution was performed in isocratic mode using a mobile phase composed of methanol 10%, citric acid 10 mM, sodium acetate 25 mM, sodium hydroxide 30 mM and acetic acid 10 mM. The elution flow rate was set at 1ml/min. The detection sensitivity of the electrochemical detector was 1 nA/V for an oxidation potential of 650 mV. 8-oxodGuo quantification was done in accordance with a calibration curve previously obtained with known pmole amounts of authentic 8-oxodGuo. For standard expression in number of 8-oxodGuo residues per  $10^5$ dGuo, deoxyguanosine was also quantified by coupling a UV detector (System Gold 166, Beckman) at the output of the HPLC column. The UV apparatus was set at a wavelength of 260 nm. A calibration curve was also obtained for this compound in the nmole range. For the conditions described, the retention times of both 8-oxodGuo and dGuo were around 20 and 15 min respectively.

### **Measurement of bulky B[a]P-related DNA adducts**

#### **DNA extraction**

Samples were homogenized in SET buffer (0.1 M NaCl, 20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8) (1g/ml) using a potter. After addition of 200  $\mu$ l 10% SDS, the homogenates were incubated 30 min at 65°C and then 800  $\mu$ l 6M acetate potassium, pH 5, were added. The homogenates were kept in ice for 30 min. After centrifugation at 13,000 rpm for 25 min at 15°C, supernatants were recovered in 15-ml Falcon tubes, and DNA was precipitated by adding double volumes of cold absolute ethanol and overnight storage at -20°C. For each sample, DNA filaments were recovered in a 2-ml eppendorf tube by pipeting or progressive centrifugation (13,000 rpm, 10 min, 0°C) of the entire Falcon tube content. Eppendorf tubes were then centrifuged (13,000 rpm, 10 min, 0°C), and the DNA pellets washed with 1 ml 90% cold ethanol. Following centrifugation at 13,000 rpm for 15 min at 0°C, pellets were dissolved in 500  $\mu$ l of SET buffer for enzyme digestion. RNA and protein digestions were performed by incubation of each sample with respectively 400  $\mu$ g RNase A and 200 UI RNase T1 for 2h at 37°C and 500  $\mu$ g proteinase K for 1 h at 37°C. DNA was then extracted twice with 500  $\mu$ l of Tris-HCl saturated-phenol. After 20 min of reverse agitation, tubes were centrifuged at 13,000 rpm for 5 min at 20°C, and the supernatants recovered in 2-ml eppendorf tubes. DNA extraction was finally performed by adding 500  $\mu$ l of glacial home-made SEVAG (chloroform: isoamyl alcohol, 24:1). After 40 sec of vortex agitation, samples were centrifuged (13,000 rpm, 5 min, 20°C) and the supernatants recovered in 2-ml eppendorf

tubes. DNA was then precipitated by addition of 2 volumes of cold absolute ethanol, 50  $\mu$ l 3 M sodium acetate pH 5 and overnight storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Following centrifugation (13,000 rpm, 30 min,  $0^{\circ}\text{C}$ ), DNA pellets were washed 4 times with 80% cold ethanol and finally dissolved in 200  $\mu$ l of MQ water. After incubation for at least 1h at  $37^{\circ}\text{C}$ , qualitative and quantitative analysis of DNA samples was performed by UV spectrophotometry (1 OD = 50  $\mu$ g DNA/ml,  $\lambda$  max = 258-260 nm) (Genesys5, Bioblock). For each sample, an aliquot of 7  $\mu$ g DNA was prepared and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  prior to use.

### $^{32}\text{P}$ post-labeling assay

For each DNA sample, a volume corresponding to 7  $\mu$ g DNA was defrosted at room temperature and then brought to dryness by a speedvac (ADN Savant, Bioblock). For each sample, DNA was digested into 3'-monophosphate deoxyribonucleosides (dNps) by incubation for 4 h at  $37^{\circ}\text{C}$  with 10  $\mu$ l of an hydrolyze solution composed of bovine spleen phosphodiesterase (183 mU) and micrococcal nuclease (12 mU) in 20 mM succinate, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 6. Normal dNps were then dephosphorylated by incubation for 45 min at  $37^{\circ}\text{C}$  with 5  $\mu$ l of a solution composed of nuclease P1 (6  $\mu$ g) in 1 mM  $\text{ZnCl}_2$  and 0.5 M sodium acetate, pH 5. Reaction was stopped by the addition of 3  $\mu$ l of 500 mM Tris-base. Adducted dNps were then labeled by incubation for 45 min at  $37^{\circ}\text{C}$  with 2  $\mu$ l of bicine buffer (800  $\mu$ M bicine, 400 mM dithiothreitol, 400 mM  $\text{MgCl}_2$  and 44 mM spermidine, pH 9.8) and 4.5  $\mu$ l of a mix containing 70  $\mu$ Ci of  $[\gamma^{32}]\text{ATP}$  and 2.8 U of polynucleotide kinase T4.

Multidimensional migration of each sample was conducted on home-made polyethylenimine (PEI) TLC (Thin Layer Chromatography) plates. Migration of each sample was performed in a solvent system composed of **D1** 2.3 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 5.7 (16 h migration), after transfer contact **D2** 7.7 M urea, 4.8 M lithium formate, pH 3.5 in the same direction as D1 (pre-migration with MilliQ water, 3 h migration), **D3** 1 M lithium chloride, 8 M urea, 0.5 M Tris, pH 8 in perpendicular direction to D2 (2h30 migration), and **D4** 1.7 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6, in the same direction as D3 (pre-migration with milliQ water, at least 2h migration).

Autoradiography of the TLC plates allowed qualitative analysis of the bulky B[a]P-related DNA adducts of each sample. Quantification of radioactive spots was performed by an AMBIS Radioanalytical Scanning System (Lablogic), and the results were expressed as the number of adducts per  $10^8$  normal nucleotides (relative adduct labeling, RAL). Control samples were analyzed at day 0 and day 21 to confirm the absence of unrelated B[a]P-DNA adducts.

### **Statistical analysis**

Time-course data for B[a]P concentration in mussels from both assay groups were analyzed by calculating mathematical regression and B[a]P uptake rates.

Data for 8-oxodGuo and DNA adducts were analyzed at each sampling point by one-way ANOVA (Statistica Inc. Software), taking the exposure dose of B[a]P as a factor. Variance homogeneity had been previously checked by the Hartley test, and a Newman Keuls test was performed each time an effect was found to be significant. To assess the effect of depuration, Student's *t*-tests were performed when relevant. For both 8-oxodGuo and DNA adduct levels, correlations with B[a]P exposure time and whole mussel tissue B[a]P concentration were determined by calculating a mathematical regression. The mathematical models proposed in this paper were the simplest ones that significantly explained the observed value dispersion.

## **Results**

### **B[a]P bioaccumulation**

For both tested doses, a linear increase with exposure time in B[a]P concentration was recorded in whole mussel tissues (Figure 1). In both experimental groups, the B[a]P concentrations reached at the end of the 21 days of exposure were quite high: 340.39 and 428.63 mg/kg d. w. for groups exposed respectively to 50 and 100 mg B[a]P/kg d. w. mussel/day. Regarding the calculated rates of B[a]P uptake (Table 1), a decrease was observed between day 10 and 21 of exposure in the higher dose group. Except for lower uptake between day 3 and day 10 of exposure, no similar decrease was measured in half-dosed animals at the end of the exposure period.

The decrease in B[a]P concentration after the depuration period was not obvious in either group. In animals exposed to 50 mg B[a]P/kg d. w. mussel/day, decreases of 18 and 7% were measured after respectively 5 and 10 days of depuration. In the group exposed to 100 mg B[a]P/kg d. w. mussel/day, B[a]P concentration was still increased by 10% after 5 days of depuration, whereas a decrease of 6% was recorded at day 10. A lack of standard deviation values for these data did not allow the statistical significance of the results to be tested.

### **8-oxodGuo measurement**

Raw data on 8-oxodGuo measurement in both gill and digestive gland DNA are shown in figure 2.

### *Gill DNA*

Results for the different ANOVA performed are summarized in table 2. Regardless of the B[a]P dose and exposure time tested, no effect of B[a]P on 8-oxodGuo level was detected in mussel gill DNA.

### *Digestive gland DNA*

Results for statistical analysis performed are summarized in table 3. A significant effect of B[a]P effect on the 8-oxodGuo level of mussel digestive gland DNA was recorded in both assay groups. B[a]P exposure produced a significant dose-dependent increase in lesions. For animals exposed to 50 mg B[a]P/kg d. w. mussel/day, the increase was significant from day 10 of exposure, whereas those exposed to 100 mg B[a]P/kg d. w. mussel/day showed increased levels only at this date. Following the depuration period, 8-oxodGuo levels of mussels exposed to the lower B[a]P dose decreased significantly, reaching control values as early as day 5 of depuration.

In animals exposed to 50 mg B[a]P/kg d. w. mussel/day, mean 8-oxodGuo level increased linearly both with exposure time [ $8\text{-oxodGuo}/10^5 \text{ dGuo} = 0.55 \times \text{time (day)} + 6.98$ ,  $df = 10$ ,  $R = 0.882$ ,  $p < 0.001$ ] and B[a]P concentration in whole mussel tissue (Figure 3). For animals exposed to a double B[a]P dose, the mean 8-oxodGuo level was also correlated both with time [ $8\text{-oxodGuo}/10^5 \text{ dGuo} = -0.01 \times \text{time (day)}^3 + 0.141 \times \text{time (day)}^2 - 0.69 \text{ time (day)} + 8.30$ ,  $df = 10$ ,  $R = 0.651$ ,  $0.02 < p < 0.01$ ] and B[a]P concentration (Figure 3), but in a more complex manner. For the higher dose, the relationship between 8-oxodGuo level and mussel B[a]P content showed three possibilities: 1) for exposure levels corresponding to a B[a]P mussel content lower than 100 mg/kg d. w. mussel, digestive gland 8-oxodGuo level remained unchanged; 2) for higher exposure levels corresponding to a B[a]P mussel content between approximately 100 and 340 mg/kg d. w. mussel, the 8-oxodGuo level of mussel digestive gland was significantly increased; 3) above this B[a]P mussel content limit, the 8-oxodGuo level decreased significantly, reaching control values for concentrations above 400 mg/kg d. w.

### **B[a]P-related DNA adducts in mussel gill DNA**

Raw data on gill DNA adduct levels are shown in Figure 4. Although no adducts were observed in control samples, several distinct spots in the diagonal radioactive zone were recorded on TLC plates from exposed animals (Figure 5). Adducts 1, 2 and 6 were predominant in both groups, appearing as early as day 3 in animals exposed to 100 mg

B[a]P/kg d. w. mussel/day. Adducts 1 and 2 were the only ones still present in the latter group at the end of the 10-day depuration period, whereas some additional faint spots remained in mussels exposed to a half-dose.

No differences between the two tested doses were found for total or individual adduct levels during the exposure and depuration periods ( $p > 0.05$ ). In both groups, total DNA adduct level increased linearly with B[a]P exposure time:  $RAL/10^8 \text{ dNps} = 0.14 \times \text{time (day)} - 0.11$ ,  $df = 6$ ,  $R = 0.788$ ,  $0.02 < p < 0.05$  and  $RAL/10^8 \text{ dNps} = 0.19 \times \text{time (day)} - 0.10$ ,  $df = 6$ ,  $R = 0.904$ ,  $0.001 < p < 0.01$  for the groups exposed respectively to 50 and 100 mg B[a]P/kg d. w. mussel/day. For both groups, a positive correlation between total DNA adduct level and whole mussel tissue B[a]P concentration was also found:  $RAL \times 10^8 \text{ dNps} = 0.01 \times \text{B[a]P concentration (mg/kg d. w.)} + 0.05$ ,  $df = 6$ ,  $R = 0.760$ ,  $0.02 < p < 0.05$  and  $RAL \times 10^8 \text{ dNps} = 0.01 \times \text{B[a]P concentration (mg/kg d. w.)} - 0.21$ ,  $df = 6$ ,  $R = 0.879$ ,  $0.01 < p < 0.001$  for groups exposed respectively to 50 and 100 mg B[a]P/kg d. w. mussel/day.

No significant decreases in the level of total DNA adducts were observed in the group exposed to 50 mg B[a]P/kg d. w. mussel/day after 5 ( $t = 0.22$ ,  $df = 2$ ,  $p > 0.05$ ) and 10 ( $t = 0.11$ ,  $df = 2$ ,  $p > 0.05$ ) days of depuration. For animals exposed to a double B[a]P dose, the decrease was not significant at day 5 of depuration ( $t = 0.95$ ,  $df = 2$ ,  $p > 0.05$ ), but became significant at day 10 ( $t = 4.53$ ,  $df = 2$ ,  $p > 0.05$ ).

## Discussion

### B[a]P bioaccumulation in mussel tissues

The results in this study confirm our previous findings (Akcha et al, 1999b) concerning the absorption and bioaccumulation of feed-incorporated B[a]P to very high concentrations in mussels. As already reported in the literature, mussels can accumulate organic micropollutants such as PAHs via the water column, in sediment or by trophic intake (Narbonne et al, 1992, Eertman et al, 1995, Björk and Gilek, 1996). In the present experiment, B[a]P concentrations in mussels were nearly ten times as high as the total PAH concentrations reported in these organisms by the French biomonitoring network (Réseau National d'Observation, RNO). In its surveillance of French coastal pollution, the RNO has been measuring the concentrations of several representative pollutants in bivalves since 1979. Hence, mean total PAH concentration in mussels ranged from less than 2 mg/kg d. w. mussel (Mont Saint Michel

Bay) to 54.4 mg/kg d. w. mussel (Cannes-Villefranche area) during the 1979-1993 sampling period (RNO, 1995). Although, the concentrations recorded in mussels during the present experiment were higher than those ordinarily found in the marine environment due to the aim of the study to induce DNA adducts on a short experimental period, plateau values were not reached in either assay group. The increase in concentration with exposure time fitted a linear mathematical model in both cases, as demonstrated in a field transplantation study for lower PAH concentrations (Mix et al, 1981).

As the second dose tested in our experiment (100 mg B[a]P/kg d. w. mussel/day) was twice as high as the first one, the absolute final B[a]P concentration in mussels could have been expected to be twice as high. Yet, despite an uptake rate at least twice as high as that of half dosed mussels, B[a]P uptake decreased from day 10 of exposure in animals exposed to a double dose. This decrease accounted for the relatively minor difference in B[a]P concentrations in mussels between the two tested doses at the end of the exposure period. Despite the time-related validation of a linear regression model in this group, such a decrease may indicate that mussel ability to bioconcentrate B[a]P gets closed to saturation. Although our preliminary study showed that digestive gland had a high concentration of B[a]P because of its primordial role in biotransformation (Akcha et al, 1999a), unmetabolized B[a]P is thought to be mainly bioconcentrated in mussel lipid-rich compartments such as the mantle and gonads. As a decrease in mussel dry weight was previously observed with our model (Akcha et al, 1999b), it is possible that saturation was expressed prematurely because of a decrease in the lipid content available for storage. Another possible explanation is a survival-adaptive response of mussel to B[a]P toxicity through a reduction in the filtration rate or by shell closure. However, it is noteworthy that the B[a]P concentrations recorded in this study were well above the given mussel tissue concentration producing a 50% reduction of the clearance rate (16 mg B[a]P/kg d. w.) (Eertman et al, 1995).

Because of a lack of standard deviation values for our chemical data, the effect of depuration on B[a]P concentration could not be assessed statistically. Although a slight decrease of 6-7% was estimated for both assay groups at the end of the depuration period, B[a]P depuration did not appear to be efficient. These results are not consistent with published data (Dunn and Stich, 1976, Mix et al, 1991, Björk and Gilek, 1996, Moy and Walday, 1996) or with our previous findings showing that exposure of mussels for 13 days to a mixture of [ $H^3$ ]B[a]P/B[a]P (50 mg/kg d. w. mussel/day) led with depuration to a decrease of respectively 73 and 32 % in digestive gland and gill tissues (Akcha et al, 1999a). In the latter



study, although no decrease in B[a]P concentration was noted in the mantle, B[a]P depuration in whole mussel tissues was however expected to be efficient taking into account tissue weight distribution. As a matter of fact, B[a]P concentration in whole mussel tissues decreased in another study by 19 and 35 % respectively following a 4 day depuration period in animals exposed to the same dose for 22 and 25 days (Akcha et al, 1999b). In the present study, a decrease in mussel filtration activity may have been responsible for the low depuration observed.

### **Effect of B[a]P exposure on 8-oxodGuo level**

Among the contaminants present in the marine environment, some PAHs, nitroaromatic and agrochemical compounds (lindane, paraquat) have been identified as prooxidants in vertebrates (Livingstone et al, 1990). Thus, increased ROS production in aquatic organisms may be a mediator of toxicity for some environmental pollutants (Livingstone et al, 1990, Livingstone, 1991).

An increase in digestive gland 8-oxodGuo level after B[a]P exposure is concordant with the knowledge on mussel free radical biology. The induction of hydroxyl radical production (OH $\cdot$ ), as ultimate ROS of both Fenton and Haber-Weiss reactions, has been studied in the mussel due to its strong reactivity with cellular macromolecules, particularly DNA. Except to singulet oxygen (O $_2^1$ ), OH $\cdot$  is the only ROS that can cause DNA damage directly by producing base oxidation (Shigenaga and Ames, 1991, Cadet et al, 1997). Increased OH $\cdot$  production in mussel has been demonstrated *in vitro* in digestive gland microsomes with the model quinone, menadione (Livingstone et al, 1989, Sjölin and Livingstone, 1997), the nitroaromatic compound nitrofurantoin (Garcia Martinez et al, 1995), and several PAH quinones including 1,6-, 3,6- and 6,12-B[a]P quinones (Garcia Martinez et Livingstone, 1995, Sjölin and Livingstone, 1997). Although ROS production induced by PAH exposure has never been directly demonstrated *in vivo* in the mussel, some effects of oxidative stress have been observed *in vivo* in this organism either in term of lipid peroxidation (Moore, 1988, Livingstone et al, 1990) or DNA strand break induction (Mitchelmore and Chipman, 1998). In the mussel, the variations induced by PAH exposure in cellular antioxidant defenses are also considered to result from an increase in ROS production (Ribera et al, 1991, Solé et al, 1994). As B[a]P is metabolized *in vivo* to predominant quinones in mussels (Michel et al, 1995), the increase in digestive gland 8-oxodGuo level by B[a]P exposure is mainly explained by higher ROS production through redox cycling of quinones. As a matter of fact, mussel digestive gland displays a vertebrate-like cytochrome P450 reductase activity (Livingstone et al, 1990,

Michel et al, 1993) that may catalyze quinone reduction to semiquinone radicals with subsequent ROS production. As antioxidant defenses are greater in digestive gland than gills (Livingstone and Pipe, 1992), the absence of B[a]P effect on gill 8-oxodGuo level observed in our experiment may have been due to lower ROS production in this tissue related to lower phase I activities (Stegeman, 1985). This result is in contrast with the reported effect of waterborne B[a]P exposure (0.5 to 1000 ppb B[a]P) on the level of mussel gill 8-oxodGuo (Canova et al, 1998). In the latter study, significantly higher 8-oxodGuo levels were observed following 48 h exposure to 5, 50 and 100 ppb B[a]P and 72 h exposure to 5, 50, 100, 1000 ppb B[a]P, with values of the same order as those recorded in our study. However, the dose-response effect was not significant in the study of Canova et al (1998) due to decreased levels or the absence of any effect at intermediate/higher B[a]P concentrations.

Significant dose-dependent differences were observed in each assay group for the effect of B[a]P on digestive gland 8-oxodGuo level. The level of 8-oxodGuo was increased from day 10 in animals exposed to 50 mg B[a]P/kg d. w. mussel/day, whereas an increase was found at this date only in those exposed to a double B[a]P dose. In the former group, 8-oxodGuo level followed a linear mathematical model with exposure time and B[a]P concentration, showing an increase in the extent of oxidative DNA damage and hence in the production of ROS. However, increase was only significant in this group for B[a]P mussel content higher than 100 mg/kg d. w. mussel, which may represent an exposure level limit for the mussel in terms of its antioxidant and DNA repair abilities.

In animals exposed to a double dose of B[a]P, 8-oxodGuo levels were significantly higher at day 10, but not at day 21 anymore. At these times, B[a]P mussel content was respectively of 240 and 428 mg/kg d. w. mussel. As induction of antioxidant activities apparently occurs as early as the first days of exposure (Akcha et al, 1999b), a decrease in digestive gland 8-oxodGuo levels down to control values may be due to an induction of DNA repair mechanisms. As no decrease was observed in half-dosed animals at day 21 with a B[a]P mussel content of 340 mg/kg d. w. mussel, such an induction may coincide with an exposure level corresponding to a concentration in mussel greater than 340 mg B[a]P/kg d. w. This seems in accordance with the results obtained in mussel digestive gland DNA by Canova et al (1998), which showed a dose-response increase in digestive gland 8-oxodGuo level after 72-h exposure to concentrations ranging from 0 to 100 ppb B[a]P and decreased levels for higher concentrations (500, 1000 ppb) all leading to estimated B[a]P mussel contents greater than 387 mg/kg d. w. mussel.

In the present study, the decrease in 8-oxodGuo levels during depuration in mussels exposed to 50 mg B[a]P/kg d. w. mussel/day also suggested the existence of DNA repair mechanisms. Repair of DNA base oxidation, studied principally in *Escherichia Coli* and *Saccharomyces cerevisiae* (Girard and Boiteux, 1997, Laval et al, 1998, Wang et al, 1998), mainly involves a base excision repair (BER) mechanism (Frosina et al, 1996). Although a similar mechanism has been identified in vertebrates (Demple and Harrison, 1994), nothing is known about base oxidation repair in marine invertebrates.

### **Bulky B[a]P-related DNA adducts**

As previously demonstrated with our model, exposure of mussels to B[a]P led to induction of B[a]P-related adducts in gill DNA (Akcha et al, 1999c). Although the present study confirmed the significant linear relationship between total DNA adduct level and exposure time and whole mussel tissue B[a]P concentration, there were some differences concerning adduct levels and their pattern. In our previous experiment, two different adducts were induced in mussel gills after 28-day exposure to 50 mg B[a]P/kg d. w. mussel/day (Akcha et al, 1999c) (Figure 5). Whereas the first adduct appeared as early as day 3, the second one more diffuse appeared later, from day 24 of exposure. The maximal total DNA adduct level recorded at the end of the 28-day exposure period was  $0.480 \pm 0.139$  RAL/ $10^8$  dNps. In the present study, the number of adducts measured in gill DNA of mussels exposed to the same B[a]P dose was much greater, despite the fact that adduct induction was recorded only from day 10 of exposure. Moreover, the adduct levels recorded were up to 10 times as high as those in our previous experiment, possibly because of the use of a different version of the  $^{32}\text{P}$  post-labeling assay. In the present study, the use of a different DNA extraction protocol and of higher amounts of enzymes during the different steps of the post-labeling assay (digestion, enhancement, labeling) could have accounted for the better recovery of adducts quantitatively and qualitatively. The use of a different system of solvents for multidimensional chromatographic migration of samples certainly affected the migration of adducts, which may have been isolated in our previous experiment. Thus, adduct 1 and 2 in the present experiment could correspond to the two adducts previously described by us in mussels. Such difficulties in inter-study comparisons should be reduced by the intercalibration programs developed in recent years, e. g. the Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programs (BEQUALM).

The present study found no quantitative differences in total and individual adduct levels between the two tested doses of B[a]P, possibly because of high standard deviation values of

means obtained. The difference was not significant even at day 3 where 3 out of the 6 adducts measured were only recorded in higher-dosed animals. Analysis of pooled rather than individual samples was not sufficient to prevent from inter-individual variability. In fact, inter-individual differences in filtration and metabolic activities may lead to high variability in absorption and B[a]P activation to DNA adducts. The high standard deviations values may also have been related to the method used for adduct quantification, justifying the reason why <sup>32</sup>P post-labeling assay is still considered as a semi-quantitative method.

The appearance of adducts respectively from day 3 and 10 in animals exposed to 100 and 50 mg/kg d. w. indicates that adduct formation was induced in mussel from a B[a]P exposure level corresponding to a B[a]P mussel content comprised between 50 and 85 mg B[a]P/kg d. w. mussel. In the exposure conditions of our experiment, this concentration appears to be a limit beyond which phase II activities become insufficient to detoxify phase I B[a]P metabolites.

In both assay groups, the decrease in total DNA adduct level during depuration was not significant probably because of the high standard deviation values. However, as the decrease in adduct level during depuration was significant at one time-point (100 mg B[a]P/kg d. w. mussel/day, day 10 of depuration), it may be assumed that DNA adduct repair activities exist in mussels. This is consistent with the decrease observed during depuration in the [<sup>3</sup>H]B[a]P binding value of mussel gill DNA (Akcha et al, 1999a), and the work of Harvey and Parry (1998) who reported the removal of 4-nitroquinoline 1-oxide DNA adducts in mussel digestive gland, gills and mantle during depuration. It is noteworthy in the present study that adduct removal appeared to be efficient during depuration, despite recovery from DNA damage did not occur to the same extent for the different B[a]P-induced DNA adducts. Although depuration allowed the elimination of some adducts, a few were still present in both groups at the end of the 10-day depuration period. A similar difference in the repair process has been reported in vertebrates for the major B[a]P bulky DNA adduct, BPDE-10-N<sup>2</sup>dG, with preferential repair involving the *trans* isoform (Celotti et al, 1993, Jernström and Gräslund, 1994). Although bulky DNA adducts in vertebrates have been demonstrated to be repaired by both the nucleotide and base excision repair systems (BER, NER) and the DNA mismatch repair system, the mechanisms involved in adduct repair in mussels have not yet been elucidated.

The differences in the adduct repair process noted in the present study have important implications for biomonitoring of the marine environment. The use of DNA adducts as biomarkers of past exposure to genotoxic compounds depends on their persistence and thus on their repair ability in mussels, which is thought to be highly dependent on their chemical structure.

The results reported here, like those in our previous experiment, indicate that B[a]P absorbed by mussels is biotransformed into electrophilic metabolites that bind covalently to DNA. As adduct standards were not used in this post-labeling experiment, the B[a]P activation pathways could not be identified. However, the existence of an epoxide hydrolase activity and the identification of B[a]P-dihydrodiols as relevant *in vivo* B[a]P metabolites in mussels suggest the presence of a vertebrate-like diol-epoxide pathway (Sims et al, 1974, Grover, 1986). This assumption is supported by the identification, *in vitro* and *in vivo*, in mussels of an adduct presenting high chromatographic similarities with BPDE-10-N<sup>2</sup>dG by the butanol-enhanced <sup>32</sup>P post-labeling assay (Harvey and Parry, 1997).

### Conclusion

An increase in digestive gland 8-oxodGuo and induction of gill DNA adduct levels were recorded for B[a]P exposure levels corresponding respectively to an internal mussel content of around 100 and 50 mg/kg d. w. As B[a]P is one of the most genotoxic PAH, these limits are likely to be higher when converted into the commonly measured total PAH concentration. Taking into account the environmentally reported PAH concentration in mussels (Claisse, 1989, Amodio-Cocchieri, 1993, RNO, 1995), this raises the question on possible observation of such damages in the field. Despite DNA adduct formation was reported in PAH-environmentally exposed mussels (Venier et al, 1996, Solé et al, 1996), a lack of adduct identification has never led to the incrimination of this class of pollutants. Thus, the feasibility of using DNA adducts as biomarkers of PAH genotoxicity in mussels will require further studies.

With our model, the exposure of mussels to a lower dose of a common PAH mixture might allow a better evaluation of the potential use of both DNA adducts and 8-oxodGuo for mussel-based biomonitoring of the marine environment. As a fraction of feed-incorporated

B[a]P may desorb to the water-column, it would also seem important to study the possible effect of this process.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the IFREMER (French Research Institute for Exploitation of the Sea) and a European BIOMAR program (ENV5-CT96-0300). The authors are grateful to Karyn Le Ménach for GC/MS analysis.

## LITERATURE CITED

- Akcha F, Burgeot T, Venier P, Narbonne J-F (1999a) Relationship between kinetics of benzo[a]pyrene bioaccumulation and DNA binding in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Bull Environ Contam Toxicol 62: 455-462
- Akcha F, Izuel C, Venier P, Budzinski H, Burgeot T, Narbonne J-F (1999b) Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in B[a]P-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. Aq Toxicol, *in press*.
- Akcha F, Ruiz S, Zamperon C, Venier P, Burgeot T, Cadet J, Narbonne J-F (1999c) Benzo[a]pyrene-induced DNA damage in *Mytilus galloprovincialis*. Measurement of bulky DNA adducts and DNA oxidative damage relative to 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. Biomarkers *submitted*.
- Amodio-Cocchieri R, Del Prete U, Arnese A, Giuliano M, Roncioni A (1993) Heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) in marine organisms from the Ionian sea (Italy). Bull Environ Contam Toxicol 50: 618-625
- Auffret M (1988) Histopathological changes related to chemical contamination in *Mytilus edulis* from field and experimental conditions. Mar Ecol Prog Ser 46: 101-107
- Barrett JC (1992) Mechanisms of action of known human carcinogens. In: Vainio H, Magee PN, McGregor DB, McMichael AJ (ed) Mechanisms of Carcinogenesis in risk assessment. Internatl Agency Res Cancer, Lyon, France, p 115-134
- Björk M, Gilek M (1996) Uptake and elimination of <sup>14</sup>C-phenanthrene by the blue mussel *Mytilus edulis* L. at different algal concentrations. Bull Environ Contam Toxicol 56: 151-158
- Borlak JT, Scott A, Henderson CJ, Jenke HJ, Wolf CR (1996) Transfer of PCBs via lactation simultaneously induces the expression of P450 isoenzymes and the protooncogenes c-Ha-ras and c-raf in neonates. Biochem Pharmacol 51: 517-529
- Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL (1997) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biological significance. Rev Physiol Biochem Pharmacol 31: 1-87
- Canova S, Degan P, Peters LD, Livingstone DR, 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 399: 17-30
- Celotti L, Ferraro P, Furlan D, Zanesi N, Pavanello S (1993) DNA repair in human lymphocytes treated *in vitro* with (±)-*anti* and (±)-*syn* -benzo[a]pyrene dilepoxide.

Mutat Res 294: 117-126

- Cavalieri EL, Rogan EG (1992) The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. *Pharmacol Ther* 55: 183-199
- Chen L, Devanesan PD, Higginbotham S, Ariese F, Jankowiak R, Small GJ, Rogan EG, Cavalieri EL (1996) Expanded analysis of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed *in vitro* and in mouse skin: Their significance in tumor initiation. *Chem Res Toxicol* 9: 897-903
- Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA (1992) 8-hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G → T and A → C substitutions. *J Biol Chem* 267: 166-172
- Claisse D (1989) Chemical contamination of French coasts. *Baseline* 20: 523-528
- Colapietro A-M, Goodell AL, Smart RC (1993) Characterization of benzo[a]pyrene-initiated mouse skin papillomas for Ha-*ras* mutations and protein kinase C levels. *Carcinogen* 14: 2289-2295
- Demple B, Harrison L (1994) Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Ann Rev Biochem* 63: 915-948
- De Vries A, Dollé MET, Broekhof JLM, Muller JJA, Dinant Kroese E, Van Kreijl CF, Capel PJA, Vijg J, Van Steeg H (1997) Induction of DNA adducts and mutations in spleen, liver and lung of *XPA*-deficient/*lac Z* transgenic mice after oral treatment with benzo[a]pyrene: correlation with tumor development. *Carcinogen* 18: 2327-2332
- Dunn BP, Stich HF (1976) Release of carcinogen benzo(a)pyrene from environmentally contaminated mussels. *Bull Environ Contam Toxicol* 15: 398-401
- Eertman RHM, Groenink CLFMG, Sandee B, Hummel H (1995) Response of the blue mussel *Mytilus edulis* L. following exposure to PAHs or contaminated sediment. *Mar Environ Res* 39: 169-173
- Fong AT, Dashwood RH, Cheng R, Mathews C, Ford B, Hendricks JD, Bailey GS (1993) Carcinogenicity, metabolism and Ki-*ras* proto-oncogene activation by 7-12-dimethylbenz[a]anthracene in rainbow trout. *Carcinogen* 14: 629-635
- Frosina G, Fortini P, Rossi O, Carrozzino F, Raspaglio G, Cox LS, Lane DP, Abbondandolo A, Dogliotti E (1996) Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 271: 9573-9578
- Gardner GR, Yevich PP, Harshbarger JC, Malcom AR (1991) Carcinogenicity of Black Rock Harbor, Bridgeport, CT, sediment to the eastern oyster and trophic transfer of Black Rock Harbor carcinogens from the blue mussel to the winter flounder. *J Environ Health*



Perspect 90: 53-66

- Gardner GR, Pruell RJ, Malcolm AR (1992) Chemical induction of tumors in oysters by a mixture of aromatic and chlorinated hydrocarbons, amines and metals. *Mar Environ Res* 34: 59-63
- Gardner GR (1993) Chemically induced histopathology in aquatic invertebrates. In: Couch JA, Fournie JW (ed) *Pathobiology of marine and estuarine organisms*, p 359-391
- Garcia Martinez P, Livingstone DR (1995) Benzo[a]pyrene-dione-stimulated oxyradical production by microsomes of digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar Environ Res* 39: 185-189
- Garcia Martinez P, Winston GW, Metosh-Dickey C, O'Hara SCM, Livingstone DR (1995) Nitrofurantoin-stimulated reactive oxygen species production and genotoxicity in digestive gland microsomes and cytosol of the common mussel (*Mytilus edulis* L.). *Toxicol Appl Pharmacol* 131: 332-341
- Girard PM, Boiteux S (1997) Repair of oxidized DNA bases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimie* 79: 559-566
- Goldberg ED (1975) The mussel watch. A first step in global marine biomonitoring. *Mar Poll Bull* 6: 111
- Grover PL (1986) Pathways involved in the metabolism and activation of polycyclic hydrocarbons. *Xenobiotica* 16: 915-931
- Harvey JS, Parry JM (1997) The detection of genotoxin-induced DNA adducts in the common mussel *Mytilus edulis*. *Mutagen* 12: 153-158
- Harvey JS, Parry JM (1998) The analysis of DNA adduct formation, removal and persistence in the common mussel *Mytilus edulis* exposed to 4-nitroquinoline 1-oxide. *Mutat Res* 399: 31-42
- Helbock HJ, Beckman KB, Shigenaga MK, Walter PB, Woodall AA, Yeo HC, Ames BN (1998) DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 288-293
- Hendricks JD, Meyers TR, Shelton DW, Casteel JL, Bailey GS (1985) Hepatocarcinogenicity of benzo[a]pyrene to rainbow trout by dietary exposure and intraperitoneal injection. *J Natl Cancer Inst* 74: 839-851
- Jelinsky SA, Liu T, Geacintov NE, Loechler EL (1995) The major, N<sup>2</sup>-Gua adduct of the (+)-*anti* diol epoxide is capable of inducing G → A and G → C, in addition to G → T, mutations. *Biochem* 34:13545-13553
- Jernström B, Gräslund A (1994) Covalent binding of benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol 9,10-

- epoxides to DNA : molecular structures, induced mutations and biological consequences. *Biophys Chem* 49: 185-199
- Kuchino Y, Mori F, Kasai H, Inoue H, Iwai S, Miura K, Ohtsuka E, Nishimura S (1987) Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* 327: 77-79
- La DK, Swenberg JA (1996) DNA adducts: biological markers of exposure and potential applications to risk assessment. *Mutat. Res* 365: 129-146
- Landahl JT, McCain BB, Myers MS, Rhodes LT, Brown DW (1990) Consistent associations between hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) and polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment. *Environ Health Perspect* 89: 195-203
- La Rocca C, Conti L, Crebelli R, Crochi B, Iacovella N, Rodriguez F, Turrio-Baldassarri L, Di Domenico A (1996) PAH content and mutagenicity of marine sediments from the Venice lagoon. *Ecotoxicol Environ Safety* 33: 236-245
- Laval J, Jurado J, Saparbaev M, Sidorkina O (1998) Antimutagenic role of base-excision repair enzymes upon free radical-induced DNA damage. *Mutat Res* 402: 93-102
- Livingstone DR, Garcia Martinez P, Winston GW (1989) Menadione-stimulated oxyradical formation in digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Aquat Toxicol* 15: 213-236
- Livingstone DR, Garcia Martinez P, Michel X, Narbonne J-F, O'Hara S, Ribera D, Winston GW (1990) Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other mollusks. *Funct Ecol* 4: 415-424
- Livingstone DR (1991) Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In: Gilles DR (ed) *Advances in comparative and Environmental physiology*, Springer Verlag, Berlin, p 45-185
- Livingstone DR, Pipe RK (1992) Mussels and environmental contaminants: Molecular and cellular aspects. In: Grosling E (ed) *The mussel, Mytilus edulis: Ecology, Physiology, Genetics and culture*, Elsevier, Amsterdam, p 425-464
- MacMahon G, Huber LJ, Moore MJ, Stegeman JJ, Wogan GN (1990) Mutations in *c-Ki-ras* oncogenes in diseased livers of winter flounder from Boston harbor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 841-845
- Michel XR, Suteau P, Robertson LW, Narbonne J-F (1993) Effects of benzo(a)pyrene, 3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl on the xenobiotic-metabolizing enzymes in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Aquat Toxicol* 27: 335-344

- Michel XR, Beasse C, Narbonne J-F (1995) *In vivo* metabolism of benzo(a)pyrene in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Arch Environ Contam Toxicol 28: 215-222
- Mitchelmore CL, Chipman JK (1998) DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. Mutat Res 399: 135-147
- Mix MC, Schaffer RL, Hemingway SJ (1981) Polynuclear aromatic hydrocarbons in bay mussels (*Mytilus edulis*) from Oregon. In: Dawe CJ et al (ed) Phyletic Approaches to Cancer, Japan SCI. SOC. Press, Tokyo, p 167-177
- Moore MN (1988) Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferritin reductase in molluscan digestive gland cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. Mar Ecol Prog Ser 46: 37-43
- Moy FE, Walday M (1996) Accumulation and depuration of organic micro-pollutants in marine hard bottom organisms. Mar Poll Bull 33: 56-63
- Myers MS, Stehr CM, Olson OP, Johnson LL, McCain BB, Chan S-L, Varanasi U (1994) Relationship between toxicopathic hepatic lesions and exposure to chemical contaminants in English sole (*Pleuronectes vetulus*), starry flounder (*Platichthys stellatus*), and white croaker (*Genyonemus lineatus*) from selected marine sites on the Pacific coast, USA. Environ Health Perspect 102: 200-214
- Narbonne J-F, Ribera D, Garrigues P, Lafaurie M, Romana A (1992) Different pathways for the uptake of benzo(a)pyrene adsorbed to sediment by the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Bull Environ Contam Toxicol 49: 150-156
- Neff JM (1984) Bioaccumulation of organic micropollutants from sediments and suspended particulates by aquatic animals. Fr Z Anal Chem 319: 132-136
- Penry DL, Weston DP (1998) Digestive determinants of benzo[a]pyrene and phenanthrene bioaccumulation by a deposit-feeding polychaete. Environ Toxicol Chem 17: 2254-2265
- Regoli F (1998) Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. Arch Environ Contam Toxicol 34: 48-63
- Ribera D, Narbonne J-F, Michel X, Livingstone DR, O'Hara S (1991) Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. Comp Biochem Physiol 100C: 177-181
- RNO (1995) Le RNO: Surveillance du milieu marin. IFREMER et Ministère de l'environnement p32.
- Shigenaga MK, Ames BN (1991) Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of *in vivo* oxidative DNA damage. Free Radical Biol Med 10: 211-216

- Shukla R, Geacintov NF, Loechler FL (1999) The major, N2-dG adduct of (+)-anti-B[a]PDE induces G → A mutations in a 5'-AGA-3' sequence context. *Carcinogen* 20: 261-268
- Sims P, Grover PL, Swaisland A, Pal K, Hewer A (1974) Metabolic activation of Benzo(a)pyrene proceeds by a diol epoxide. *Nature* 252: 326-328
- Sjölin AM, Livingstone DR (1997) Redox cycling of aromatic hydrocarbon quinones catalyzed by digestive gland microsomes of the common mussel (*Mytilus edulis* L.). *Aquat Toxicol* 38: 83-99
- Solé M, Porte C, Albaigès J (1994) Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: its relation with contaminant body burdens. *Aquat Toxicol* 30: 271-283
- Solé M, Porte C, Biosca X, Mitchelmore CL, Chipman JK, Livingstone DR, Albaigès J (1996) Effects of the "Aegean Sea" oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.) *Comp Biochem Physiol* 113C: 257-265
- Stegeman JJ (1985) Benzo[a]pyrene oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel (*Mytilus edulis*) and other bivalve mollusk species from the Western North Atlantic. *Mar Biol* 89: 21-30.
- Venier P, Canova S, Levis AG (1996) DNA adducts in *Mytilus galloprovincialis* and *Zosterisessor ophiocephalus* collected from PAC-polluted and reference sites of the Venice Lagoon. *Pol Arom Comp* 11: 67-73
- Wang D, Kreutzer DA, Essigmann JM (1998) Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutat Res* 400: 99-115
- Wirgin I, Currie D, Garte SJ (1989) Activation of the K-ras oncogene in liver tumors of Hudson River tomcod. *Carcinogen* 10: 2311-2315
- Yevich PP, Yevich C, Pesch G (1987) Effects of Black Rock Harbor dredged material on the histopathology of the blue mussel *Mytilus edulis* and polychaete worm *Nephtys incisa* after laboratory and field exposures. U.S. EPA technical report D-87-8, Narragansett, RI

Table 1: Uptake rates calculated from B[a]P bioaccumulation kinetics of both assay groups

Experimental group	Exposure period	Uptake rate (mg B[a]P/kg d. w. mussel/day)
50 mg/kg d. w./mussel/day	day 0-day 3	14.57
	day 3-day 10	9.64
	day 10-day 21	20.84
	<b>day 0-day 21</b>	<b>16.20</b>
100 mg/kg d. w./mussel/day	day 0-day 3	28.86 (x 2) <sup>1</sup>
	day 3-day 10	21.99 (x 2.3)
	day 10-day 21	17.10 (x 0.8)
	<b>day 0-day 21</b>	<b>20.41 (x 1.3)</b>

<sup>1</sup>: uptake rate (100 mg/kg d. w./mussel/day)/ uptake rate (50 mg/kg d. w./mussel/day) ratio

Table 2: Results of the statistical analysis on 8-oxodGuo levels of mussel gill DNA

<b>Sampling point</b>	<b>ANOVA result</b>	<b>Conclusion</b>
day 3 of exposure	$F = 0.9, df = 3/8, p > 0.05$	No difference between control and assay groups
day 10 of exposure	$F = 1.2, df = 3/8, p > 0.05$	No difference between control and assay groups
day 21 of exposure	$F = 0.2, df = 3/8, p > 0.05$	No difference between control and assay groups
day 5 of depuration	$F = 0.3, df = 2/6, p > 0.05$	No difference between control and assay groups
day 10 of depuration	$F = 3.2, df = 2/6, p > 0.05$	No difference between control and assay groups

Table 3: Results of the statistical analysis on 8-oxodGuo levels of mussel digestive gland DNA

Sampling point	ANOVA result	Conclusion
day 3 of exposure	$F = 0.2, df = 3/8, p > 0.05$	No difference between control and assay groups
day 10 of exposure	$F = 5.5, df = 3/8, p = 0.02$	Significantly higher 8-oxodGuo levels in both assay groups <sup>1</sup>
day 21 of exposure	$F = 13.4, df = 3/8, p < 0.001$	Significantly higher 8-oxodGuo levels in animals exposed to 50 mg B[a]P/kg d. w. mussel/day <sup>1</sup>
day 5 of depuration	$t = 5.8, df = 4, 0.01 < p < 0.001$	Significant decrease of 8-oxodGuo levels with time of depuration in animals exposed to 50 mg B[a]P/kg d. w. mussel/day
	$t = 0.79, df = 4, p > 0.05$	Decrease of 8-oxodGuo levels to control values for animals exposed to 50 mg B[a]P/kg d. w. mussel/day
day 10 of depuration	$t = 0.00, df = 4, p > 0.05$	No difference in 8-oxodGuo levels between control animals and that exposed to 50 mg B[a]P/kg d. w. mussel/day

1: in comparison with levels recorded in control mussels

Figure 1: B[a]P concentration kinetics in whole mussel tissues following exposure to 50 (A) and 100 (B) mg B[a]P/kg d. w. mussel/day (control values closed to 0 are represented by the bold line). In both groups, increase in B[a]P concentration with time of exposure follows a linear mathematical model (C and D respectively)

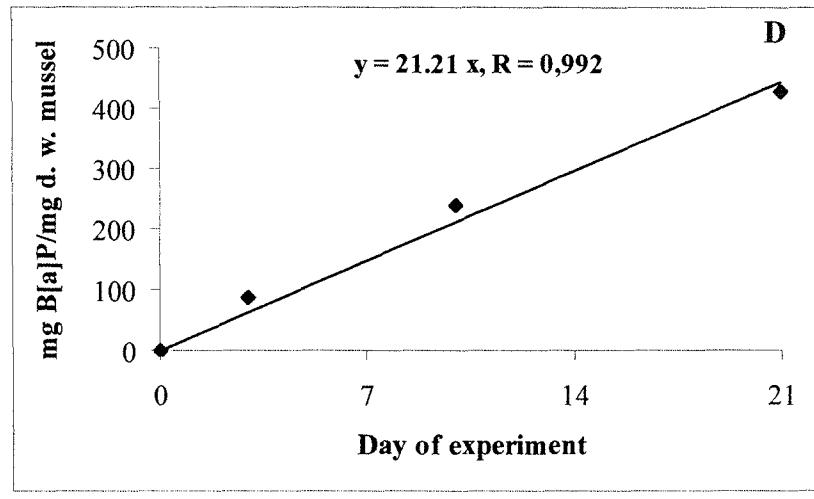
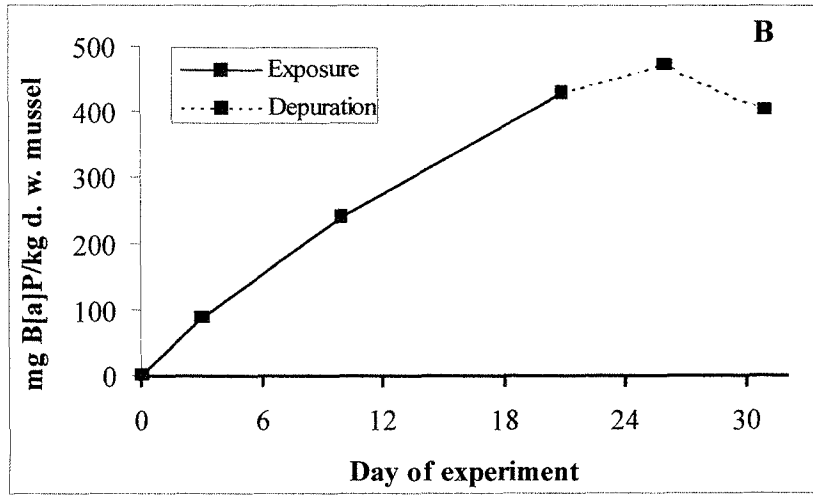
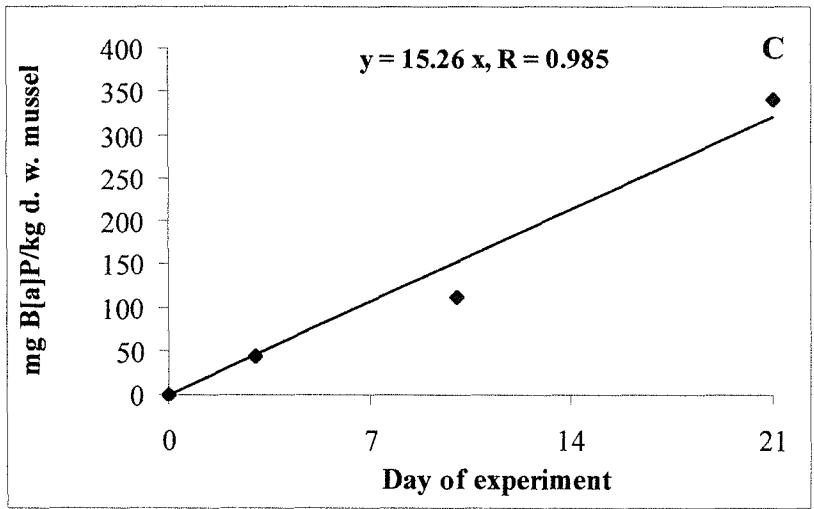
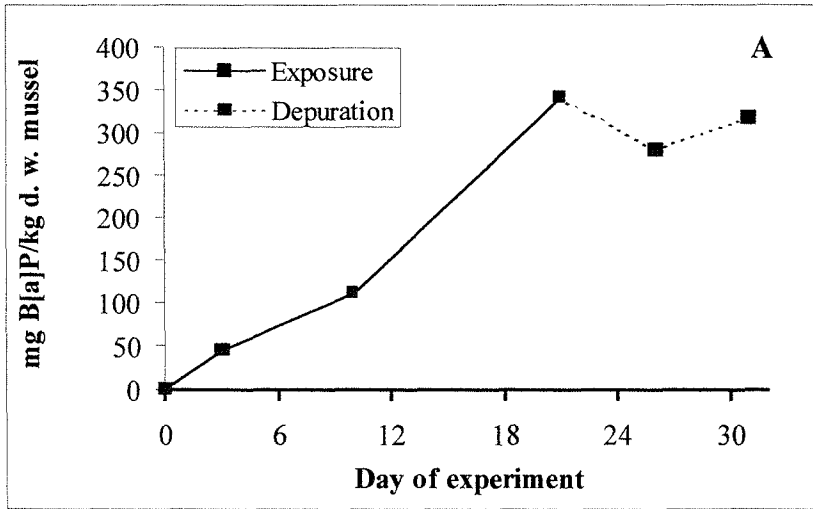




Figure 2: Mean 8-oxodGuo level measured in mussel gill and digestive gland DNA by HPLC-ECD assay

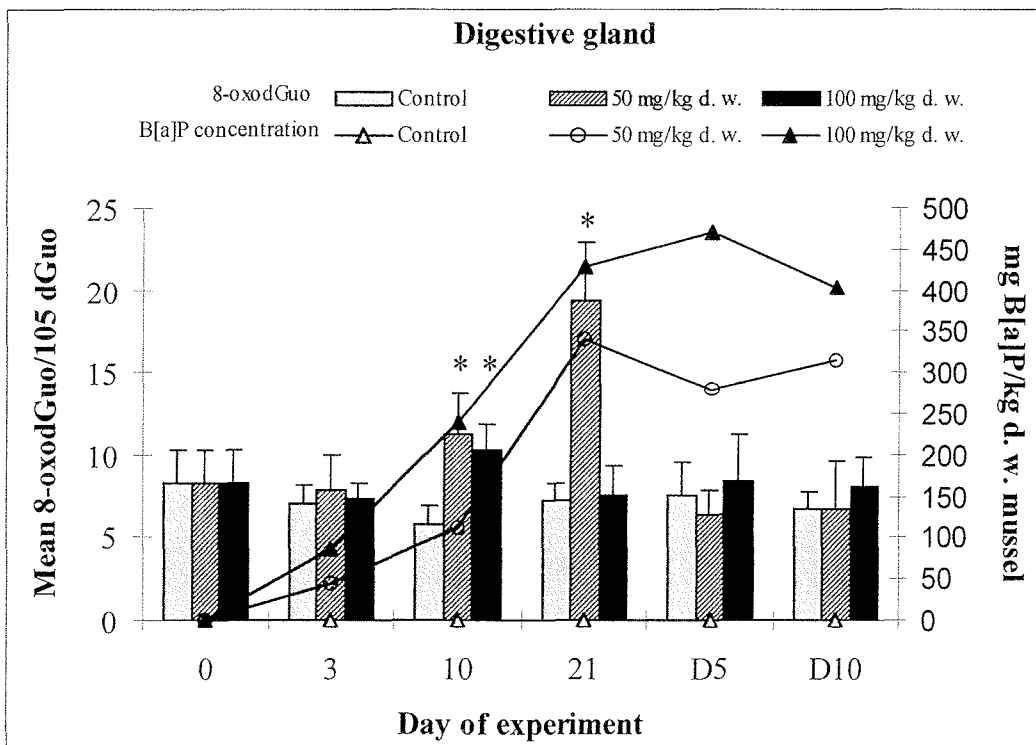
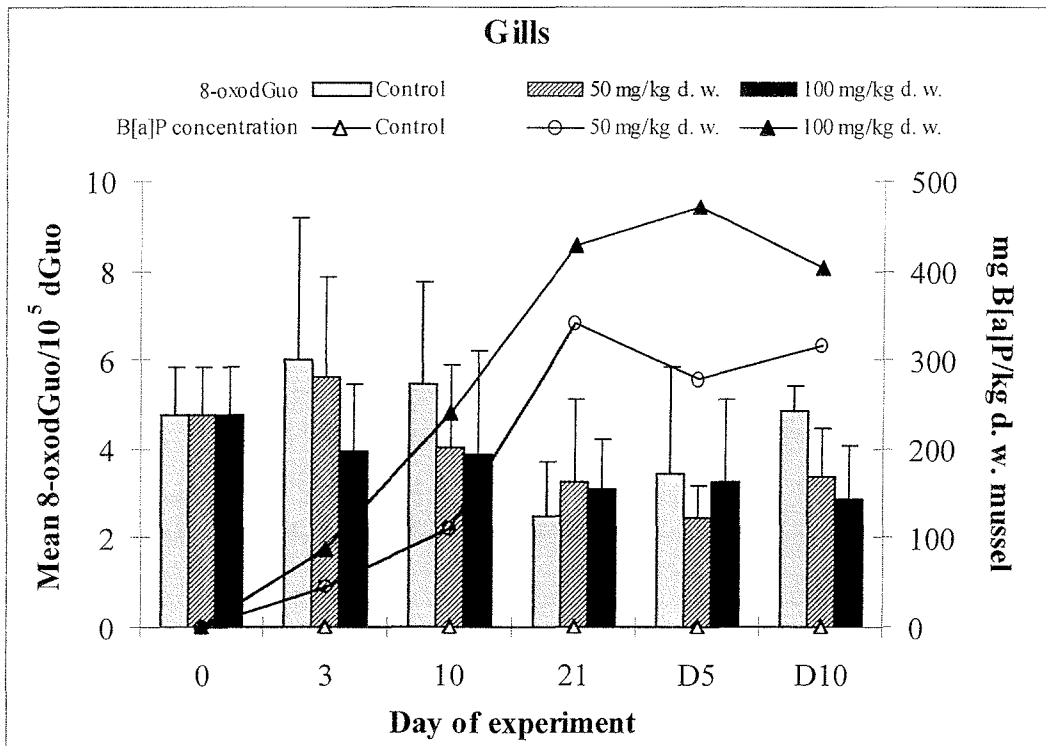


Figure 3: Relationship between 8-oxodGuo level of digestive gland DNA and whole mussel tissue B[a]P concentration in animals exposed to (A) 50 mg B[a]P/kg d. w. mussel (B) 100 mg B[a]P/kg d. w. mussel

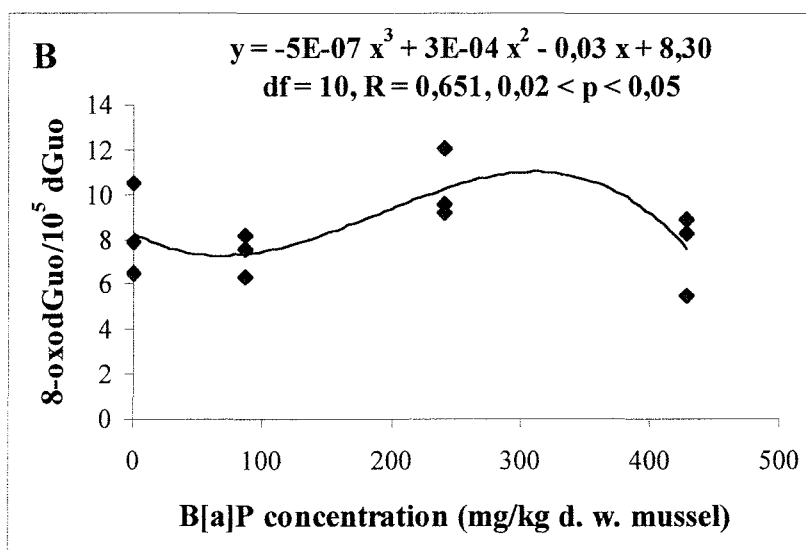
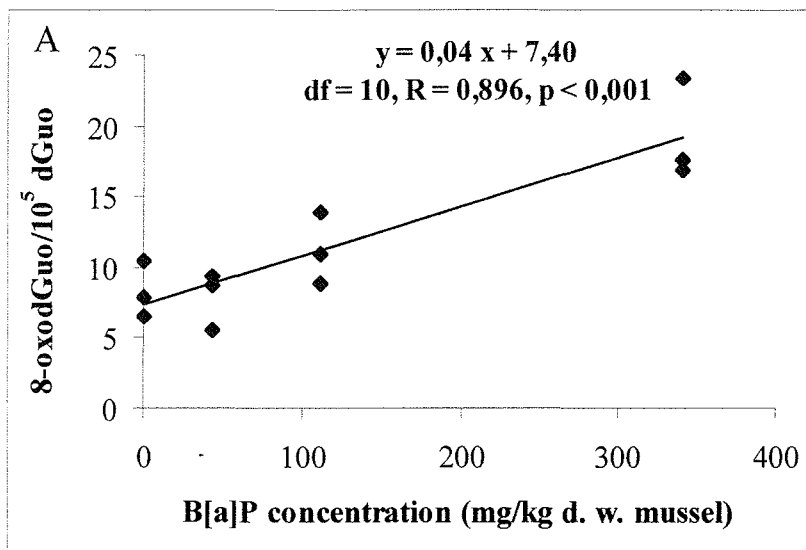


Figure 4: Mean total level of B[a]P-related DNA adducts in mussel gills

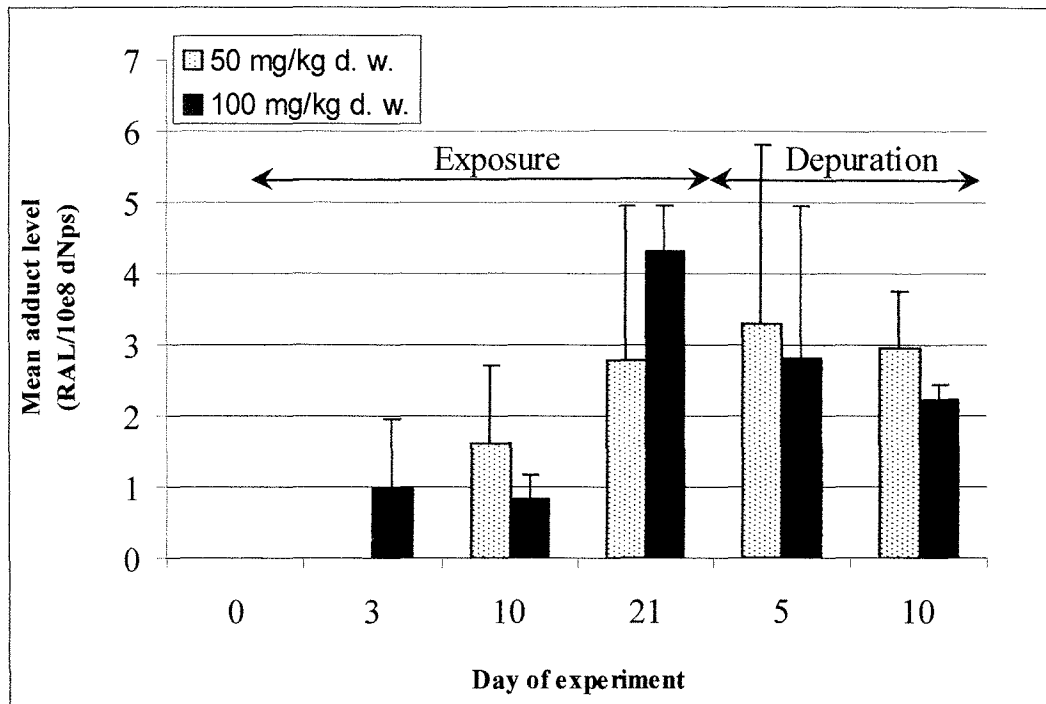
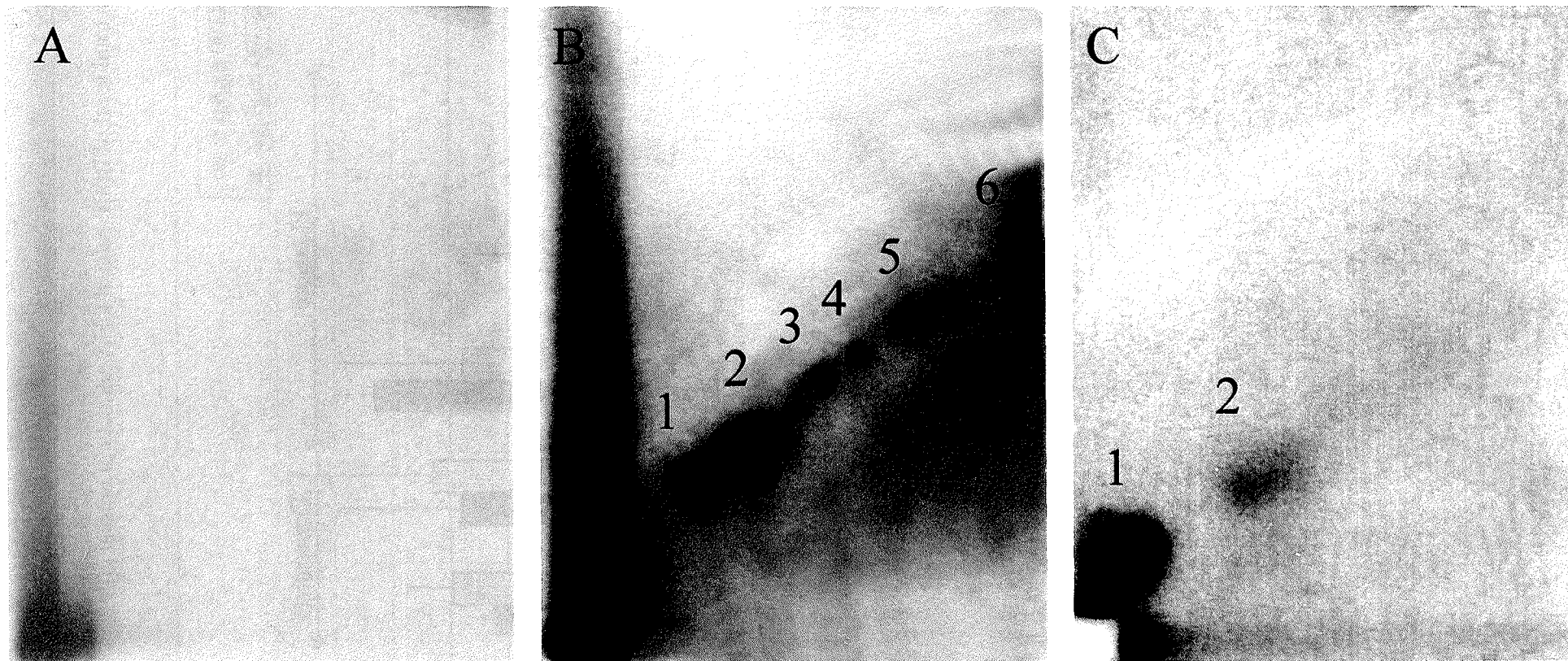


Figure 5: DNA adduct pattern of B[a]P-exposed mussels. (A) Control gill DNA (B) Typical pattern of gill DNA adduct observed from day 10 of exposure in mussels exposed to 50 and 100 mg B[a]P/kg d. w./day (C) typical autoradiograph of mussel gill and digestive gland DNA adducts induced after exposure for 24 days to 50 mg/kg d. w. mussel (Akcha et al, 1999b)



## **CHAPITRE 5**

### **Etudes de terrain en Méditerranée**

- 1) Mesure de la 8-oxodGuo dans les branchies de *Mytilus galloprovincialis* (BIOMAR)**
- 2) Mesure des adduits à l'ADN de branchies de *Mytilus galloprovincialis* (RINBIO)**



## MISSION BIOMAR IV (3-31 mars 1998)

### Mesure du niveau de 8-oxodGuo à l'ADN de branchies de moules collectées au cours de la mission BIOMAR

#### I. Objectifs généraux du programme BIOMAR :

Le programme européen BIOMAR, « Biochemical Markers of Environmental Contamination in Marine Ecosystems », avait pour objectif l'étude de la réponse des organismes marins aux contaminants chimiques. En tant que participant à ce programme, la contribution de notre laboratoire à la mission BIOMAR IV a consisté, entre autres, en la réalisation de mesure de la 8-oxodGuo à l'ADN de moules issues de gisements naturels et collectées le long des côtes italiennes et grecques.

#### II. Présentation des sites d'échantillonnage :

Date d'échantillonnage	Station	Code station	latitude	Longitude	Typologie du site
06.03.1998	Athènes (Pyrée)	PYR	37°5619N	23°3753E	Zone portuaire
06.03.1998	Salamina (Akra Konki)	SAL1	37°5288N	23°2638E	Ile
06.03.1998	Salamina (Akra Pétritis)	SAL2	37°55100N	23°24400E	Ile
07.03.1998	Pakhi	PAK	37°57900N	23°2200E	Terminal pétrolier
08.03.1998	Patras	PAT	38°15800N	21°44300E	Digue de la marina
08.03.1998	Oxia	Oxia	38°19200N	21°06500E	Ile
09.03.1998	Preveza	PREV	38°58100N	20°45250E	Marina
14.03.1998	Trieste	TRI 2	45°46050N	13°37100E	Digue de la marina Sistina
14.03.1998	Tagliamento	TAG	45°38050N	13°06350E	
15.03.1998	Venise	VEN2	45°31750N	12°4395E	Extérieur de la lagune
18.03.1998	Choggia	CHO	45°14000N	12°18000E	Digue extérieure du port
18.03.1998	Venise	VEN1	45°258N	12°1913E	Port, quai Basilio
18.03.1998	Po	PO	44°585N	12°3503E	Embouchure du Po

L'emplacement de chacune des stations sélectionnées est indiqué figure 34.

#### III. Matériel et méthodes

##### *Echantillonnage*

Pour chaque station, 3 pools de branchies issues de 5 individus ont été prélevés pour la mesure de la 8-oxodGuo par CLHP-DE.

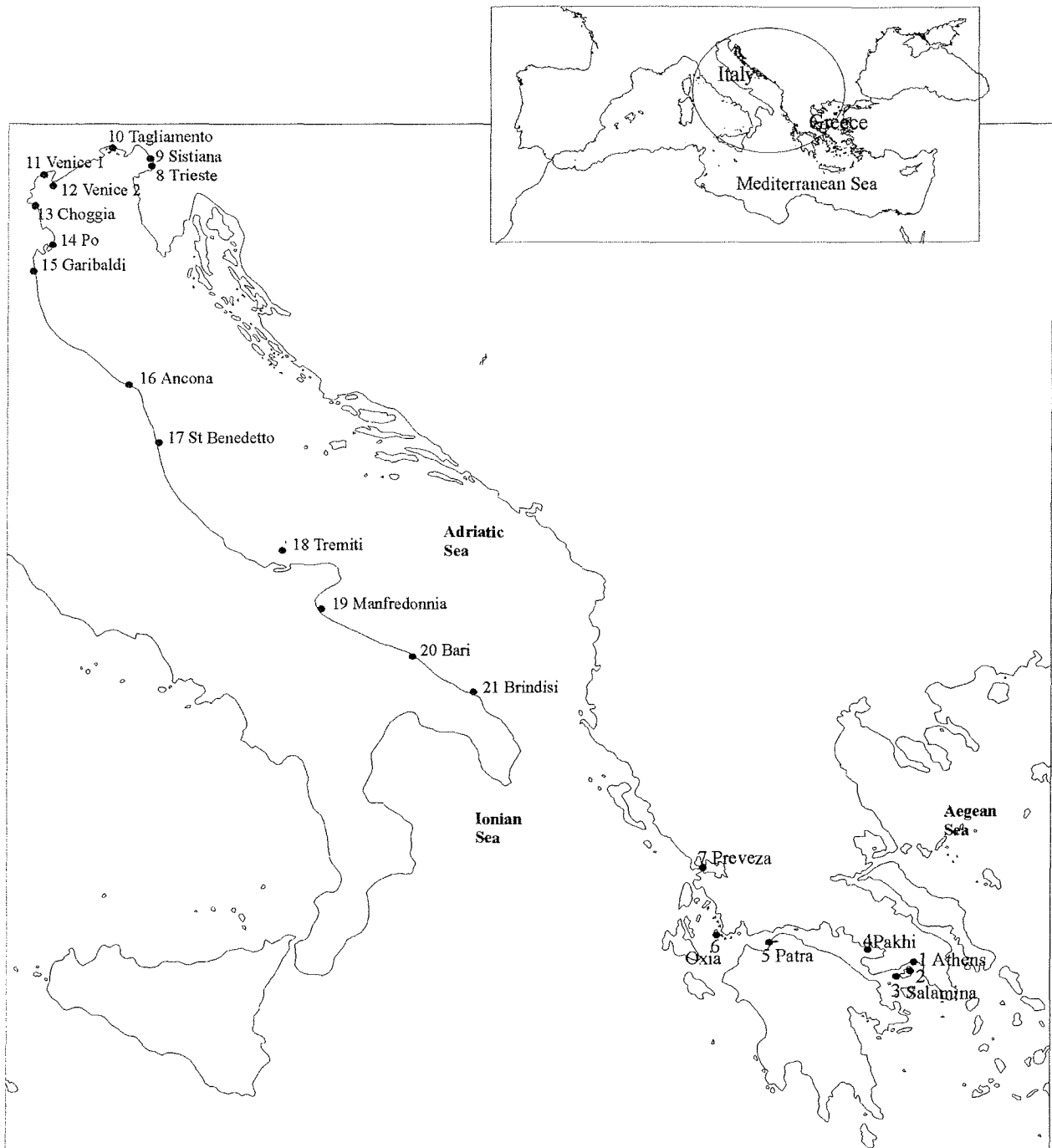


Figure 34 : Carte d'échantillonnage de la campagne BIOMAR IV (Burgeot, 1999).

16 pools de branchies et de glande digestive (5 individus par pool) ont également été échantillonnés à chaque station pour la mesure de plusieurs biomarqueurs d'exposition par les différentes équipes impliquées dans ce programme :

Mesure de l'activité BPH : à chaque site, mesure de l'activité sur 5 pools de glandes digestives (Dr Thierry Burgeot, Département des polluants chimiques, IFREMER Nantes).



Mesure de l'activité AChE : à chaque site, mesure de l'activité sur 5 pools de branchies (Dr Gilles Bocquené, Département des Polluants chimiques, IFREMER Nantes)

Mesure des activités - **GST** : mesure de l'activité à chaque site sur 6 pools de branchies et de glandes digestives  
 - **CAT** : mesure de l'activité à chaque site sur 6 pools de glandes digestives

(Dr Michèle Daubèze, Christelle Clérandeau, LPTC, Université de Bordeaux I)

Dosage du malondialdéhyde (MDA) induit et non induit: à chaque site, mesure sur 6 pools de glandes digestives (Dr Michèle Daubèze, Christelle Clérandeau, LPTC, Université de Bordeaux I)

#### *Extraction de l'ADN pour la mesure de la 8-oxodGuo*

Pour chaque pool, l'extraction de l'ADN a été réalisée selon le protocole de Venier et Canova (1996) avec quelques modifications. Chaque pool de branchies a été homogénéisé dans du tampon EDTA 1 mM/SDS 1% (10 ml/g de tissu) et une aliquote de 1 ml d'homogénat a été centrifugée à 500 g pendant 30 secondes à 4°C. 500 µl ont été ainsi récupérés et incubés avec un mélange de RNase A (600 µl/ml), RNase T1 (100 U/ml) et α-amylase (10 µg/ml) pendant 45 mn à 37°C. La digestion des protéines a été réalisée par incubation 1 h à 37°C avec de la protéinase K (200 µg/ml). Pour chacune de ces digestions enzymatiques, la quantité totale d'enzymes a été apportée en deux fois, la moitié en début et à mi-course du temps d'incubation. Après ajustement de la concentration en SDS à 1,5%, les échantillons ont été chauffés à 60°C pendant 10 mn. 125 µl de perchlorate de sodium 5M ont été rajoutés dans chaque tube avant extraction de l'ADN avec 700 µl de Sevag (chloroforme : alcool isoamylique, 24 :1). Après agitation pendant 30 mn à température ambiante, les échantillons ont été centrifugés à 14000 g pendant 15 mn à 4°C et le surnageant récupéré. L'ADN a été ensuite précipité toute la nuit dans deux volumes d'éthanol absolu glacial à -20°C. Après centrifugation (4°C, 15 mn, 14000 g), l'éthanol a été éliminé et le culot d'ADN séché par évaporation. Chaque culot d'ADN a été remis en suspension dans 500 µl de tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) et incubé pour dissolution 1 h à 37°C. Après addition de 50 µl d'acétate de sodium 2.5 M et d'un volume d'éthanol absolu glacial, l'ADN a été précipité à nouveau. Après centrifugation (4°C, 20 mn, 14000 g), le culot a été séché et remis en suspension dans 500 µl d'eau Milli Q. Le dosage de la concentration d'ADN obtenu pour chaque échantillon a été déterminé par spectrophotométrie UV à 260, 280 et 230 nm (260/280 = 1,8 ± 0,5, 260/230 ~ 2).

#### *Analyse CLHP-DE de la 8-oxodGuo*

L'analyse CLHP-DE de la 8-oxodGuo a été réalisée conformément au protocole de Melamed et al (1996). Pour chaque échantillon, la solution d'ADN a été reprécipité et l'ADN remis en suspension dans 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8 pour atteindre une concentration finale de 1 µg/µl. Pour chaque échantillon, 50 µg d'ADN ont été ensuite digérés en désoxyribonucléosides. Après dénaturation de l'ADN par chauffage 5 mn à 90°C, les échantillons ont été rapidement refroidis dans la glace. 5 µl d'acétate de sodium 0,5 M, pH 5.1 ont été rajoutés dans chaque tube avant digestion pendant 1 h à 37°C avec 5 U de nucléase P1. Après addition de 20 µl de Tris-HCl 0,4 M, pH 8, les échantillons ont été incubés pendant 1 h

à 37°C avec 6U de phosphatase alcaline. A la fin de la digestion, les protéines ont été précipitées par centrifugation avec ½ volume de chloroforme pendant 8 mn à 12000 g. Le surnageant a été récupéré et séché à l'aide d'un speedvac. Les culots d'ADN ainsi obtenus ont été remis en suspension dans 100 µl d'eau MilliQ et stockés à l'obscurité à -20°C avant analyse.

Le niveau de 8-oxodGuo de chaque échantillon a été déterminé par CLHP (Philips DU 4100) couplé à un détecteur UV (Kontron 405). La séparation de la 8-oxodGuo des 2'-désoxyribonucléosides a été réalisée sur pré-colonne Supelguard LC-18-S (Supelco, 20 x 4 mm) et sur colonne Satisfaction C8+ (CIL Cluzeau, 15 x 4,6 mm). L'élution a été réalisée avec une phase mobile constituée de 10% méthanol, 10 mM acide citrique, 25 mM acétate de sodium, 30 mM hydroxyde de sodium et 10 mM acide acétique. Le débit a été fixé à 1 ml/mn et la sensibilité du détecteur électrochimique à 0,5 nA/V pour un potentiel d'oxydation de 650 mV. La quantification de la 8-oxodGuo a été réalisée avec une courbe de calibration obtenue par injection de quantités (pmoles) connues de 8-oxodGuo. Pour une expression standard en nombre de résidus 8-oxodGuo par 10<sup>5</sup> dGuo, la désoxyguanosine a été quantifiée par couplage d'un détecteur UV (Philips PU 40218520) à la sortie de notre système d'analyse. Le détecteur UV a été programmé à une longueur d'onde de 260 nm. Une courbe de calibration de la dGuo a également été réalisée dans la gamme du nmole. Pour ces conditions chromatographiques, les temps de rétention de la 8-oxodGuo et de la dGuo ont été respectivement de 10,5 et 7,0 mn.

#### *Mesure des différents biomarqueurs enzymatiques*

Le dosage de chacune des activités mesurées a été préalablement décrit dans le Chapitre 2.

#### *Dosage du MDA*

En tant que produit de dégradation des hydroperoxydes, le dosage du MDA a été proposé comme un biomarqueur de la peroxydation lipidique. Le dosage de ce composé peut être effectué après induction ou non de la peroxydation des lipides contenus dans la fraction S9 de la glande digestive de moule en présence de Fe<sup>2+</sup> et d'acide ascorbique (figure 35). Le fer (Fe<sup>2+</sup>) lié à l'ADP (chélateur du fer à l'état Fe<sup>2+</sup>) initie la peroxydation des acides gras insaturés et entraîne la production de radicaux libres. En maintenant le Fe sous sa forme réduite, l'acide ascorbique permet la propagation des réactions radicalaires et ainsi la production d'hydroperoxydes (ROOH). Après arrêt de la réaction et addition d'acide thiobarbiturique, le MDA se condense sur cet acide à haute température et donne un chromophore que l'on peut lire au spectrophotomètre.

#### *Analyse statistique*

Les résultats de 8-oxodGuo ont été interprétés grâce à la réalisation d'une analyse de la variance, ANOVA, en prenant les stations comme unique facteur (Statistica Soft. Inc.). Chaque zone géographique (Côtes grecques et Lagon de Venise) a été dans un premier temps analysé de façon indépendante avant de réaliser une analyse globale sur l'ensemble des stations de cette étude. Lorsque l'analyse a mis en évidence des différences significatives entre stations, des tests *a posteriori* ont été réalisés pour apporter des précisions sur les différences observées.

L'ensemble des paramètres biochimiques mesurés au cours de cette étude de terrain a permis la réalisation d'une analyse discriminante (Statistica Soft. Inc.) des différents sites d'échantillonnage.

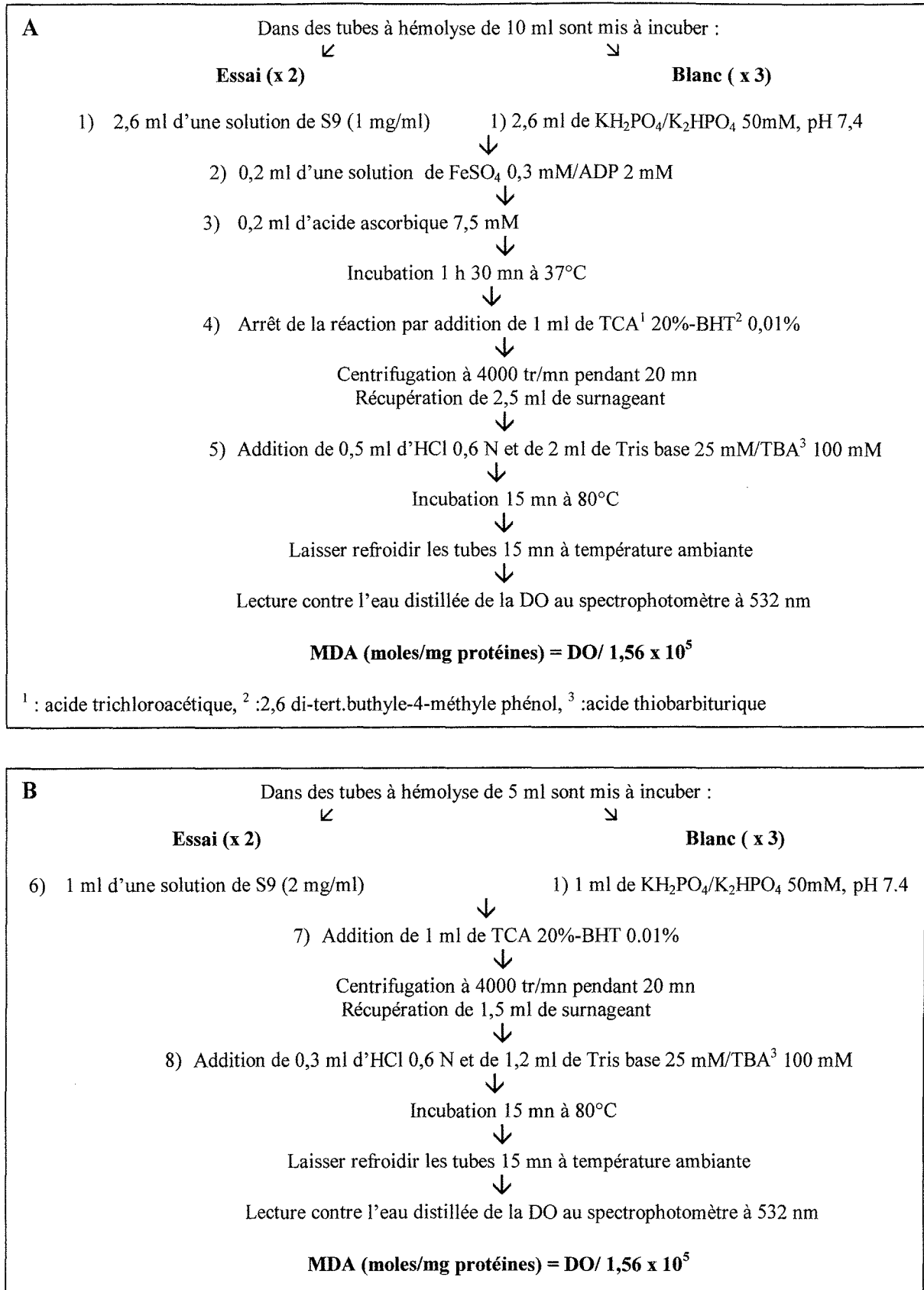


Figure 35 : Protocole de dosage du MDA induit (A) et non induit (B) chez la moule

#### IV. Résultats :

##### IV.1. Comparaison des niveaux de 8-oxodGuo des différents sites d'échantillonnage

Les résultats bruts obtenus pour les différentes stations des côtes grecques et italiennes sont présentés Figure 36. Aucune différence dans le niveau de 8-oxodGuo à l'ADN de branchies n'a été mise en évidence chez les animaux issus des différents points d'échantillonnage des côtes grecques ( $F = 1,82$ ,  $dl = 6/14$ ,  $p = 0,17$ ). Sur les côtes italiennes, des différences faibles mais significatives entre stations ont été mises en évidence ( $F = 3,13$ ,  $dl = 5/12$ ,  $p = 0,05$ ). La réalisation d'un test de Newman-Keuls a confirmé un niveau de 8-oxodGuo significativement plus faible chez les moules de la station TAG que celles de la station VEN1.

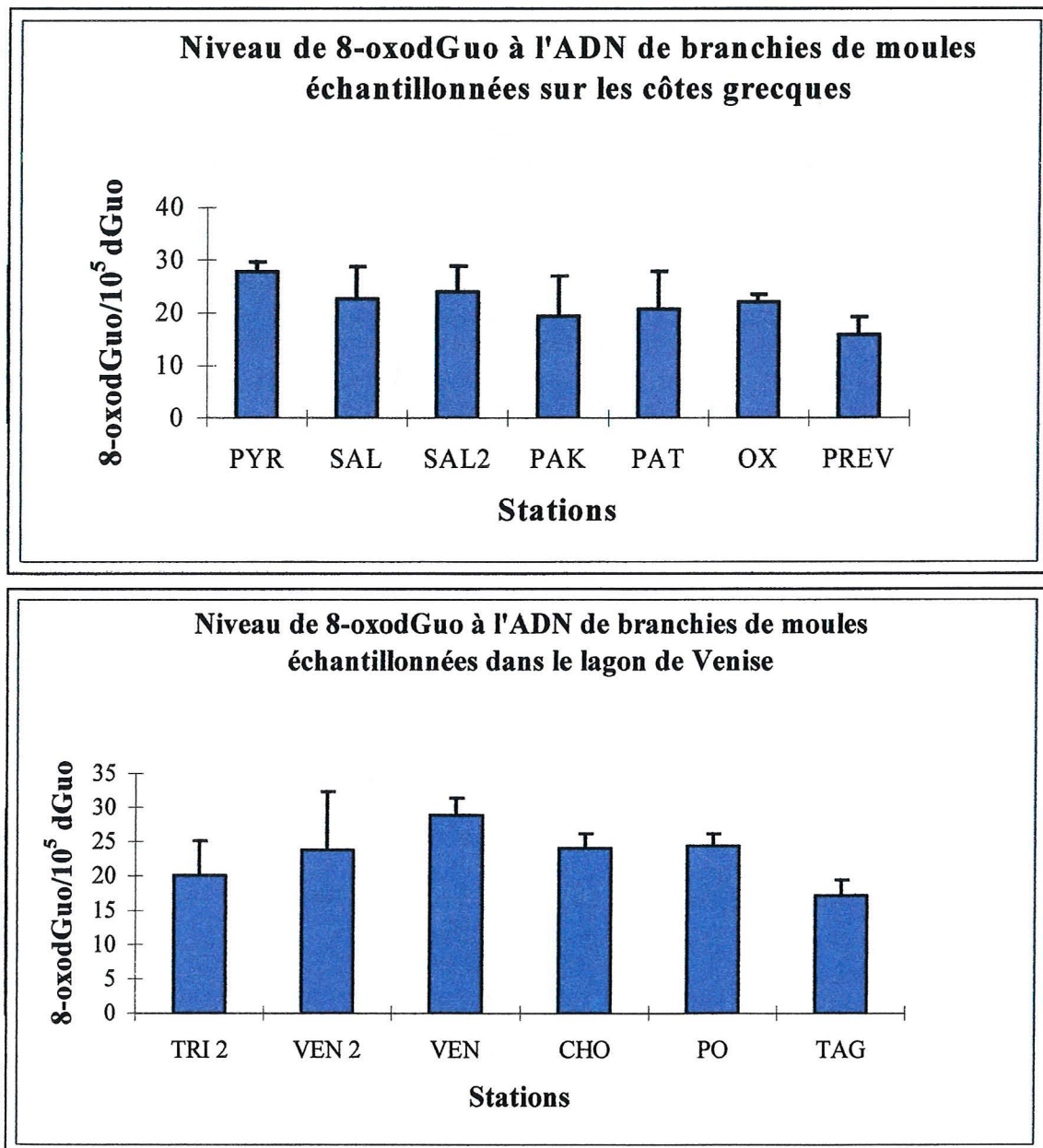


Figure 36: Mesure des niveaux de 8-oxodGuo à l'ADN de branchies des moules échantillonnées lors de la campagne BIOMAR IV.

La réalisation d'une ANOVA sur l'ensemble des stations de cette étude a mis en évidence de faibles différences entre stations ( $F = 2.18$ ,  $dl = 12/26$ ,  $p = 0.05$ ). Alors que l'application du test de Newman-Keuls ne fait apparaître aucune différence, l'application d'un test moins restrictif, test de la plus petite différence significative (LSD), permet l'isolement de deux stations, les stations PREV et TAG. Ces stations présentent des mesures de 8-oxodGuo inférieures à celles des stations PYR, SAL, PAT, VEN2, VEN et CHO, et également inférieures à celles de PO pour PREV.

#### IV.2. Réponse des différents biomarqueurs

Pour chaque station, les valeurs moyennes de chaque biomarqueur ont été récapitulées tableau 14. Dans un premier temps, une analyse discriminante de l'ensemble des stations d'échantillonnage a été effectuée en prenant en compte l'ensemble de ces paramètres biochimiques. Dans un deuxième temps, une analyse similaire fut réalisée en ne sélectionnant que les paramètres relatifs au stress oxydatif (CAT, MDA induit, MDA non induit), 8-oxodGuo incluse. Le résultat de ces analyses est résumé figure 37.

L'analyse discriminante réalisée à partir de l'ensemble des paramètres biochimiques a permis la distinction de 4 groupes de stations distincts. En fonction des degrés de pollution présumés des sites échantillonnés, la classification suivante a pu ainsi être proposée :

- PYR, PO, VEN1 : stations très polluées
- PREV, CHO : stations polluées
- TRI2, SAL2, OXIA, PAT, VEN2, TAG : stations moyennement polluées
- SAL1, PAK : stations faiblement polluées

Malgré l'observation d'une corrélation positive entre la 8-oxodGuo et l'activité CAT et le MDA (Tableau 15), aucune station d'échantillonnage n'a pu être discriminée sur la base de ces seuls biomarqueurs du stress oxydatif.

Tableau 14 : Résultats du dosage du MDA et des mesures d'activité des différents biomarqueurs enzymatiques

Station	GST B <sup>1</sup> nmol/mn/mg	GST GD <sup>2</sup> nmol/mn/mg	CAT μmol/mn/mg	MDA I <sup>3</sup> nmol/mg	MDA NI <sup>4</sup> nmol/mg	BPH pmol/mn/mg	AChE nmol/mn/mg
PYR	676,36 ± 66,26	226,07 ± 17,62	82,16 ± 11,86	10,77 ± 0,72	0,49 ± 0,17	66,80 ± 31,56	67,50 ± 8,98
SAL1	241,75 ± 33,39	168,69 ± 27,18	95,81 ± 16,46	5,33 ± 1,68	0,96 ± 0,53	134,42 ± 95,46	112,20 ± 12,84
SAL2	301,45 ± 44,78	174,28 ± 9,70	62,57 ± 4,48	6,52 ± 1,56	0,72 ± 0,21	28,76 ± 11,79	108,40 ± 14,95
PAK	376,97 ± 48,41	167,43 ± 23,72	96,40 ± 10,72	5,42 ± 2,54	0,90 ± 0,28	66,80 ± 57,10	135,56 ± 11,76
PAT	366,05 ± 51,72	173,94 ± 13,08	75,39 ± 8,02	5,64 ± 2,33	0,50 ± 0,43	1,35 ± 1,06	101,83 ± 14,39
OXIA	307,21 ± 39,18	121,93 ± 6,25	62,67 ± 6,50	4,51 ± 1,57	0,65 ± 0,37	83,70 ± 49,36	114,29 ± 10,14
PREV	474,65 ± 79,32	176,12 ± 35,91	43,35 ± 16,39	9,00 ± 5,07	0,44 ± 0,38	24,53 ± 19,57	109,04 ± 11,43
TRI2	320,09 ± 55,37	133,59 ± 26,70	76,91 ± 12,55	5,07 ± 1,38	0,35 ± 0,08	87,93 ± 51,64	99,58 ± 22,35
VEN2	398,31 ± 51,59	137,69 ± 19,86	66,75 ± 10,33	6,20 ± 2,95	0,29 ± 0,08	69,86 ± 32,22	152,75 ± 8,55
VEN	552,63 ± 44,63	205,13 ± 16,35	53,12 ± 2,60	7,08 ± 1,62	0,49 ± 0,16	102,60 ± 56,77	80,90 ± 4,36
CHO	497,55 ± 67,91	158,60 ± 21,38	65,14 ± 12,40	6,94 ± 3,12	0,39 ± 0,23	58,55 ± 28,64	136,70 ± 17,45
PO	574,34 ± 73,81	187,68 ± 17,52	57,12 ± 15,82	9,02 ± 3,11	0,31 ± 0,09	71,51 ± 22,10	100,93 ± 7,65
TAG	306,24 ± 44,00	124,54 ± 9,85	65,33 ± 8,73	3,98 ± 0,88	0,32 ± 0,12	62,70 ± 23,61	77,17 ± 8,33

<sup>1</sup>B : branchies, <sup>2</sup>GD : glande digestive, <sup>3</sup>I : induit, <sup>4</sup>NI : non induit

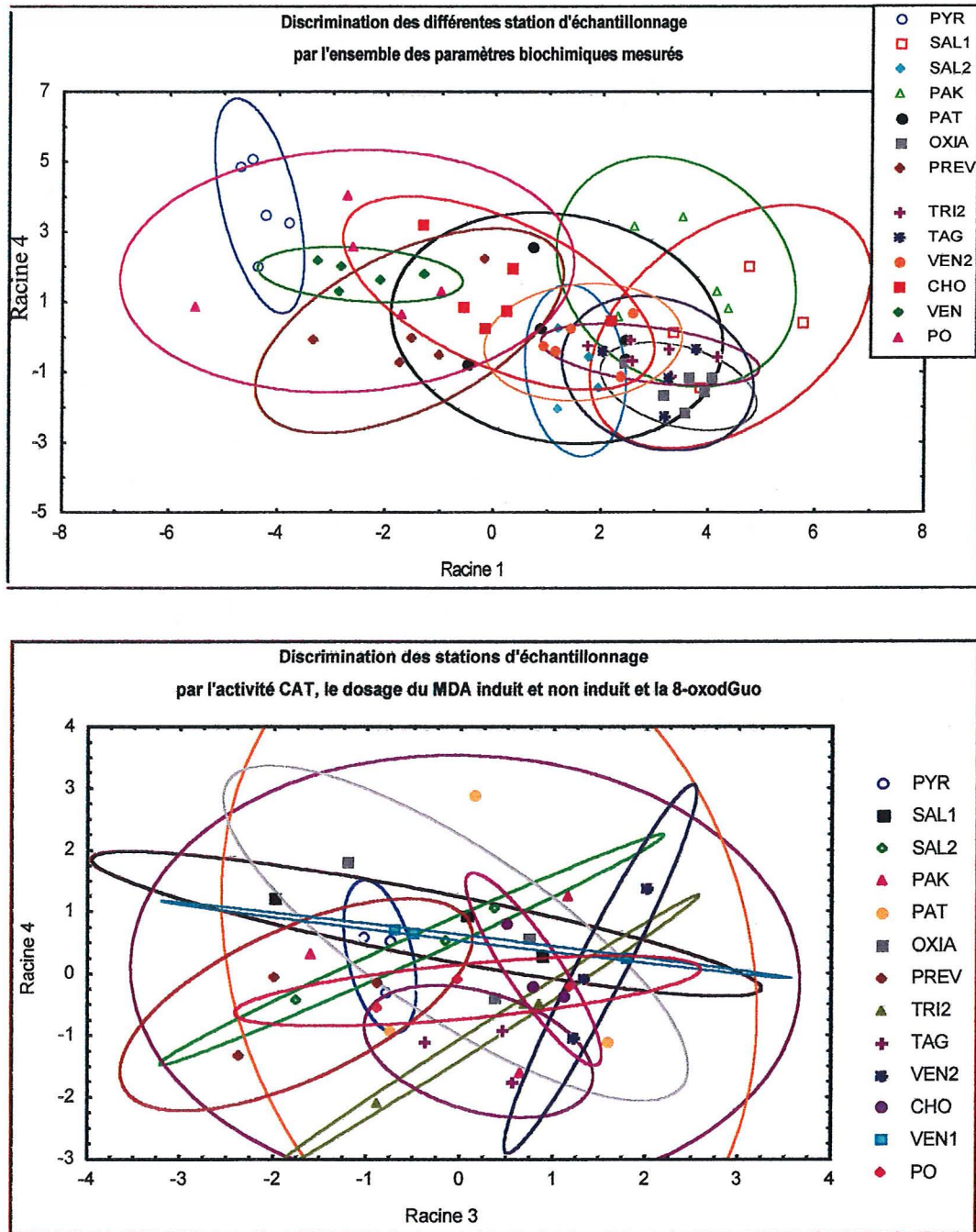


Figure 37 : Résultats des analyses discriminantes

Tableau 15 : Matrice de corrélation entre la 8-oxodGuo et les différents marqueurs biochimiques.

	GST GD	GST B	BPH	AChE	CAT	MDA I	MDA NI
<b>8-oxodGuo</b>	-0,252 p = 0,117	-0,222 p = 0,168	0,137 p = 0,404	-0,050 p = 0,777	<b>0,323</b> <b>p = 0,042</b>	<b>0,891</b> <b>p = 0,000</b>	<b>0,907</b> <b>p = 0,000</b>

## V. Discussion

L'analyse par CLHP-DE de la 8-oxodGuo de ces échantillons a été réalisée en même temps que les échantillons de branchies collectés au cours de notre deuxième étude de laboratoire (article 3, p 161). On peut donc noter dans un premier temps que les valeurs de 8-oxodGuo rapportées dans la présente étude de terrain sont similaires aux valeurs obtenues au laboratoire chez les moules témoins et exposées au B[a]P (50 mg/kg p. s. moule). Ce premier résultat peut être interprété de deux façons différentes.

1) L'absence de différence entre les niveaux de 8-oxodGuo mesurés au sein de différentes populations de moules exposées soit à des niveaux de contamination de l'environnement soit à des doses extrêmes de contaminants au laboratoire, est défavorable à la proposition de la 8-oxodGuo comme un biomarqueur potentiel du stress oxydatif chez la moule. En effet, la mesure de cette base oxydée ne démontre pas de pouvoir discriminant entre une exposition extrême au laboratoire et une exposition à des doses plus faibles dans le milieu naturel.

2) Cette absence de différence peut néanmoins être liée à l'application d'un protocole de mesure de la 8-oxodGuo non optimisé. Cette interprétation des résultats semble en accord avec l'observation, chez les rongeurs et les poissons, d'une augmentation du niveau de 8-oxodGuo avec l'exposition au B[a]P (Kim et Lee, 1997). In situ, des différences de niveaux de cette base oxydée ont également été rapportées chez les poissons (Malins et Haimanot, 1990).

Plutôt que la technique de détection de ces lésions oxydatives, ce sont surtout les étapes liées à la préparation et à la digestion de l'ADN qui peuvent être remises en cause. Comme il en a été largement discuté dans l'article 3, il est vraisemblable que notre protocole d'extraction d'ADN et donc d'analyse de la 8-oxodGuo n'était pas favorable à l'observation de faibles différences dans la formation de cette base oxydée. Une oxydation artificielle des échantillons lors de leur préparation semble avoir conduit à une surestimation des niveaux mesurés. Ce bruit de fond peut avoir ainsi masqué les éventuels effets du B[a]P (article 3) et les différences qui pouvaient exister entre les différentes stations de cette étude de terrain. Outre la mesure de valeurs élevées par rapport à celles rapportées chez les vertébrés (Annexe II), nous avons clairement démontré que notre protocole d'extraction de l'ADN au Sevag n'était pas approprié à la mesure de la 8-oxodGuo (article 3). Par la suite, l'application de la méthode chaotrope, basée sur l'utilisation de chélateurs d'ions plus efficaces que ceux utilisés classiquement, nous a permis de mesurer des valeurs de 8-oxodGuo beaucoup plus faibles chez la moule (article 4).

Malgré la vraisemblance de cette dernière interprétation, il était légitime de se demander si les différences de contamination des sites échantillonnés étaient suffisamment fortes pour permettre l'expression d'un stress oxydatif différent chez les populations de moules étudiées. Sans données chimiques, il n'était malheureusement pas possible de déterminer les gradients de pollution. Néanmoins, la mesure de différents marqueurs biochimiques et leur utilisation pour l'analyse discriminante des différents sites a permis une estimation des niveaux d'exposition. Il est important de souligner ici qu'aucun des biomarqueurs mesurés n'est spécifique d'une classe de contaminants. La classification proposée des différentes stations est donc basée sur un état de contamination générale susceptible d'induire des effets biologiques. Pour les degrés d'exposition estimés sur la base des seuls marqueurs biochimiques, l'absence de différence dans les niveaux de 8-oxodGuo des stations grecques (entre PYR et SAL 2 par exemple) paraît défavorable à la proposition de la 8-oxodGuo en tant que biomarqueurs. De la même façon, l'unique différence observée dans le niveau de 8-oxodGuo des stations

italiennes, concerne deux sites de même degré estimé de pollution. Cette discordance apparente peut être expliquée par la non spécificité des biomarqueurs d'exposition utilisés. En effet, les polluants ne sont pas tous capables de stimuler la production d'espèces réactives de l'oxygène. Les niveaux de contamination estimés des différents sites peuvent ainsi ne pas refléter le potentiel pro-oxydant de chaque station. Parmi les polluants de l'environnement marin, les HAP, les métaux lourds et certains produits agrochimiques ont été identifiés comme agents pro-oxydants chez les vertébrés (Livingstone et al, 1990). On peut noter également l'importance des profils de chaque classe de contaminants et de la présence de mélanges complexes sur les effets observés.

Dans cette étude, l'observation d'une corrélation entre les différents marqueurs du stress oxydatif (8-oxodGuo, CAT, MDA induit et non induit), nous a conduit à réaliser une nouvelle analyse discriminante de nos stations. Cette analyse basée uniquement sur les valeurs de ces biomarqueurs devait nous permettre d'effectuer un classement prédictif des stations en fonctions de leur potentiel pro-oxydant : la variabilité des paramètres mesurés et le nombre insuffisant de mesures de 8-oxodGuo n'ont malheureusement permis aucun regroupement.

L'application, au cours d'une nouvelle étude de terrain, d'un protocole de mesure adapté, devrait permettre une première estimation des possibilités d'utilisation de la 8-oxodGuo chez la moule. La corrélation de ce marqueur moléculaire avec l'activité CAT et le dosage du MDA justifie ces investigations supplémentaires. Il apparaît néanmoins nécessaire de pouvoir bénéficier du dosage de certains contaminants chimiques tels que les HAP, les métaux lourds et les pesticides pour lesquels une stimulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène a été démontrée chez la moule. La disponibilité d'informations sur le profil de chacune de ces classes de polluants permettrait également d'identifier les congénères les plus actifs en terme d'effets biologiques.



## MISSION Rinbio 1998

### Mesure des adduits à l'ADN de branchies de *Mytilus galloprovincialis*

#### I. Objectifs généraux du programme Rinbio :

Développé sur la base du Réseau Littoral Méditerranéen (RLM), le Réseau « Intégrateurs biologiques » (Rinbio) avait pour objectif d'évaluer la qualité des eaux littorales du bassin méditerranéen. Selon le concept de biosurveillance active basée sur l'utilisation de la moule comme organisme « sentinelle », cette étude de terrain a été réalisée grâce à des transplants d'individus provenant d'un site de référence (moules de filières des Aresquiers) le long des côtes méditerranéennes françaises. A l'issue d'une période d'immersion de 3 mois (12-17 mai 1998 au 24-31 août 1998), les individus des différentes stations ont été collectés pour la détermination de leurs concentrations en contaminants chimiques et la mesure de plusieurs paramètres biométriques. Certains échantillons ont également fait l'objet d'un dosage des adduits à l'ADN de branchies en tant que biomarqueurs de génotoxicité du milieu.

#### II. Présentation des sites d'échantillonnage étudiés:

Station	Code Station	Latitude	Longitude	Typologie du site
Lapalme	5A	42°5733N	03°0002E	Lagune
Bages Nord	6B	43°0516N	03°0072E	Lagune
Port La Nouvelle	7A	43°0164N	03°0585E	Mer
Prevost	11A	43°3125N	03°5451E	Lagune
Saintes Marie	15A	43°2256N	04°2574E	Mer
Fos	16B	43°2275N	05°5732E	Mer, chenal de Fos
Marseille	19A	43°2073N	05°1645E	Mer
Cortiou	20A	43°1185N	05°2261E	Mer, Ile Plane
La Ciotat	21A	43°10675N	05°37622E	Mer
Toulon	22B	43°0479N	05°5737E	Mer, grande rade
Nice	29B	43°3890N	07°1322E	Mer, aéroport

La localisation de chacune de ces stations est présentée figure 38.

#### III. Matériel et Méthodes :

##### *Echantillonnage*

Pour chaque station, le dosage des adduits a été réalisé sur un pool de branchies issues de 10 individus par l'application de la technique de post-marquage au <sup>32</sup>P au sein du laboratoire du Prof. A. Leszkowicz (ENSAT, Toulouse). Les teneurs en HAP, PCB, métaux et organochlorés dans les moules entières (n = 50) ont également été déterminées par le laboratoire municipal de Rouen.

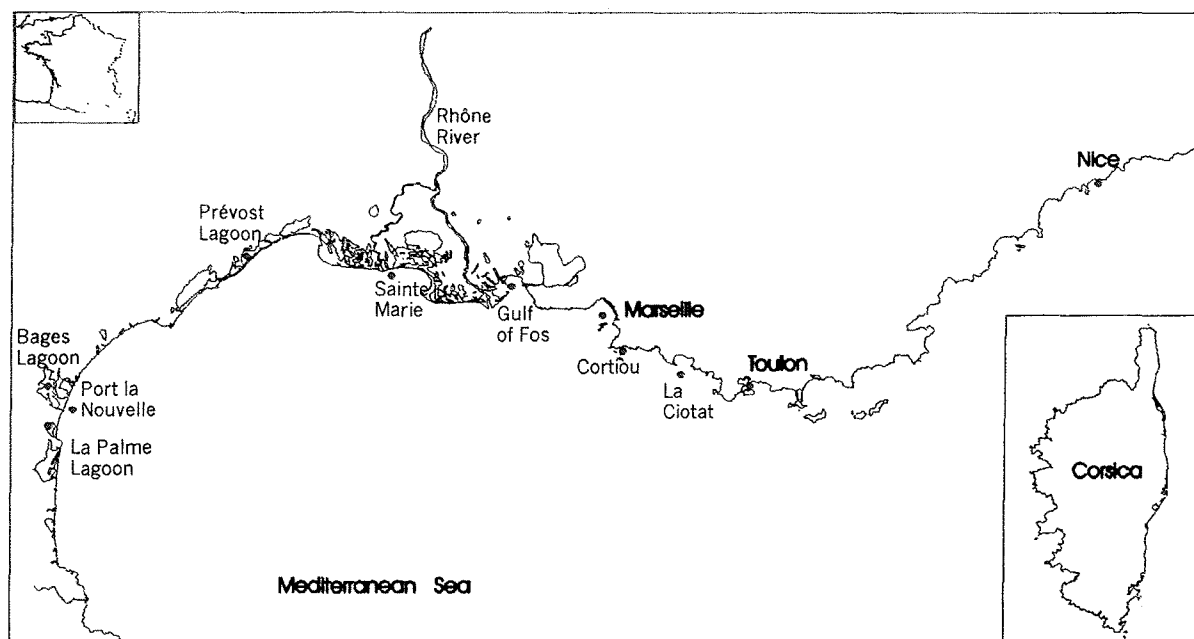


Figure 38 : Localisation des stations Rinbio

### Extraction de l'ADN

Chaque pool de branchies a été homogénéisé au potter dans un tampon SET (0,1 M NaCl, 20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8, 1g/ml). Après addition de 200  $\mu$ l de SDS 10% et 800  $\mu$ l d'acétate de potassium 6M, pH5, l'homogénat a été conservé dans la glace pendant 30 mn. Après centrifugation (13000 rpm, 25 mn, 15°C), le surnageant a été récupéré dans un tube Falcon de 15 ml et l'ADN a été précipité pendant une nuit à -20°C dans deux volumes d'éthanol absolu glacé. Les filaments d'ADN ont ensuite été récupérés dans un tube eppendorf de 2 ml soit à l'aide d'une pipette ou par centrifugation progressive (13000 rpm, 10 mn, 0°C) de la totalité du contenu du tube. Après centrifugation de l'eppendorf (13000 rpm, 10 mn, 0°C), le culot d'ADN a été lavé avec 1 ml d'éthanol 90% froid et dissout dans 500  $\mu$ l de tampon SET.

La digestion des ARN a été réalisée par incubation de la solution d'ADN pendant 2h à 37°C avec 400  $\mu$ g de RNase A et 400 UI de RNase T1. Les protéines ont été digérées par incubation pendant 1h à 37°C avec 500  $\mu$ g de proteinase K. L'ADN a été ensuite extrait deux fois dans 500  $\mu$ l de phénol saturé au Tris-HCl. Après addition du phénol et agitation pendant 20 mn à température ambiante, l'échantillon a été centrifugé (13000 rpm, 5 mn, 20°C) et le surnageant a été récupéré dans un tube eppendorf de 2 ml. L'extraction de l'ADN a été poursuivie par une extraction au SEVAG (chloroforme : alcool isoamylique, 24 :1) glacé. Après addition de 500  $\mu$ l de SEVAG, l'échantillon a été vortexé (40 s) et centrifugé (13000 rpm, 5 mn, 20°C) et le surnageant récupéré dans un tube propre. Après extraction, l'ADN a été précipité une nuit à -20°C dans deux volumes d'éthanol absolu glacé et 50  $\mu$ l d'acétate de sodium 3M, pH 5.

Après centrifugation (13000 rpm, 30 mn, 0°C), le culot d'ADN a été lavé 4 fois à l'éthanol 80% froid et dissout dans 200  $\mu$ l d'eau MilliQ. Après incubation pendant au moins 1 h à 37°C, l'analyse qualitative et quantitative de l'ADN a été réalisée par spectrophotométrie UV (1 DO = 50  $\mu$ g ADN/ml,  $\lambda$  max = 258-260 nm). Pour chaque échantillon d'ADN, une aliquote de 7  $\mu$ g a été prélevée et stockée à -80°C pour le dosage des adduits.

*Post-marquage au <sup>32</sup>P*

Pour chaque échantillon, un volume correspondant à 7 µg d'ADN a été décongelé à température ambiante et séché entièrement à l'aide d'un speedvac. L'ADN a été ensuite digéré en désoxyribonucléosides 3'-monophosphate (dNps) par incubation (4 h, 37°C) avec 10 µl d'une solution d'hydrolyse constituée de phosphodiesterase de rate (1,72 UI/ml) et de nucléase micrococcale (100 UI/ml) dans 40 mM de succinate et 20 mM de chlorure de calcium, pH 6. Les dNps normaux ont été déphosphorylés par incubation pendant 45 mn à 37°C avec 5 µl d'une solution de nucléase P1 (1,2 mg/ml) dans 320 mM de chlorure de zinc et 960 mM d'acétate de sodium, pH 5. La réaction a été arrêtée par l'addition de 3 µl de Tris-base 500 µM. Les dNps porteurs d'adduits ont ensuite été marqués radioactivement par incubation (45 mn, 37°C) avec 5 µl d'une solution de [ $\gamma^{32}$ ]ATP (5 mCi/ml) et de kinase T4 (0,60 UI/µl) dans 80 µM de bicine, 40 mM de dithiothreitol, 40 mM de chlorure de magnésium et 4,4 mM de spermidine, pH 9,8.

La migration de chaque échantillon d'ADN a été réalisée par chromatographie sur couche mince de polyéthylènimine (PEI). Les plaques chromatographiques ont été préparées au laboratoire. Après ajout à la cellulose (14,7 g/plaque) d'une solution de PEI-HCl 5% (9,7 ml par plaque), le mélange a été mixé 3 fois 10 s avec de l'eau MilliQ (qsp 100 ml). Une fois dégazé (15 mn minimum), le mélange a été étalé sur des plaques fines de plastiques. Après séchage, les plaques ont été lavées une fois dans du méthanol pur (2 mn) et deux fois dans l'eau MilliQ (2 x 2mn). Une fois sèches, les plaques ont été coupées et stockées à -20°C avant utilisation.

La migration des échantillons d'ADN a été réalisée dans un système de solvants constitué de :

- **D1** : 2,3 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5,7 (16 h de migration)
- **D2** : 7,7 M urée, 4,8 M formate de lithium, pH 3,5 (pré-migration dans l'eau MilliQ, 3h de migration)
- **D3** : 0,7 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pré-migration dans D3 85%, 2h30mn de migration)
- **D4** : 1,7 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6 (pré-migration dans l'eau MilliQ, migration 2h minimum)

Alors que l'autoradiographie des plaques a permis une analyse qualitative des adduits, la quantification des différents spots a été réalisée à l'aide d'un scanner (AMBIS Radioanalytical Scanning System, Lablogic). Les résultats ont été exprimés en nombre d'adduits/10<sup>8</sup> nucléotides normaux (RAL : Relative adduct Labeling).

*Analyses chimiques*

Les teneurs tissulaires de la moule entière en

- métaux (plomb, zinc, cadmium, mercure, cuivre, nickel, chrome et aluminium)
- organochlorés (DDT, DDE, DDD, lindane, AHCH)
- PCB (PCB 28, 31,35, 52, 101, 105, 118, 138, 153, 156 et 180)
- HAP (fluoranthène, le benzo[b]fluoranthène, le benzo[k]fluoranthène, le benzo[a]pyrène, le Benzo[g]pyrène et l'indéno[1,2,3-c]pyrène)

ont été déterminées par le laboratoire municipal de Rouen

*Analyse statistique*

La disponibilité de données chimiques pour l'ensemble des sites d'échantillonnage étudiés a permis une classification hiérarchique des stations en fonction du degré de contamination des

animaux (Statistica Soft.). La recherche de corrélation entre les niveaux d'adduits mesurés et la concentration en métaux, organochlorés, PCB et HAP a également été effectuée (Statistica Soft.).

#### IV. Résultats

##### IV. 1. Résultats des dosages chimiques

Les teneurs tissulaires des animaux en métaux, organochlorés, PCB et HAP totaux ont été récapitulées pour chaque station dans le tableau 16. Pour chaque classe de contaminants, une classification des stations en fonction de leur degré de contamination a été proposée. Cette classification reste néanmoins arbitraire puisque aucune comparaison des concentrations en polluants n'a pu être réalisée entre stations sur le plan statistique, les dosages ayant été réalisés sur des échantillons uniques.

Tableau 16 : Teneurs en contaminants chimiques des moules des stations RINBIO (stations les plus contaminées, stations moyennement contaminées, stations faiblement contaminées)

Stations	Métaux (mg/kg p. s. moule)	Organochlorés (µg/kg p. s. moule)	PCB (µg/kg p. s. moule)	HAP (mg/kg p. s. moule)
5A	183,1	17,2	16,8	9,7
6B	133,0	31,4	22,5	5,3
11A	199,1	45,9	66,5	10,5
7A	150,3	23,8	34,7	6,8
15A	119,8	13,4	39,5	7,2
16B	168,2	15,6	71,2	15,3
19A	192,1	16,1	106,5	13,5
20A	188,4	9,3	73,7	9,9
21A	191,1	8,4	35,3	12,6
22B	227,5	7,4	53,0	17,4
29B	214,2	5,5	26,0	7,5

De manière à proposer un classement de l'ensemble des stations étudiées en fonction de leur degré de contamination globale, une classification hiérarchique des stations a pu néanmoins être réalisée (Figure 39). Cette classification a ainsi permis un regroupement des stations en fonction du degré de similitude de leur contamination chimique (Tableau 17). Les stations 11A, 16B, 20A et 19A peuvent être ainsi considérées comme les plus polluées de cette étude, les stations 6B, 7A et 15A apparaissant comme les moins exposées.

##### IV. 2. Dosage des adduits stables à l'ADN par la méthode de post-marquage au $^{32}\text{P}$

###### IV. 2. 1. Analyse qualitative :

Les profils d'adduits obtenus au cours de cette étude de terrain sont représentés figures 40 et 41. Pour l'ensemble des stations étudiées, 4 adduits distincts (adduit n°1 à n°4) ont été observés. A l'exception faite du n°4, ces adduits présentent une migration diagonale par

rapport au point de dépôt d'origine. Par comparaison des profils obtenus, une distribution différente des adduits a pu être observée en fonction du site d'échantillonnage (tableau 18). Alors que l'adduit n°1 est observé dans toutes les stations, l'adduit n°3 est uniquement présent dans la station 5A (La Palme). Les adduits numéros 2 et 4 sont quant à eux communs à un grand nombre de stations.

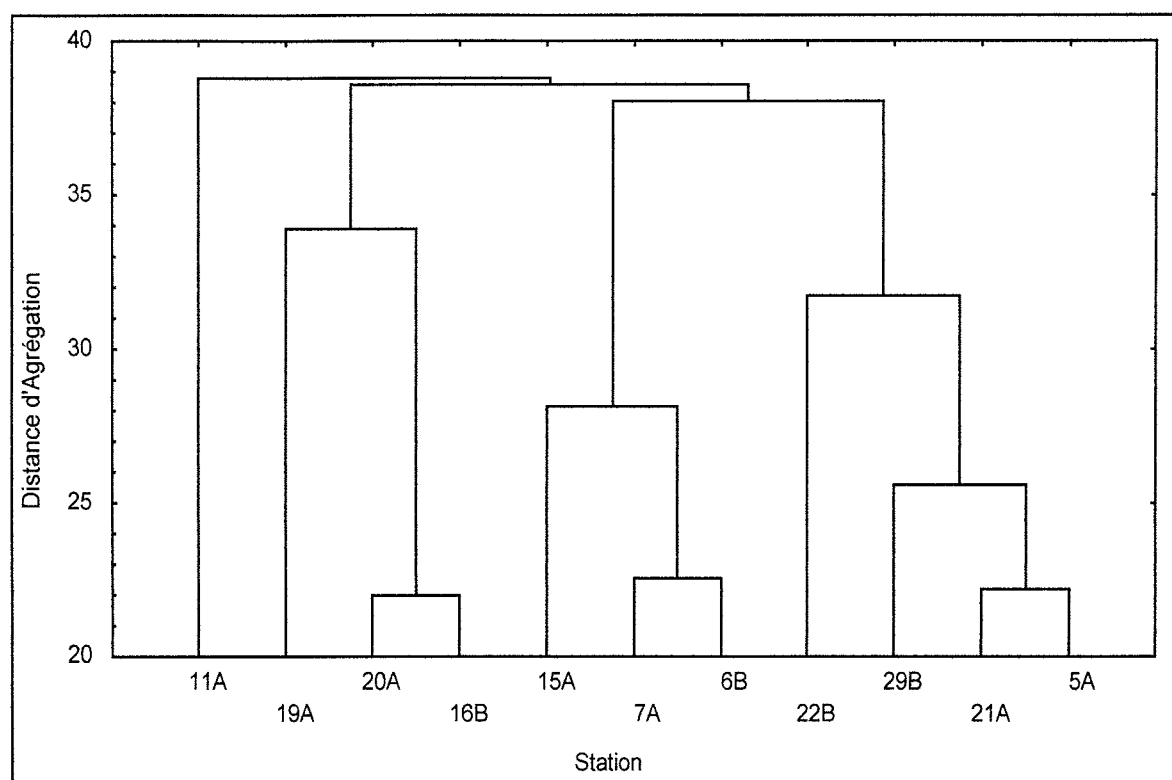


Figure 39 : Classification hiérarchique des stations RINBIO en fonction de leur degré de contamination globale (Agrégation d'après la mesure des distances euclidiennes par la méthode du saut minimum)

Tableau 17 : Classification hiérarchique des stations RINBIO (<sup>1</sup>dominance observée):

Regroupement proposé	contamination en métaux	Contamination en organochlorés	Contamination en PCB	contamination en HAP
6B, 7A, 15A	faible <sup>1</sup> à moyenne	moyenne à forte	faible à moyenne	faible
5A, 21A, 29B, 22B	forte	faible à moyenne	faible à moyenne	faible à moyenne (exception 22B : forte)
16B, 20A, 19A	moyenne à forte	faible à moyenne	forte	moyenne à forte
11A	forte	Forte	forte	Moyenne

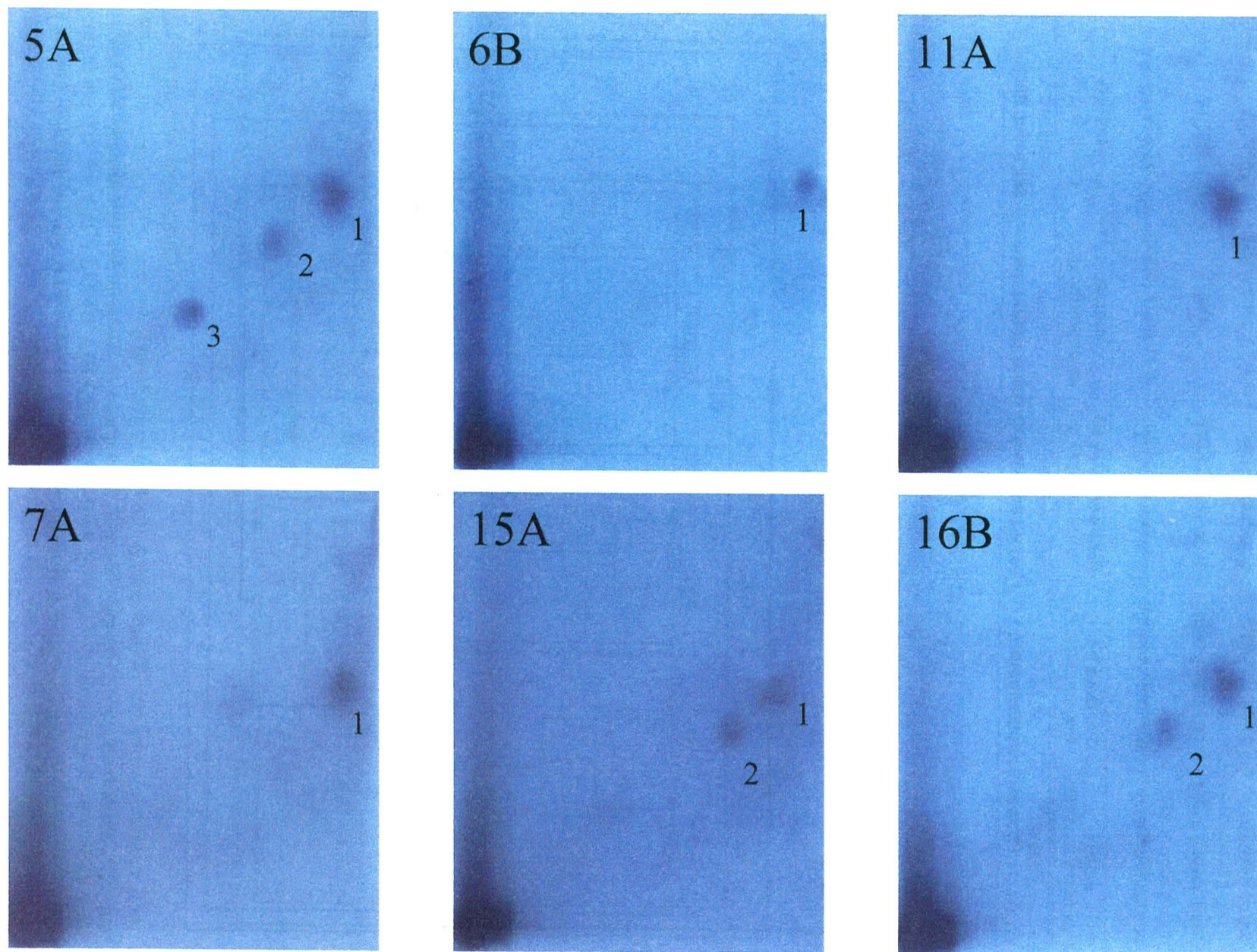


Figure 40: Profils des adduits à l'ADN des stations 5A, 6B, 11A, 7A, 15A et 16B

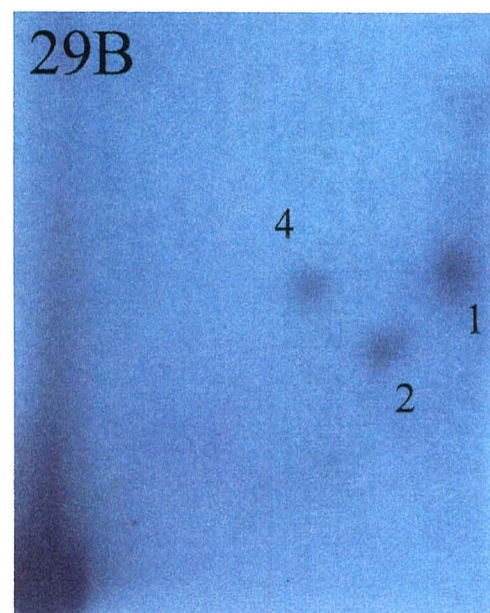
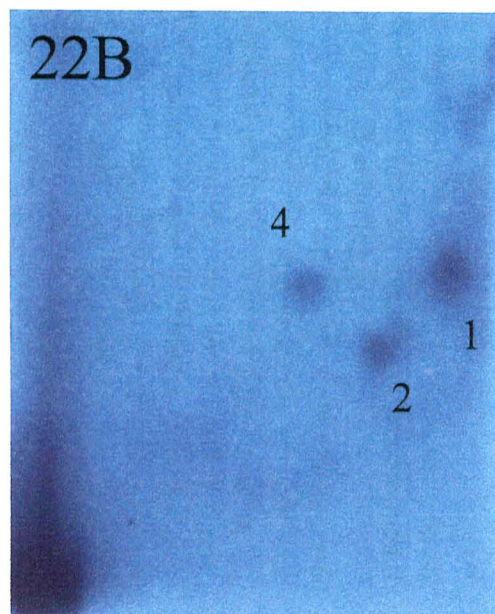
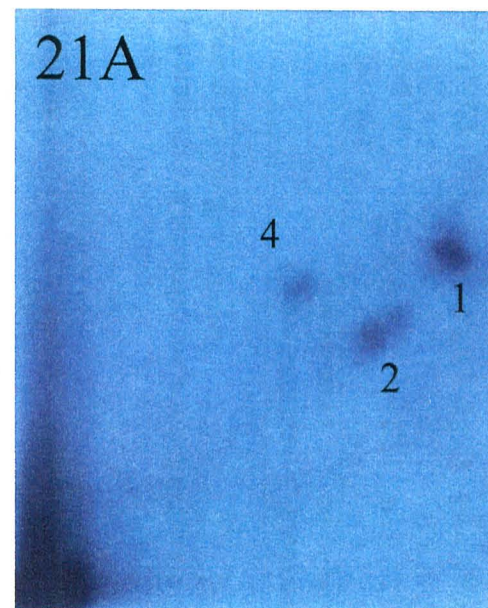
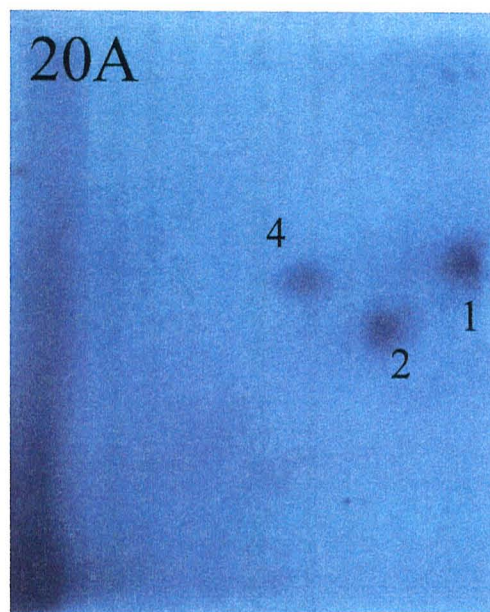
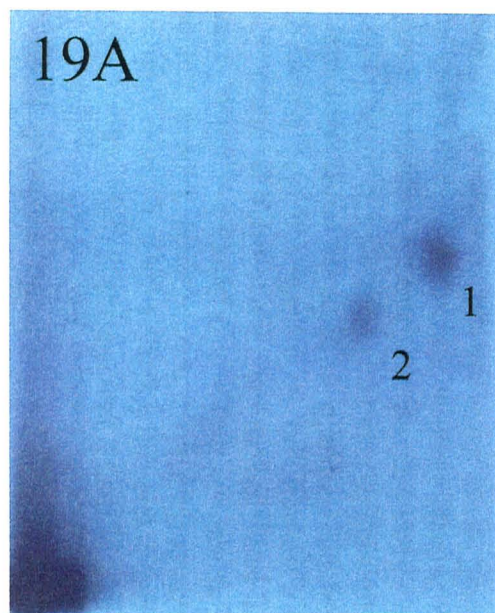


Figure 41: Profils des adduits à l'ADN des stations 19A, 20A, 21A, 22B et 29B

## IV. 2. 2. Analyse quantitative

Pour chaque station, les niveaux d'adduits individuels et totaux ont été récapitulés figure 42. Le dosage des adduits à l'ADN de chaque station ayant été réalisé sur un échantillon unique, aucune analyse statistique n'a pu être effectuée. Néanmoins, des différences quantitatives inter- et intra-stations sont apparues dans les niveaux d'adduits individuels. Ainsi, l'adduit n°1, commun à toutes les stations, est formé en quantité plus importante chez les animaux de la station 16B que chez ceux des stations 15A et 22B. Au sein d'une même station, des différences entre les niveaux d'adduits mesurés sont également observées : dans la station 16B, l'adduit n°1 est formé en quantité plus importante que l'adduit n°2.

Malgré l'absence d'écart type sur les mesures effectuées, un premier classement des stations a pu être proposé en fonction de leurs niveaux d'adduits totaux et donc du degré d'exposition présumé des animaux aux gènes toxiques de l'environnement :

- Stations 21A, 20A, 29B : Degré d'exposition élevé aux gènes toxiques de l'environnement
- Stations 5A, 16B, 19A, 22B : Degré d'exposition moyen
- Stations 6B, 11A, 7A, 15A : Degré d'exposition faible

Pour l'ensemble des stations, une recherche de corrélation entre les niveaux d'adduits (individuels et totaux) et les concentrations en métaux, organochlorés, PCB et HAP a été entreprise (tableau 19).

Tableau 18 : Distribution des différents adduits entre stations

	<b>Stations présentant l'adduit</b>
<b>Adduit n°1</b>	Toutes (5A, 6B, 11A, 7A, 15A, 16B, 19A, 20A, 21A, 22B, 29B)
<b>Adduit n°2</b>	5A, 15A, 16B, 19A, 20A, 21A, 22B, 29B
<b>Adduit n°3</b>	5A
<b>Adduit n°4</b>	20A, 21A, 22B, 29B

Tableau 19 : Recherche de corrélation entre les niveaux d'adduits à l'ADN et le niveau de contamination des animaux.

	<b>Concentration en métaux</b>	<b>Concentration en organochlorés</b>	<b>Concentration en PCB</b>	<b>Concentration en HAP</b>
<b>Adduit 1</b>	R = 0,13, p = 0,71	R = -0,22, p = 0,52	R = 0,14, p = 0,69	R = 0,15, p = 0,66
<b>Adduit 2</b>	R = 0,51, p = 0,11	<b>R = -0,68, p = 0,02</b>	R = -0,07, p = 0,84	R = 0,31, p = 0,36
<b>Adduit 3</b>	R = 0,52, p = 0,10	R = -0,58, p = 0,06	R = -0,03, p = 0,92	R = 0,38, p = 0,25
<b>Adduit 4</b>	R = 0,04, p = 0,90	R = -0,01, p = 0,97	R = -0,40, p = 0,84	R = -0,07, p = 0,84
<b>Adduits totaux</b>	R = 0,46, p = 0,16	<b>R = -0,60, p = 0,05</b>	R = -0,02, p = 0,95	R = 0,31, p = 0,35



Aucune corrélation n'a été observée entre ces différentes classes de contaminants et les niveaux d'adduits n°1, n°3 et n°4 à l'ADN. Une corrélation négative a été observée entre la concentration en organochlorés des animaux et les niveaux d'adduits totaux et d'adduit n°2 à l'ADN.

**V. Discussion**

La comparaison des profils d'adduits obtenus a permis de mettre en évidence chez la moule des différences qualitatives et quantitatives dans les dommages à l'ADN de branchies en fonction du site d'échantillonnage. La formation d'adduits à l'ADN étant directement liée à la présence de composés génotoxiques dans l'environnement, ces différences peuvent être expliquées par l'analyse de stations de niveaux de contamination qualitativement et quantitativement différents. La réalisation d'une classification hiérarchique a ainsi permis d'établir un regroupement des différentes stations en fonction de leur degré de contamination chimique.

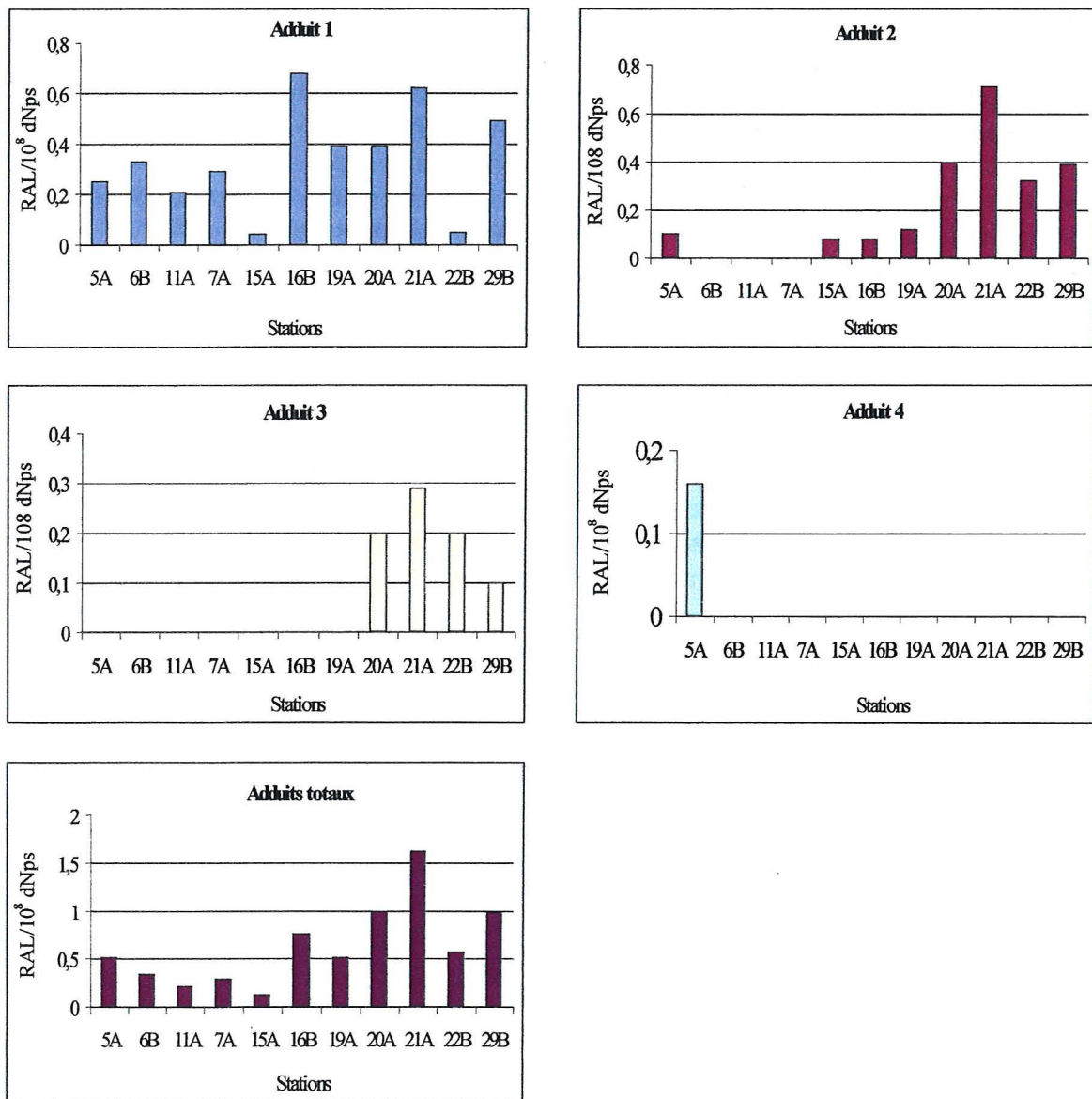


Figure 42 : Niveaux d'adduits mesurés au sein des différentes stations

Parmi les contaminants mesurés, la formation d'adduits à l'ADN a été démontrée chez les vertébrés pour les HAP, PCB et organochlorés par l'application de la technique de post-marquage au  $^{32}\text{P}$  (Hall et Grover, 1990, Dubois et al., 1995). Parmi eux, la formation d'adduits à l'ADN chez la moule a été à ce jour uniquement rapportée pour les HAP (Venier et al., 1996, Canova et al., 1998, Harvey et al., 1999). Néanmoins, au cours de cette étude de terrain, aucune corrélation du niveau d'adduits totaux et des niveaux d'adduits individuels n'a été observée avec la concentration en HAP totaux de la moule entière. Dans le cas des métaux, l'absence de corrélation peut être expliquée par l'inactivation de ces contaminants en adduits stables à l'ADN. Les métaux semblent principalement impliqués dans la formation de dommages oxydatifs à l'ADN. Dans le cas des PCB, leur métabolisation chez la moule reste très incertaine. La seule corrélation observée a été celle entre le niveau d'adduit n°1 et la teneur en organochlorés de la moule entière. Néanmoins, le caractère négatif de cette corrélation rend toute interprétation difficile.

Dans la présente étude, la confrontation des données chimiques avec les niveaux d'adduits à l'ADN n'a donc pas permis l'identification des gènotoxiques impliqués dans la formation des adduits observés. Ces gènotoxiques semblent ne pas être les contaminants ayant fait l'objet d'un dosage chimique au cours de cette étude. On peut néanmoins noter que les adduits n°1, 2 et 3 présentent une migration diagonale semblable à celles des adduits HAP. Leur formation pourrait donc être liée à la présence de composés HAP n'ayant pas été dosés. Parce que l'adduit n°4 est observé uniquement chez les animaux d'une zone géographique bien délimitée (de Marseille à Nice), l'implication de certaines toxines naturelles comme les phycotoxines ou de composés toxiques non analysés au cours de cette étude ne peut être écartée.

L'ensemble de ces résultats montre la difficulté à exploiter les mesures d'adduits à l'ADN lors des études de terrain. En effet, en plus de l'aspect quantitatif, l'interprétation des résultats nécessite également la prise en compte de l'aspect qualitatif des adduits mesurés. L'absence d'identification chimique des adduits détectés par post-marquage au  $^{32}\text{P}$  limite fortement l'interprétation des résultats. Un effort d'identification d'adduits spécifiques de certains contaminants apparaît donc comme primordial pour l'investigation future de la potentialité d'utilisation des adduits à l'ADN en tant que biomarqueurs de gènotoxicité chez la moule.

**CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**



## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette thèse était l'étude de la formation et de l'élimination d'adduits et de 8-oxodGuo à l'ADN de moule, *Mytilus sp*, dans le cas d'une exposition au B[a]P par la voie trophique. Proposé dans le cadre des études de biosurveillance de l'environnement marin, ce travail devait permettre de définir les potentialités d'utilisation de ces deux types de dommages à l'ADN en tant que biomarqueurs de génotoxicité des HAP chez cette espèce sentinelle. A l'issue de nos études de laboratoire et de terrain, des conclusions et des perspectives ont pu être ainsi proposées pour chacun des types de dommages à l'ADN étudiés, ainsi que pour le modèle d'exposition développé au laboratoire.

### LE MODELE D'EXPOSITION

Le modèle d'exposition par la voie trophique développé dans la présente thèse est adapté à la réalisation au laboratoire d'études toxicologiques chez *Mytilus sp*. En effet, l'accumulation à de très fortes concentrations dans la moule du B[a]P incorporé dans la nourriture témoigne de la biodisponibilité de ce polluant pour les organismes exposés. Après absorption, la biotransformation du B[a]P a permis chez la moule l'observation de variations dans l'activité de la majorité des biomarqueurs enzymatiques d'exposition mesurés. De par la formation d'adduits à l'ADN et de 8-oxodGuo, cette exposition a également permis l'expression des effets génotoxiques du B[a]P chez cet organisme. Ce modèle d'exposition en mesocosme est donc adapté à l'étude des perturbations métaboliques engendrées, chez cet invertébré marin, par l'exposition à des contaminants chimiques.

Par comparaison avec une contamination classique des moules au B[a]P par la colonne d'eau, l'exposition par la voie trophique, selon notre modèle, présente un meilleur transfert à l'ADN du B[a]P bioaccumulé dans les tissus de moule (article 2). Cette voie d'exposition, plus proche des conditions du milieu, apparaît donc comme la plus adaptée à l'étude des dommages à l'ADN de cette espèce sentinelle.

Parce que les doses d'exposition au B[a]P utilisées au cours de nos travaux de laboratoire restent théoriques, il serait intéressant d'étudier le comportement du B[a]P incorporé dans la nourriture et de déterminer avec plus de précision l'efficacité d'assimilation de la solution de Marine Liquifry. Ces compléments d'informations permettraient ainsi de préciser la dose réelle d'exposition des moules au B[a]P. En effet, bien que la détermination des concentrations en B[a]P dans la moule entière permette une estimation du niveau d'exposition des animaux, la part de B[a]P métabolisée par la moule n'est pas prise en compte lors du dosage chimique.

### LES ADDUITS A L'ADN

Après exposition au B[a]P, la formation d'adduits à l'ADN témoigne de l'existence de voies d'activation de cet HAP chez la moule et du caractère génotoxique de l'exposition. Les résultats obtenus au laboratoire et sur le terrain légitiment l'utilisation chez la moule des adduits à l'ADN comme biomarqueurs d'exposition et d'effets des HAP.

### ***Etudes de laboratoire :***

Au laboratoire, l'observation, dans les branchies et la glande digestive, de corrélations entre le niveau d'adduits totaux à l'ADN et le temps d'exposition et la concentration tissulaire en B[a]P de la moule entière est favorable à la proposition des adduits comme biomarqueurs d'exposition aux HAP. Parce que chez les vertébrés la formation d'adduits à l'ADN a été identifiée comme un des événements cruciaux de l'initiation de la cancérogenèse chimique, on peut également considérer les adduits chez la moule comme des biomarqueurs potentiels d'effets de cette classe de contaminants. Dans ce sens, il aurait été intéressant d'effectuer en parallèle de la mesure des adduits à l'ADN un examen histopathologique des moules ainsi exposées.

Chez la moule, les branchies sont apparues comme un tissu cible de la formation d'adduits à l'ADN. De ce fait, la mesure des adduits dans les branchies peut permettre une détection plus précoce des effets gènotoxiques engendrés par les polluants. L'application de la technique de post-marquage au <sup>32</sup>P dans ce tissu apparaît ainsi plus pertinente pour les études de biosurveillance de l'environnement marin. Par comparaison avec la glande digestive, cette sensibilité peut être expliquée dans les branchies par une diminution des activités de conjugaison, notamment constatée, dans le cadre de cette thèse, pour l'activité Glutathion-S transférase. Parce que nous avons admis l'existence de mécanismes de réparation des adduits à l'ADN chez la moule (article 4), cette différence de sensibilité entre tissus pourrait également être liée à des différences dans l'efficacité de ces mécanismes de réparation de l'ADN.

Au cours de nos expérimentations de laboratoire, nous avons observé la formation d'adduits du B[a]P à l'ADN de moule pour un niveau d'exposition correspondant à une concentration dans la moule entière comprise entre 50 et 85 mg B[a]P/kg p. s. moule. Bien qu'exprimées en B[a]P, ces concentrations sont du même ordre de grandeur que les concentrations en HAP totaux relevées *in situ* dans la moule entière par le RNO. Néanmoins, de manière à vérifier chez la moule la formation possible d'adduits HAP à l'ADN pour les conditions d'exposition de l'environnement, il serait intéressant d'exposer, selon notre modèle d'exposition, des animaux à un mélange d'HAP réaliste (niveau d'exposition qualitativement et quantitativement représentatif) des conditions du milieu. Une telle expérience permettrait également l'étude des effets combinés liés à la présence de mélange complexe de polluants dans le milieu marin.

### ***Etude de terrain :***

Sur le terrain, la mesure des adduits à l'ADN a permis une discrimination des stations Rinbio en fonction de leur degré de pollution présumée à des substances gènotoxiques. Bien qu'aucun des polluants dosés au cours de cette étude n'ai pu être incriminé dans la formation des adduits observés, ce résultat est favorable à l'intégration des adduits à l'ADN dans les programmes de biosurveillance de l'environnement marin.

Malgré les résultats prometteurs obtenus au cours de cette thèse sur les adduits à l'ADN chez la moule, une remarque majeure peut-être faite sur le travail réalisé. En effet, l'absence d'identification des adduits formés ne nous permet pas en fin de thèse d'apporter des connaissances supplémentaires sur la nature des voies d'activation impliquées dans la

formation d'adduits à l'ADN chez ce bivalve marin. L'existence d'un cytochrome P450-«like» générant entre autres des métabolites dihydrodiols du B[a]P et la mesure putative d'une activité EH chez cet organisme légitiment la suspicion d'une voie d'activation des diol-époxydes similaire à celle des vertébrés. Néanmoins, les résultats présentés récemment par Ross et al. (1999) ne supportent pas cette hypothèse. En effet, ses travaux tendent à démontrer que les adduits du B[a]P à l'ADN de moule résulteraient de la liaison covalente du 4,5-oxyde du B[a]P au niveau de la guanine et de l'adénine.

Outre l'utilisation possible de l'identité structurale des adduits à l'ADN pour l'élucidation des voies métaboliques présentes chez l'organisme étudié, l'identification des adduits est également primordiale pour deux raisons supplémentaires :

- Chez la moule, l'efficacité des mécanismes de réparation des adduits à l'ADN semble dépendre de leur structure chimique. Ainsi, seule la mesure des adduits ayant un caractère persistant dans le temps pourra permettre l'utilisation des adduits à l'ADN chez la moule comme dosimètre moléculaire d'exposition/biomarqueurs d'effets à long terme aux/des composés gènotoxiques présents dans le milieu naturel.
- Au cours de l'étude de terrain Rinbio, la mesure des adduits à l'ADN a permis une discrimination des stations étudiées. Néanmoins, les résultats de cette étude ont clairement mis en évidence la difficulté à identifier la nature des polluants impliqués dans la formation de ces adduits. Seule la disponibilité d'adduits standards, spécifiques des différentes classes de gènotoxiques présentes dans le milieu marin, permettra à l'avenir d'identifier les polluants mis en cause.

La non identification des adduits formés et l'absence de synthèse d'adduits standards étant des facteurs limitant à l'acquisition de connaissances supplémentaires, tant au laboratoire que lors des études de terrain, des efforts importants restent à faire en ce sens. On peut noter également qu'il sera nécessaire à l'avenir de préciser la formation ou non d'adduits dépurinés chez la moule et de déterminer la part respective des adduits stables et dépurinés chez cet organisme. Parce que chez les vertébrés les adduits dépurinés semblent constituer jusqu'à 80% des adduits totaux, la mesure de ce type d'adduits à l'ADN pourrait en effet être plus pertinente.

## **LA 8-OXODGUO**

En ce qui concerne les dommages oxydatifs à l'ADN, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont montré la difficulté de mesurer ces lésions produites à l'état de trace dans l'ADN. Actuellement, la disparité des valeurs rapportées entre les différentes méthodes de mesure ne permet pas, en effet, une estimation fiable du niveau de base de ces lésions à l'ADN. Il est alors difficile de garantir la fiabilité des mesures effectuées en raison de la surestimation possible du nombre de ces lésions lors de l'oxydation artéfactuelle des échantillons d'ADN au cours de leur préparation.

Dans la présente thèse, un protocole de mesure chez la moule de la 8-oxodGuo par CLHP/DE a été proposé. Malgré la réalisation d'un travail méthodologique quant au choix de la méthode d'extraction de l'ADN, le protocole présenté peut être amélioré notamment via l'identification et la maîtrise d'autres sources possibles d'artéfacts qui permettraient ainsi d'augmenter la sensibilité de la mesure. Malgré ces problèmes analytiques, les études réalisées au laboratoire et sur le terrain ont permis d'obtenir de premières informations quant à l'utilisation possible de la 8-oxodGuo chez la moule.

### **Etudes au laboratoire :**

Les résultats obtenus dans le cas d'une exposition au B[a]P ont permis d'identifier la glande digestive comme un tissu cible du stress oxydatif chez la moule. En effet, alors qu'aucun changement n'a été rapporté sur le taux de 8-oxodGuo à l'ADN de branchies, une augmentation significative du nombre de ces lésions a été observée dans la glande digestive en fonction de la dose d'exposition au B[a]P. La 8-oxodGuo est donc apparue dans la glande digestive comme un biomarqueur potentiel de génotoxicité des HAP. A l'issue d'une période d'épuration de quelques jours, le retour des valeurs de 8-oxodGuo à leur niveau de base a également mis en évidence dans ce tissu l'existence de mécanismes de réparation des bases oxydées de l'ADN chez cet invertébré marin.

Dans la glande digestive, l'augmentation du niveau de 8-oxodGuo peut être expliquée par une augmentation de la production d'ERO due à l'entrée dans les cycles redox des métabolites quinones du B[a]P. Dans les branchies, l'existence d'activités de phase I plus faibles peut expliquer la production réduite de quinones formées et ainsi l'absence d'effets observés sur le niveau de 8-oxodGuo. De manière à vérifier cette hypothèse et expliquer les raisons pour lesquelles la glande digestive et les branchies apparaissent respectivement chez la moule comme les tissus cibles du stress oxydatif et de la formation d'adduits à l'ADN, il aurait été intéressant de déterminer pour chacun de ces tissus :

- le profil et l'importance relative des métabolites du B[a]P formés *in vivo* au cours de l'exposition
- les capacités des B[a]P quinones produites à augmenter *in vitro* la production d'ERO
- l'efficacité des mécanismes de réparation des adduits et des bases oxydées de l'ADN

Au laboratoire, l'augmentation du niveau de 8-oxodGuo à l'ADN de glande digestive a été observée pour un niveau d'exposition correspondant à une concentration minimale dans la moule entière comprise entre 100 et 340 mg B[a]P/kg p. s. moule. Parce que dans la glande digestive, l'effet du B[a]P sur la 8-oxodGuo semble être inversement dépendant de la dose d'exposition, la borne inférieure peut avoir été surestimée. L'application d'un protocole de mesure de la 8-oxodGuo non optimisée va également en ce sens : la sensibilité de la méthode pouvant être améliorée. En ce qui concerne la borne supérieure, il serait nécessaire à l'avenir de déterminer l'induction possible, aux fortes concentrations en B[a]P, des mécanismes de réparation des bases oxydées de l'ADN chez la moule. L'expression possible d'un rôle antioxydant du B[a]P nécessiteraient également des investigations supplémentaires. En effet, de par la présence dans sa molécule de double-liaisons, le B[a]P pourrait agir, aux fortes concentrations et au même titre que les vitamines, comme un piègeur d'ERO.

Bien qu'exprimées en B[a]P, ces concentrations restent du même ordre de grandeur que les concentrations en HAP totaux présentes *in situ* dans la moule entière. Comme dans le cas des adduits à l'ADN, l'exposition de moules à un mélange d'HAP réaliste des conditions de l'environnement permettrait de nous prononcer sur l'induction possible par les HAP de cette base oxydée dans les conditions du milieu naturel. Parce que d'autres contaminants, dont en particulier les métaux, sont susceptibles d'augmenter plus fortement la production d'ERO chez la moule, il serait peut-être plus judicieux d'étudier également l'effet d'une exposition aux métaux ou d'un mélange de polluants (métaux, HAP) sur ce type de lésion à l'ADN.

### **Etude de terrain :**

Malgré l'application d'un protocole de mesure non optimisé, des différences de niveaux de 8-oxodGuo ont été observées entre certaines des stations BIOMAR étudiées. Néanmoins,



l'absence d'information sur le degré de contamination chimique des organismes étudiés ne nous a malheureusement pas permis d'identifier les polluants pro-oxydants impliqués dans la formation de cette base oxydée. Au cours de cette étude de terrain, l'observation de corrélations entre le niveau de 8-oxodGuo et la réponse de tous les biomarqueurs du stress oxydatif mesurés (activité catalase, dosage du malondialdéhyde induit et non induit) justifie néanmoins la poursuite d'investigations supplémentaires chez la moule sur l'utilisation possible de la 8-oxodGuo en biosurveillance de l'environnement marin.

### **AUTRES PERSPECTIVES :**

Bien que très prometteuse, la technique de post-marquage au  $^{32}\text{P}$  reste une méthode lourde et onéreuse dont l'application en routine reste très difficile. Bien que plus facile à mettre en œuvre, la méthode de mesure de la 8-oxodGuo par CLHP/DE doit encore être optimisée de manière à en améliorer la sensibilité. En parallèle de ces techniques, il serait donc intéressant à l'avenir de développer des tests plus simples, permettant de juger rapidement de l'étendue des dommages à l'ADN des organismes étudiés. En ce sens, l'application du protocole d'Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction (AP-PCR) mis au point chez la moule dans le cadre de cette thèse pourrait répondre à ces objectifs (Annexe III). Cette technique peut en effet permettre d'étudier le polymorphisme de l'ADN engendré par l'exposition à des contaminants génotoxiques.

Que ce soit pour les adduits à l'ADN ou la 8-oxodGuo, aucune information quant à la séquence génétique endommagée n'est apportée par les techniques de post-marquage au  $^{32}\text{P}$  et CLHP/DE. A l'avenir, l'étude de la formation de ces lésions à l'ADN dans une séquence génétique codante et pertinente d'un point de vue écotoxicologique (gènes impliqués dans la reproduction ou la croissance) chez la moule permettrait d'augmenter la signification biologique de ces biomarqueurs potentiels. Dans le cas de la 8-oxodGuo, la découverte, chez les bactéries et les levures, d'activités enzymatiques spécifiques de réparation de ces bases oxydées pourrait permettre de réaliser de telles études grâce aux techniques de biologie moléculaire (Annexe IV).



## **LISTE DES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- Accomando, R., Viarengo, A., Bordone, R., Taningher, M., Canesi, L., Orunesu, M. (1991). A rapid method for detecting DNA strand breaks in *Mytilus galloprovincialis* Lam. induced by genotoxic xenobiotic chemicals. *Internatl. J. Biochem.*, 23, 227-229.
- Adams, J. D., Yagi, H., Levin, W., Jerina, D. M. (1995). Stereo-selectivity and regio-selectivity in the metabolism of 7,8-dihydrobenzo[a]pyrene by cytochrome P450, epoxide hydrolase and hepatic microsomes from 3-methylcholanthrene-treated rats. *Chem.-Biol. Interact.*, 95: 57-77.
- Adams, R. L. P. (1990). DNA methylation: the effect of minor bases on DNA-protein interactions. *Biochem. J.*, 265: 309-320.
- 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.
- Allison, N., Millward, G. E., Jones, M. B. (1998). Particle processing by *Mytilus edulis*: effects on bioavailability of metals. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 222: 149-162.
- Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E., Lee, F. D. (1973). Carcinogens are mutagens: A simple test combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 2281-2285.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90: 7915-7922.
- Amiard, J-C., Caquet, T., Lagadic, L. (1998). Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In: *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J-C., Ramade, F. (Eds), Lavoisier TEC&DOC, Paris, pp XXI-XXXI.
- Anson, R. M., Croteau, D. L., Stierum, R. H., Filburn, C., Parsell, R., Bohr, V. A. (1998). Homogenous repair of singlet oxygen-induced DNA damage in differentially transcribed regions and strands of human mitochondrial DNA. *Nucl. Acids Res.*, 26: 662-668.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Dizdaroglu, M. (1989). Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 264: 13024-13028.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Gajeswki, E., Dizdaroglu, M. (1991). Copper-ion dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, 273: 601-604.
- Aruoma, O.I. (1998). Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 75: 199-212.
- Auffret, M. (1988). Histopathological changes related to chemical contamination in *Mytilus edulis* from field and experimental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 46: 101-107.
- Aust, S. D., Morehouse, L. A., Thomas, C. E. (1985). Role of metals in oxygen radical reactions.

*J. free Rad. Biol. Med.*, 1: 3-25.

Barrett, J. C. (1992). Mechanisms of action of known human carcinogens. In: *Mechanisms of Carcinogen. in risk assessment*. Vainio, H., Magee, P. N., McGregor, D. B., McMichael, A. J. (Eds). *Internatl. Agenc. Res. Cancer, Lyon, France*, pp 115-134.

Bartsch, H. (1996). DNA adducts in human carcinogenesis: etiological relevance and structure-activity relationship. *Mutat. Res.*, 340: 67-79.

Batel, R., Vukmirovic, M., Bihari, N., Zahn, R. K., Muller, W. E. G. (1993). Nonradiometric detection of DNA crosslinks in mussel haemolymph by alkaline elution. *Anal. Biochem.*, 212: 402-406.

Bayney, R. M., Morton, M. R., Favreau, L. V., Pickett, C. B. (1989). Rat liver NAD(P)H:quinone reductase. Regulation of quinone reductase gene expression by planar aromatic compounds and determination of the exon structure of the quinone reductase structural gene. *J. Biol. Chem.*, 264, 21793-21797.

Belleville-Nabet, F., Bagrel, A., Nabet, F. (1995). Mesure des radicaux libres: méthodes directes et indirectes. *Annales médicales de Nancy et de l'Est*, tome XXXIV, numéro 2.

Benson, A. M., Hunkeler, M. J., Talalay, P. (1980). Increases of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants. Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5216-5220.

Berthou, F., Balouet, G., Bodennec, G., Marchand, M. (1987). The occurrence of hydrocarbons and histopathological abnormalities in oysters for seven years following the wreck of the *Amoco Cadiz* in Brittany (France). *Mar. Environ. Res.*, 23: 103-133.

Bihari, N., Batel, R., Zahn, R. K. (1990). DNA damage determination by the alkaline elution technique in the haemolymph of mussel *Mytilus galloprovincialis* treated with benzo[a]pyrene and 4-nitroquinoline-N-oxide. *Aquat. Toxicol.*, 18: 13-22.

Bjelogrlic, N. M., Mäkinen, M., Stenbäck, F., Vähäkangas, K. (1994). Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-DNA adducts and increased p53 protein in mouse skin. *Carcinogen.*, 15: 771-774.

Blakely, W. F., Fuciarelli, B. J., Wegher, B. J., Dizdaroglu, M. (1990). Hydrogen peroxide-induced base damage in deoxyribonucleic acid. *Rad. Res.*, 121: 338-343.

Bolognesi, C., Rabboni, R., Roggieri, P. (1996). Genotoxicity biomarkers in *M. galloprovincialis* as indicators of marine pollution. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113C: 319-323.

Botello, A. V., Villanueva F., S., Diaz G., G. (1997). Petroleum pollution in the Gulf of Mexico and Caribbean Sea. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 153: 91-118.

Britvic, S., Lucic, D., Kurelec, B. (1993). Bile fluorescence and some early biological effects in fish as indicators of pollution by xenobiotics. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 765-773.

Burgeot, T. (1994). L'ethoxyresorufine-o-deethylase, les adduits à l'ADN et les micronuclei dans les organismes marins. Application à la surveillance des effets biologiques sur les côtes françaises. *Thèse de Doctorat, Université de Nantes, Faculté des Sciences et des Techniques*.

Burgeot, T., Bocquené, G., Porte, C., Dimeet, J., Santelle, R. M., Garcia de la Parra, L. M., Pfohl-Leskowicz, A., Raoux, C., Galgani, F. (1996). Bioindicators of pollutant exposure in the Northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 131: 125-141.

Burns, K. A. (1993). Evidence for the importance of including hydrocarbon oxidation products in environmental assessment studies. *Mar. Poll. Bull.*, 26: 7784.

Cadenas, E. (1995). Antioxidant and prooxidant functions of DT-diaphorase in quinone metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, 49: 127-140.

Cadet, J., Ravanat, J-L., Buchko, G. W., Yeo, H. C., Ames, B. N. (1994). Singlet oxygen DNA damage: chromatographic and mass spectrometric analysis of damage products. *Methods Enzymol.*, 234: 79-88.

Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J-L. (1997a). Artifacts associated with the measurement of oxidized DNA bases. *Environ. Health Perspect.*, 105: 1034-1039.

Cadet, J., Berger, M., Douki, T., Ravanat, J-L. (1997b). Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biological significance. *Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 1-87.

Cadet, J., D'Ham, C., Douki, T., Pouget, J-P., Ravanat, J-L., Sauvaigo, S. (1998). Facts and artifacts in the measurement of oxidative base damage to DNA. *Free Rad. Res.*, 29: 541-550.

Cajaraville, M. P., Uranga, J. A., Angulo, E. (1992). Comparative effects of the water accommodated fraction of three oils on mussels -3. Quantitative histochemistry of enzymes related to the detoxication metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.*, 103C: 369-377.

Cajaraville, M. P., Uranga, J. A., Angulo, E. (1993). Light microscopic catalase histochemistry in mussel digestive gland tissue. *Histol. Histopathol.*, 8: 537-546.

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.*, 399: 17-30.

Cavaliere, E. L., Rogan, E. G., Cremonesi, P., Devanesan, P. D. (1988). Radical cations as precursor in the metabolic formation of quinones from benzo[a]pyrene and 6-fluorobenzo[a]pyrene. Fluor substitution as a probe for one-electron oxidation in aromatic substrates. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 2173-2182.

Cavaliere, E. L., Rogan, E. G., Devanesan, P. D., Cremonesi, P., Cerny, R. L., Gross, M. L., Bodell, W. J. (1990a). Binding of Benzo[a]pyrene to DNA by cytochrome P-450 catalyzed one-electron oxidation in rat liver microsomes and nuclei. *Biochem.*, 29: 4820-4827.

Cavalieri, E. L., Rogan, E. G., Cremonesi, P., Devanesan, P. D. (1990b). Radical cations as precursors in the metabolic formation of quinones from benzo[a]pyrene and 6-fluorobenzo[a]pyrene. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 2173-2182.

Cavalieri, E. L., Rogan, E. G. (1992). The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. *Pharmacol. Ther.*, 55: 183-199.

Cavalieri, E. L., Rogan, E. G. (1995). Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica*, 25: 677-688.

Cavalieri, E. L., Rogan, E. G. (1998). Role of aromatic hydrocarbons in disclosing how catecholestrogens initiate cancer. *Adv. Pharmacol.*, 42: 837-840.

Celotti, L., Ferraro, P., Furlan, D., Zanesi, N., Pavanello, S. (1993). DNA repair in human lymphocytes treated *in vitro* with ( $\pm$ )-*anti* and ( $\pm$ )-*syn* -benzo[a]pyrene diolepoxide. *Mutat. Res.*, 294: 117-126.

Cerda, S., Weitzman, S. A. (1997). Influence of oxygen radical injury on DNA methylation. *Mutat. Res.*, 386: 141-152.

Chakravarti, D., Pelling, J. C., Cavalieri, E. L., Rogan, E. G. (1995). Relating aromatic hydrocarbon-induced DNA adducts and c-Harvey-*ras* mutations in mouse skin papillomas: The role of apurinic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 10422-10426.

Chanock, S. J., Faust, L. R., Barrett, D., Bizal, C., Maly, F. E., Newburger, P. E., Ruedi, J. M., Smith, R. M., Babior, B. M. (1992).  $O_2^-$  production by B lymphocytes lacking the respiratory burst oxidase subunit p47phox after transfection with an expression vector containing a p47phox cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 10174-10177.

Chaudhary, A. K., Nokubo, M., Marnett, L. J., Blair, I. A. (1994). Analysis of the malondialdehyde-2'-deoxyguanosine adduct in rat liver DNA by gas chromatography/electron capture negative chemical ionization mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.*, 23: 457-464.

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. *Chem. Res. Toxicol.*, 9: 897-903.

Chen, R-H., Maher, V. M., McCormick, J. J. (1991). Lack of a cell cycle-dependant strand bias for mutations induced in the HPRT gene by ( $\pm$ )-7 $\beta$ , 8 $\alpha$ -dihydroxy-9 $\alpha$ , 10 $\alpha$ -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene in excision repair deficient cells. *Cancer Res.*, 51: 2587-2592.

Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S., Loeb, L. A. (1992). 8-hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G  $\rightarrow$  T and A  $\rightarrow$  C substitutions. *J. Biol. Chem.*, 267: 166-172.



Chipman, J. K., Marsh, J. W. (1991). Bio-techniques for the detection of genetic toxicity in the aquatic environment. *J. Biotechnol.*, 17: 199-208.

Claiborne, A. (1985). In: *Handbook of methods for oxygen radical research*. C. R. C. Press, Boca Raton, Florida, pp 283-284.

Claisse, D., Joanny, M., Quintin, J-Y. (1992). Le réseau national d'observation de la qualité du milieu marin (RNO). *Analysis*, 20: 19-22.

Colapietro, A-M., Goodell, A. L., Smart, R. C. (1993). Characterization of benzo[a]pyrene-initiated mouse skin papillomas for Ha-ras mutations and protein kinase C levels. *Carcinogen.*, 14: 2289-2295.

Collier, T. K., Stein, J. E., Goksøyr, A., Myers, M. S., Gooch, J. W., Hugget, R. J., Varanasi, U. (1993). Biomarkers of PAH exposure in oyster toadfish (*Opsanus tau*) from the Elizabeth River, Virginia. *Environ. Sci.*, 2: 161-177.

Conney, A. H. (1982). Induction of microsomal enzymes by foreign chemical and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res.*, 42: 4875-4917.

Cossa, D., Meybeck, M., Idlafkih, Z., Bomblet, B. (1994). Etude pilote des apports en contaminants par la Seine. *Rapport Ifremer, Agence de l'eau Seine-Normandie et Ministère de l'environnement. R. Int. DEL.94.13. Nantes.*

Cuniasso, P., Fazakerley, G. V., Guschlbauer, V., Kaplan, B. E., Sowers, L. C. (1990). The abasic site as a challenge to DNA polymerase. A nuclear magnetic resonance study of G, C and T opposite a model abasic site. *J. Molecul. Biol.*, 213: 303-314.

Demple, B., Harrison, L. (1994). Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Ann. Rev. Biochem.*, 63: 915-948.

De Vries, A., Dollé, M. E. T., Broekhof, J. L. M., Muller, J. J. A., Dinant Kroese, E., Van Kreijl, C. F., Capel, P. J. A, Vijg, J., Van Steeg, H. (1997). Induction of DNA adducts and mutations in spleen, liver and lung of XPA-deficient/lac Z transgenic mice after oral treatment with benzo[a]pyrene: correlation with tumor development. *Carcinogen.*, 18: 2327-2332.

Devanesan, P. D., Ramakrishna, N. V. S., Todorovic, R., Rogan, E. G., Cavalieri, E. L., Jeong, H., Jankowiak, R., Small, G. J. (1992). Identification and quantitation of Benzo[a]pyrene-DNA adducts formed by rat liver microsomes *in vitro*. *Chem. Res. Toxicol.*, 5: 302-309.

Devanesan, P. D., Higginbotham, S., Ariese, F., Jankowiak, R., Suh, M., Small, G. J., Cavalieri, E. L., Rogan, E. G. (1996). Depurinating and stable Benzo[a]pyrene-DNA adducts formed in isolated rat liver nuclei. *Chem. Res. Toxicol.*, 9: 1113-1116.

Di Mascio, P., Wefers, H., Do-Thy, H-P., Lafleur, M. V., Sies, H. (1989). Singlet molecular oxygen causes loss of biological activity in plasmid and bacteriophage DNA and induces single strand breaks. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1007: 151-157.

Dizdaroglu, M., Bergtold, D. S. (1986). Characterization of free radical-induced base damage in DNA at biologically relevant levels. *Anal. Biochem.*, 156: 182-188.

Douki, T., Martini, R., Ravanat, J-L., Turesky, R. J., Cadet, J. (1997). Measurement of 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine and 8-oxo-7,8-dihydroguanine in isolated DNA exposed to gamma radiation in aqueous solution. *Carcinogen.*, 18: 2385-2391.

Dubois, M., Pffhol Leszkowicz, A., Grosse, Y., Kremers, P. (1995). DNA adducts and P450 induction in human, rat and avian liver cells after exposure to polychlorobiphenyls. *Mutat. Res.*, 345: 181-190.

Dulbecco, R. (1982). La biologie du cancer. In: *La Recherche sur le cancer, Editions du Seuil, La Recherche, Paris, France*, pp 11-26.

Dunn, B. P., Black, J. J., Maccubin, A. (1987). <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of aromatic DNA adducts in fish from polluted areas. *Cancer Res.*, 47: 6543-6548.

Estabrook, R. W. (1978). Microsomal electron-transport reactions: an overview. *Methods Enzymol.*, 52: 43-47.

Estabrook, R. W., Werringloer, J. (1978). The measurement of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes. *Methods Enzymol.*, 52: 212-220.

Epe, B. (1993). DNA damage induced by photosensitization. In: *DNA and free radicals, Halliwell, B., Aruoma, O. I. (Eds), Ellis Horwood Limited, England*, pp 41-65.

Ericson, G., Liewenborg, B., Balk, L. (1995). Comparative <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of DNA adducts in perch (*Perca fluviatilis*) from unpolluted and polluted areas in Swedish coastal waters. *Mar. Environ. Res.*, 39: 303-307.

Ernster, L. (1976). DT diaphorase. *Methods Enzymol.*, 10: 309-317.

Esterbauer, H., Eckl, P., Ortner, A. (1990). Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat. Res.*, 238: 223-233.

Esterbauer, H., Schaur, R. J., Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.*, 11: 81-128.

Fahl, W. E., Scarpelli, D. G., Gill, K. (1981). Relationship between Benzo(a)pyrene-induced DNA base modification and frequency of reverse mutations in mutant strains of *Salmonella typhimurium*. *Cancer Res.*, 41: 3400-3406.

Feig, D. I., Sowers, L. C., Loeb, L. A. (1994). Reverse chemical mutagenesis: identification of the mutagenic lesions resulting from reactive oxygen species-mediated damage to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 6609-6613.

Feinberg, A. P., Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human

cancers from their normal counterparts. *Nature*, 301: 89-92.

Fitzpatrick, P. J., Krag, T. O. B., Højrup, P., Sheehan, D. (1995a). Characterization of a glutathione S-transferase and a related glutathione-binding protein from gill of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Biochem. J.*, 305: 145-150.

Fitzpatrick, P. J., Sheehan, D., Livingstone, D. R. (1995b). Studies on isoenzymes of glutathione S-transferase in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* with exposure to pollution. *Mar. Environ. Res.*, 39: 241-244.

Flesher, J. W., Sydnor, K. L. (1973). Possible role of 6-hydroxymethylbenzo[a]pyrene as a proximate carcinogen of benzo[a]pyrene and 6-methylbenzo[a]pyrene. *Internatl. J. Cancer*, 11: 433-437.

Flesher, J. W., Stansbury, K. H., Kadry, A. M., Myers, S. R. (1983). Bio-alkylation of benzo[a]pyrene in rat lung and liver. In: *Extrahepatic drug metabolism and Chem. Carcinogen.*, Rydstrom, J., Montelius, J., Bengtsson, M. (Eds), Elsevier Science, Amsterdam, pp 237-238.

Flesher, J. W., Myers, S. R., Stansbury, K. H. (1990). The site of substitution of the methyl group in the bioalkylation of benzo[a]pyrene. *Carcinogen.*, 11: 493-496.

Flesher, J. W., Myers, S. R. (1991). Rules of molecular geometry for predicting carcinogenic activity of unsubstituted polynuclear aromatic hydrocarbons. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 11: 41-54.

Flowers-Geary, L., Harvey, R. G., Penning, T. M. (1992). Examination of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinones produced by dihydrodiol dehydrogenase as substrates for redox-cycling in rat liver. *Biochem.*, 11: 49-58.

Flowers-Geary, L., Harvey, R. G., Penning, T. M. (1995). Identification of Benzo[a]pyrene-7,8-dione as an authentic metabolite of ( $\pm$ )-*trans*-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene in isolated rat hepatocytes. *Carcinogen.*, 16: 2707-2715.

Flowers, L., Bleczynski, W. F., Burczynski, M. E., Harvey, R. G., Penning, T. M. (1996). Disposition and biological activity of Benzo[a]pyrene-7,8-dione. A genotoxic metabolite generated by dihydrodiol dehydrogenase. *Biochem.*, 35: 13664-13672.

Floyd, R. A., Watson, J. J., Wong, P. K., Altmiller, D. H., Rickard, R. C. (1986). Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Rad. Res. Comm.*, 1: 163-172.

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. *Carcinogen.*, 14: 629-635.

French, B. L., Reichert, W. L., Hom, T., Nishimoto, M., Sanborn, H. R., Stein, J. E. (1996). Accumulation and dose-response of hepatic DNA adducts in English sole (*Pleuronectes vetulus*)

exposed to a gradient of contaminated sediments. *Aquat. Toxicol.*, 36: 1-16.

Frithjof, E. M., Walday, M. (1996). Accumulation and depuration of organic micropollutants in marine hard bottom organisms. *Mar. Poll. Bull.*, 33: 56-63.

Fritsche, M., Haessler, C., Brandner, G. (1993). Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogen.*, 8: 307-318.

Frosina, G., Fortini, P., Rossi, O., Carrozzino, F., Raspaglio, G., Cox, L. S., Lane, D. P., Abbondandolo, A., Dogliotti, E. (1996). Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 271: 9573-9578.

Funk, M., Gath, I., Seidel, A., Oesch, F., Platt, K. L. (1995). Conjugation of anti-dihydrodiol epoxides of benzo[a]pyrene, chrysene, benzo[c]phenanthrene and dibenz[a,h]anthracene with glutathione catalyzed by cytosol and by the Mu-class glutathione transferase HTP II from rat liver. *Chem.-Biol.Interact.*, 95: 189-201.

Galgani, F., Bocquéné, G. (1988). A method for routine detection of organophosphorous and carbamates in sea water. *Environ. Technol. Lett.*, 10: 311-322.

Gamble, S. C., Goldfarb, P. S., Porte, C., Livingstone, D. R. (1995). Glutathione peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*). *Mar. Environ. Res.*, 39: 191-195.

Garcia Martinez, P., O'Hara, S., Winston, G. W., Livingstone, D. R. (1990). Oxyradical generation and redox cycling mechanisms in digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar. Environ. Res.*,

Garcia Martinez, P., Hajos, A. K. D., Livingstone, D. R., Winston, G. W. (1992). Metabolism and mutagenicity of 4-nitroquinoline N-oxide by microsomes and cytosol of digestive gland of the mussel *Mytilus edulis* L. *Mar. Environ. Res.*, 34: 303-307.

Garcia Martinez, P., Livingstone, D. R. (1995). Benzo[a]pyrene-dione-stimulated oxyradical production by microsomes of digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar. Environ. Res.*, 39: 185-189.

Garcia Martinez, P., Winston, G. W., Metosh-Dickey, C., O'Hara, S. C. M., Livingstone, D. R. (1995). Nitrofurantoin-stimulated reactive oxygen species production and genotoxicity in digestive gland microsomes and cytosol of the common mussel (*Mytilus edulis* L.). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 131: 332-341.

Gardner, G. R., Yevich, P. P., Harshbarger, J. C., Malcom, A. R. (1991). Carcinogenicity of Black Rock Harbor, Bridgeport, CT, sediment to the eastern oyster and trophic transfer of Black Rock Harbor carcinogens from the blue mussel to the winter flounder. *J. Environ. Health Perspect.*, 90: 53-66.

Gardner, G. R., Pruell, R. J., Malcolm, A. R. (1992). Chemical induction of tumors in oysters by

a mixture of aromatic and chlorinated hydrocarbons, amines and metals. *Mar. Environ. Res.*, 34: 59-63.

Gardner, G. R. (1993). Chemically induced histopathology in aquatic invertebrates. In: Pathobiology of marine and estuarine organisms. Couch, J. A., Fournie, J. W. (Eds), pp 359-391.

Gelboin, H. V. (1980). Benzo[a]pyrene metabolism, activation, and carcinogenesis: Role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol. Rev.*, 60: 1107-1166.

Gentil, A., Cabral-Neto, J. B., Mariage-Samson, R., Margot, A., Imbach, J. L., Rayner, B., Sarasin, A. (1992). Mutagenicity of a unique apurinic/aprimidinic site in mammalian cells. *J. Mol. Biol.*, 227: 981-984.

Gilewicz, M., Guillaume, J. R., Carles, D., Leveau, M., Bertrand, J-C. (1984). Effects of petroleum hydrocarbons on the cytochrome P450 content of the mollusk bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Biol.*, 80: 155-159.

Girard, P. M., Boiteux, S. (1997). Repair of oxidized DNA bases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim.*, 79: 559-566.

Göksoyr, A., Förlin, L. (1992). The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.*, 22: 287-312.

Goldberg, E. D. (1975). The mussel watch. A first step in global marine biomonitoring. *Mar. Poll. Bull.*, 6: 111.

Grover, P. L. (1986). Pathways involved in the metabolism and activation of polycyclic hydrocarbons. *Xenobiotica*, 16: 915-931.

Guyton, K. Z., Kensler, T. W. (1993). Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Brit. Med. Bull.*, 49: 523-544.

Habig, W. H., Pabst, M. J., Jackoby, W. B. (1974). The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249: 7130-7139.

Hall, M., Forrester, L. M., Parker, D. K., Grover, P. L., Wolf, C. R. (1989). Relative contribution of various forms of cytochrome P450 to the metabolism of benzo(a)pyrene by human liver microsomes. *Carcinogen.*, 10: 1815-1821.

Hall, M., Grover, P. L. (1990). Polycyclic aromatic hydrocarbons, metabolism, activation and tumor initiation. In: *Chem. Carcinogen. and mutagenesis. Handbook of experimental pharmacology*, Cooper, C. S., Grover, P. L. (Eds), Springer-Verlag, London, 94: 327-372.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.*, 186: 1-85.

Harris, G., Bashir, S., Winyard, P. G. (1994). 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine present in

DNA is not simply an artifact of isolation. *Carcinogen.*, 15: 411-413.

Harvey, J. S., Parry, J. M. (1997). The detection of genotoxin-induced DNA adducts in the common mussel *Mytilus edulis*. *Mutagen.*, 12: 153-158.

Harvey, J. S., Lyons, B. P., Waldock, M., Parry, J. M. (1997). The application of the <sup>32</sup>P-postlabelling assay to aquatic biomonitoring. *Mutat. Res.*, 378: 77-88.

Harvey, J. S., Parry, J. M. (1998). The analysis of DNA adduct formation, removal and persistence in the common mussel *Mytilus edulis* exposed to 4-nitroquinoline 1-oxide. *Mutat. Res.*, 399: 31-42.

Harvey, J. S., Lyons, B. P., Page, T. S., Stewart, C., Parry, J. M. (1999). An assessment of the genotoxic impact of the Sea Empress oil spill by the measurement of DNA adduct levels in selected invertebrate and vertebrate species. *Mutat. Res.*, 441: 103-114.

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. USA*, 95: 288-293.

Hendricks, J. D., Meyers, T. R., Shelton, D. W., Casteel, J. L., Bailey, G. S. (1985). Hepatocarcinogenicity of benzo[a]pyrene to rainbow trout by dietary exposure and intraperitoneal injection. *J. Natl. Cancer Inst.*, 74: 839-851.

Herbert, A., Zahn, R. K. (1990). Monitoring DNA damage in *Mytilus galloprovincialis* and other aquatic animals. *Z. Angew. Zool.*, 77: 13-33.

Herman, J. G., Latif, F., Weng, Y., Lerman, M. I., Zbar, B., Liu, S., Samid, D., Duan, D-R. R., Gnarr, J. R., Marston Linehan, Baylin, S. B. (1994). Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 9700-9704.

Higinbotham, K. G., Rice, J. M., Diwan, B. A., Kasprzak, K. S., Reed, C. D., Perantoni, A. O. (1992). GGT to GTT transversions in codon 12 of the K-ras oncogene in rat renal sarcomas induced with nickel subsulfide or nickel subsulfide/iron are consistent with oxidative damage to DNA. *Cancer Res.*, 52: 4747-4751.

Hruszkewycz, A. M., Canella, K. A., Peltonen, K., Kotrappa, L., Dipple, A. (1992). DNA polymerase action on benzo[a]pyrene-DNA adducts. *Carcinogen.*, 13: 2347-2352.

Huberman, E., Sachs, L., Yang, S. K., Gelboin, H. V. (1976). Identification of mutagenic metabolites of benzo(a)pyrene in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 607-611.

Husgafvel-Pursiainen, K., Hackman, P., Radanpää, M., Anttila, S., Karjalainen, A., Partanen, T., Taikinia-Aho, O., Heikkilä, L., Vainio, H. (1993). K-ras mutations in human adenocarcinoma of the lung: association with smoking and occupational exposure to asbestos. *Internatl. J. Cancer*, 53: 250-256.

Husgafvel-Pursiainen, K., Ridanpaa, M., Anttila, S., Vainio, H. (1995). p53 and *ras* gene mutations in lung cancer: implications for smoking and occupational exposures. *J. Occupation. Environ. Med.*, 37: 69-76.

Ibarrola, I., Navarro, E., Iglesias, J. I. P. (1998). Short-term adaptation of digestive processes in the cockle *Cerastoderma edule* exposed to different food quantity and quality. *J. Comp. Physiol. B*, 168: 32-40.

ICES (1996). Report of the working group on biological effects of contaminants. Ostend, Belgium. 4-7 March. ICES CM 1996/ENV:5, Ref:E. *International Council for the Exploration of the Sea. Paleagade 264 DK-1261 Copenhagen K Denmark.*

Ishikawa, T., Masahito, P., Takayama, S. (1984). Usefulness of the medaka, *Oryzias latipes*, as a test animal: DNA repair processes in medaka exposed to carcinogens. *Natl. Cancer Inst. Monograph.*, 65: 35.

Jacobi, H., Eicke, B., Witte, I. (1998). DNA strand break induction and enhanced cytotoxicity of propyl gallate in the presence of copper (II). *Free Rad. Biol. Med.*, 24: 972-978.

James, M. O. (1987). Conjugation of organic pollutants in aquatic species. *Environ. Health Perspect.*, 71: 97-104.

James, M. O. (1989). Cytochrome P450 monooxygenases in crustacea. *Xenobiotica*, 19: 1063-1076.

James, M. O., Hawkins, W. E., Walker, W. W. (1994). Phase 1 and phase 2 biotransformation and carcinogenicity of 2-acetylaminofluorene in medaka and guppy. *Aquat. Toxicol.*, 28: 79-95.

James, M. O., Altman, A. H., Li, C-L. J., Schell, J. D. (1995). Biotransformation, hepatopancreas DNA binding and pharmacokinetics of benzo[a]pyrene after oral and parental administration to the American lobster, *Homarus americanus*. *Chem.-Biol. Interact.*, 95: 141-160.

JAMP (1998). JAMP Guidelines for contaminant-specific biological effects monitoring. *Oslo and Paris Commissions, London*, pp38.

Jeffrey, A. M., Jennette, K. W., Blobstein, S. H., Weinstein, I. B., Beland, F. A., Harvey, R. G., Kasai, H., Miura, I., Nakanishi, K. (1976). Benzo[a]pyrene-nucleic acid derivative found *in vivo*: structure of a Benzo[a]pyrene dihydrodiol epoxide-guanosine adduct. *J. Amer. Chem. Soc.*, 98: 5714-5715.

Jelinsky, S. A., Liu, T., Geacintov, N. E., Loechler, E. L. (1995). The major, N<sup>2</sup>-Gua adduct of the (+)-*anti* diol epoxide is capable of inducing G → A and G → C, in addition to G → T, mutations. *Biochem.*, 34:13545-13553.

Jernström, B., Gräslund, A. (1994). Covalent binding of benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol 9,10-epoxides to DNA : molecular structures, induced mutations and biological consequences. *Biophys. Chem.*, 49: 185-199.

- Joseph, P., Xie, T., Xu, Y., Jaiswal, A. K. (1994). NAD(P)H: quinone oxidoreductase<sub>1</sub> (DT-diaphorase): Expression, regulation, and role in cancer. *Oncol. Res.*, 6: 525-532.
- Joseph, P., Jaiswal, A. K. (1998). NAD(P)H: quinone oxidoreductase<sub>1</sub> reduces the mutagenicity of DNA caused by NADPH: P450 reductase-activated metabolites of benzo(a)pyrene quinones. *Brit. J. Cancer*, 77: 709-719.
- Jurado, J., Sapparbaev, M., Matray, T. J., Greenberg, M. M., Laval, J. (1998). The ring fragmentation product of thymidine C5-hydrate when present in DNA is repaired by the *ESciherichia coli* Fpg and Nth proteins. *Biochem.*, 37: 7757-7763.
- Karakaya, A., Jaruga, P., Bohr, V. A., Grollman, A. P., Dizdaroglu, M. (1997). Kinetics of excision of purine lesions from DNA by *ESciherichia coli* Fpg protein. *Nucl. Acids Res.*, 25: 474-479.
- Kappus, H. (1991). Lipid peroxidation: mechanism and biological relevance. In: *Free radicals and food additives*, Aruoma, O. I., Halliwell, B. (Eds), Burgess Science Press, Basingstoke, pp 59-75.
- Kaur, H., Halliwell, B. (1996). Measurement of oxidized and methylated DNA bases by HPLC with electrochemical detection. *Biochem. J.*, 318: 21-23.
- Khandwala, A. S., Kasper, C. B. (1973). Preferential induction of aryl hydroxylase activity in rat liver nuclear envelope by 3-methylcholanthrene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 54: 1241-1246.
- Kim, K. B., Lee, B. M. (1997). Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. *Cancer Lett.*, 113: 205-212.
- Kirby, G. M., Hayes, M. A. (1992). Significance of liver neoplasia in wild fish: assessment of pathophysiologic responses of biomonitor species to multiple stress factors. In: *Proceedings of the eighteenth annual Aquat. toxicity workshop: September 30-October 3, 1991, Ottawa, Ontario*, Niimi, A. J., Taylor, M. C. (Eds), Canadian technical report of Fisheries and Aquat. Sciences, 106-116.
- Kirby, G. M., Stalker, M. J., Gordon, S., Quinn, B. A., Van Schooten, F. J., Hayes, M. A. (1995). Influences of chronic cholangiohepatitis and cholestasis on hepatic metabolism of benzo[a]pyrene in white suckers (*Catostomus commersoni*) from industrially polluted areas of Lake Ontario. *Carcinogen.*, 16: 2923-2929.
- Kirchin, M. A., Wiseman, A., Livingstone, D. R. (1987). The partial purification of cytochrome P-450 from the digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis*. *Biochem. Soc. Trans.*, 15: 1100-1101.
- Kirchin, M. A., Moore, M. N., Dean, R. T., Winston, G. W. (1992). The role of oxyradicals in intracellular proteolysis and toxicity in mussels. *Mar. Environ. Res.*, 34: 315-320.



- Klaunig, J. E., Xu, Y., Isenberg, J. S., Bachowski, S., Kolaja, K. L., Jiang, J., Stevenson, D. E., Walborg, E. F. (1998). The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, 106: 289-295.
- Kuchino, Y., Mori, F., Kasai, H., Inoue, H., Iwai, S., Miura, K., Ohtsuka, E., Nishimura, S. (1987). Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature*, 327: 77-79.
- Kunkel, T. A., Shaaper, R. M., Loeb, L. A. (1983). Depurination-induced infidelity of deoxyribonucleic acid synthesis with purified deoxyribonucleic acid replication proteins *in vitro*. *Biochem.*, 22: 2378-2384.
- Kurelec, B., Chacko, M., Gupta, R. C. (1988). Postlabeling analysis of carcinogen-DNA adducts in mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.*, 24: 317-320.
- Kurelec, B., Garg, A., Krca, S., Gupta, R. C. (1990). DNA adducts in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* living in polluted and unpolluted environments. In: *Biomarkers of Environ. contamination*, McCarthy, J. F., Shugart, L. R. (Eds), CRC Press, Boca Raton, pp 217-227.
- Kurelec, B., Krca, S., Garg, A., Gupta, R. C. (1991). The potential of carp to bioactivate benzo[a]pyrene to metabolites that bind to DNA. *Cancer Lett.*, 57: 255-260.
- La, D. K., Swenberg, J. A. (1996). DNA adducts: biological markers of exposure and potential application to risk assessment. *Mutat. Res.*, 365: 129-146.
- Landahl, J. T., McCain, B. B., Myers, M. S., Rhodes, L. T., Brown, D. W. (1990). Consistent associations between hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) and polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment. *Environ. Health Perspect.*, 89: 195-203.
- Lane, D. P. (1992). P53, guardian of the genome. *Nature*, 358: 15-16.
- La Rocca, C., Conti, L., Crebelli, R., Crochi, B., Iacovella, N., Rodriguez, F., Turrio-Baldassarri, L., Di Domenico, A. (1996). PAH content and mutagenicity of marine sediments from the Venice lagoon. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 33: 236-245.
- Lawrence, C. W., Borden, A., Banerjee, S. K., LeClerc, J. E. (1990). Mutation frequency and spectrum resulting from a single abasic site in a single-stranded vector. *Nucl. Acids. Res.*, 18: 2153-2157.
- Laval, J., Jurado, J., Sapparbaev, M., Sidorkina, O. (1998). Antimutagenic role of base-excision repair enzymes upon free radical-induced DNA damage. *Mutat. Res.*, 402: 93-102.
- Lemaire, P., Livingstone, D. R. (1993). Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. *Tr. Comp. Biochem. Physiol.*, 1: 1119-1149.
- Lemaire, P., Sturve, J., Förlin, L., Livingstone, D. R. (1995). Studies on aromatic hydrocarbon

quinone metabolism and DT-diaphorase function in liver of fish species. *Mar. Environ. Res.*, 42: 317-321.

Lesko, S. A., Caspary, W. J., Lorentzen, R. J., Ts'o, P. O. P. (1975). Enzymic formation of 6-oxobenzo(a)pyrene radical in rat liver homogenates from carcinogenic benzo(a)pyrene. *Biochem.*, 14: 3978-3984.

Levine, A. J., Momand, J., Finlay, C. A. (1991). The 53p tumor suppressor gene. *Nature*, 351: 453-456.

Livingstone, D. R., Farrar, S. V. (1984). Tissue and subcellular distribution of enzyme activities of mixed-function oxygenase and benzo[a]pyrene metabolism in the common mussel *Mytilus edulis* L. *Sci. Tot. Environ.*, 39: 209-235.

Livingstone, D. R. (1988). Responses of microsomal NADPH-cytochrome c reductase activity and cytochrome P-450 in digestive glands of *Mytilus edulis* and *Littorina littorea* to environmental and experimental exposure to pollutants. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 46: 37-43.

Livingstone, D. R., Garcia Martinez, P., Winston, G. W. (1989a). Menadione-stimulated oxyradical formation in digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Aquat. Toxicol.*, 15: 213-236.

Livingstone, D. R., Kirchin, M. A., Wiseman, A. (1989b). Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in mollusks. *Xenobiotica*, 19: 1041-1062.

Livingstone, D. R., Garcia Martinez, P., Michel, X., Narbonne, J-F., O'Hara, S., Ribera, D., Winston, G. W. (1990). Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other mollusks. *Funct. Ecol.*, 4: 415-424.

Livingstone, D. R. (1991). Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In: *Advances in comparative and Environ. physiology*, Gilles, D. R. (Ed), Springer Verlag, Berlin, pp 45-185.

Livingstone, D. R., Pipe, R. K. (1992). Mussels and environmental contaminants: Molecular and cellular aspects. In: *The mussel, Mytilus edulis: Ecology, Physiology, Genetics and culture*, Grosling, E. (Ed), Elsevier, Amsterdam, pp 425-464.

Livingstone, D. R., Lemaire, P., Matthews, A., Peters, L. D., Porte, C., Fitzpatrick, P. J., Förlin, L., Nasci, C., Fossato, V., Wootton, N., Goldfarb, P. (1995). Assessment of the impact of organic pollutants on goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon, Italy: Biochemical studies. *Mar. Environ. Res.*, 39: 235-240.

Livingstone, D. R., Nasci, C., Solé, M., Da Ros, L., O'Hara, S. C. M., Peters, L. D., Fossato, V., Wootton, N., Goldfarb, P. S. (1997). Apparent induction of a cytochrome P450 with immunochemical similarities to CYP1A in digestive gland of the common mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) with exposure to 2,2',3,4,4',5',-hexachlorobiphenyl and arochlor 1254. *Aquat. Toxicol.*, 38: 205-224.

- Loechler, E. L. (1995). How are potent bulky carcinogens able to induce such a diverse array of mutations?. *Mol. Carcinogen.*, 13: 213-219.
- Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., Osborne, B. A., Jacks, T. (1993). P53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, 362: 847-849.
- MacCann, J., Choi, B., Yamasaki, F., Ames, B. N. (1975). Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 5135-5139.
- Maccubin, A. E. (1994). DNA adduct analysis in fish: laboratory and field studies. In: *Mol., Biochem. and Cellular Perspectives in Aquat. Toxicol.*, CRC Press, Boca Raton, pp 267-294.
- MacMahon, G., Huber, L. J., Moore, M. J., Stegeman, J. J., Wogan, G. N. (1990). Mutations in c-Ki-ras oncogenes in diseased livers of winter flounder from Boston harbor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 841-845.
- Malins, D. C., Haimanot, R. (1990). 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine, 8-hydroxyguanine and 8-hydroxyadenine in DNA from neoplastic liver of English sole exposed to carcinogens. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 173: 614-619.
- Mallet, W. G., Mosebrook, D. R., Trush, M. A. (1991). Activation of ( $\pm$ )-*trans*-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene to diolepoxides by human polymorphonuclear leukocytes on myeloperoxidase. *Carcinogen.*, 12: 521-524.
- Marsh, J. W., Chipman, J. K., Livingstone, D. R. (1992). Activation of xenobiotics to reactive and mutagenic products by the marine invertebrates *Mytilus edulis*, *Carcinus maenas* and *Asteria rubens*. *Aquat. Toxicol.*, 22: 115-128.
- Marsh, J. W., Chipman, J. K., Livingstone, D. R. (1993). Formation of DNA adducts following laboratory exposure of the mussel, *Mytilus edulis*, to xenobiotics. *Sci. Tot. Environ. Suppl.*, 567-572.
- Mass, M. J., Jeffers, A. J., Ross, J. A., Nelson, G., Galati, A. J., Stoner, G. D., Nesnow, S. (1993). Ki-ras oncogene mutations in tumors and DNA adducts formed by Benz[j]aceanthrylene and Benzo[a]pyrene in the lungs of strain A/J mice. *Mol. Carcinogen.*, 8: 186-192.
- Mauthe, R. J., Cook, V. M., Coffing, S. L., Baird, W. M. (1995). Exposure of mammalian cell cultures to benzo[a]pyrene and light results in oxidative DNA damage as measured by 8-hydroxydeoxyguanosine formation. *Carcinogen.*, 16: 133-137.
- Michel, X. R., Cassand, P. M., Ribera, D. G., Narbonne, J-F. (1992). Metabolism and mutagenic activation of benzo(a)pyrene by subcellular fractions from mussel (*Mytilus galloprovincialis*) digestive gland and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, 103C: 43-51.
- Michel, X. R., Suteau, P., Robertson, L. W., Narbonne, J-F. (1993). Effects of benzo(a)pyrene,

3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl on the xenobiotic-metabolizing enzymes in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Aquat. Toxicol.*, 27: 335-344.

Michel, X. R., Salaün, J-P., Galgani, F., Narbonne, J-F. (1994). Benzo[a]pyrene hydroxylase activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: a potential marker of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbon type compounds. *Mar. Environ. Res.*, 38: 257-273.

Michel, X. R., Beasse, C., Narbonne, J-F. (1995). *In vivo* metabolism of benzo(a)pyrene in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 28: 215-222.

Michel, X., Narbonne, J-F., Mora, P., Daubèze, M., Ribera, D., Lafaurie, M., Budzinski, H., Garrigues, P. (1998). Indicateurs biochimiques de pollution des écosystèmes côtiers: Expérience du groupe interface chimie-biologie des écosystèmes marins (GICBEM). In: *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J-C., Ramade, F. (Eds), Lavoisier TEC&DOC, Paris, pp 9-32.

Miller, E. C., Miller, J. A. (1981). Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer*, 47: 2327-2345.

Miller, J. A. (1970). Carcinogenesis by chemicals: An overview. G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.*, 30: 559-576

Mitchelmore, C. L., Chipman, J. K. (1998). DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.*, 399: 135-147.

Moore, M. N. (1988). Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferriprotein reductase in molluscan digestive gland cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 46: 37-43.

Morita, J., Ueda, K., Nakai, K., Baba, Y., Komano, T. (1983). DNA strand breakage *in vitro* by autoxidized unsaturated fatty acids. *Agric. Biol. Chem.*, 47: 2977-2979.

Murray, M., Reidy, R. (1990). Selectivity in the inhibition of mammalian cytochromes P450 by chemical agents. *Pharmacol. Rev.*, 42: 85-101.

Myers M. S., Stehr, C. M., Olson, O. P., Johnson, L. L., McCain, B. B., Chan, S-L., Varanasi, U. (1994). Relationship between toxicopathic hepatic lesions and exposure to chemical contaminants in English sole (*Pleuronectes vetulus*), starry flounder (*Platichthys stellatus*), and white croaker (*Genyonemus lineatus*) from selected marine sites on the Pacific coast, USA. *Environ. Health Perspect.*, 102: 200-214.

Nacci, D., Nelson, S., Nelson, W., Jackim, E. (1992). Application of the DNA unwinding assay to detect DNA strand breaks in marine bivalves. *Mar. Environ. Res.*, 33: 83-100.

Nagata, C., Kodama, M., Ioki, Y. (1978). Electron-spin resonance study of the binding of the 6-oxybenzo[a]pyrene radical and benzo[a]pyrene-semiquinone radicals with DNA and polynucleotides. In: *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, Gelboin, H. V., TS'O, P. O. P. (Eds),

*Academic Press, New-York*, pp 247-260.

Nakamura, M., Hayashi, T. (1994). One- and two-electron reduction of quinones by rat liver subcellular fractions. *J. Biochem.*, 115: 1141-1147.

Narbonne, J-F., Garrigues, P., Ribera, D., Raoux, C., Mathieu, A., Lemaire, P., Salaün, J-P., Lafaurie, M. (1991). Mixed-function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring: Field studies on the French coast of the Mediterranean Sea. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C: 37-42.

Narbonne, J-F., Ribera, D., Garrigues, P., Lafaurie, M., Romana, A. (1992). Different pathways for the uptake of benzo(a)pyrene adsorbed to sediment by the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 49: 150-156.

Nasci, C., Campesan, V. U., Fossato, F., Dolci, F., Menetto, A. (1989). Hydrocarbon content and microsomal BPH and reductase activity in mussel, *Mytilus sp.*, from the Venice area, North-East Italy. *Mar. Environ. Res.*, 28: 109-112.

Nasci, C., Campesan, G., Fossato, V. U., Tallandini, L., Turchetto, M. (1991). Induction of cytochrome P-450 and mixed function oxygenase activity by low concentrations of polychlorinated biphenyls in marine fish *Zosterisessor ophiocephalus*. *Aquat. Toxicol.*, 19: 281-290.

Nasci, C., Da Ros, L., Campesan, G., Fossato, V. U. (1998). Assessment of the impact of chemical pollutants on mussel *Mytilus galloprovincialis*, from the Venice Lagoon, Italy. *Mar. Environ. Res.*, 46: 279-282.

Neff, J. M. (1984). Bioaccumulation of organic micropollutants from sediments and suspended particulates by aquatic animals. *Fr. Z. Anal. Chem.*, 319: 132-136.

Newcomb, T. G., Loeb, L. A. (1995). Oxidative DNA damage and mutagenesis. In: *DNA damage and repair, DNA repair in prokaryotes and lower eukaryotes*, Nickoloff, J. A., Hoekstra, M. F. (Eds), Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp 65-84.

Nigro, J. M., Baker, S. J., Preisinger, A. C., Milburn Jessup, J., Hostetter, R., Clearly, K., Bigner, S. H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., Glover, T., Collins, F. S., Weston, A., Modali, R., Harris, C. C., Vogelstein, B. (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature*, 342: 705-708.

Nishimoto, M., Yanagida, G. K., Stein, J. E., Baird, W. M., Varanasi, U. (1992). The metabolism of benzo[a]pyrene by English sole (*Parophrys vetulus*): comparison between isolated hepatocytes *in vitro* and liver *in vivo*. *Xenobiotica*, 22: 949-961.

Okuda, H., Nojima, H., Miwa, K., Watanabe, N., Watabe, T. (1989). Selective covalent binding of the active sulfate ester of the carcinogen 5-(hydroxymethyl)chrysene to the adenine residue of calf thymus DNA. *Chem. Res. Toxicol.*, 2: 15-22.

Olinski, R., Zastawny, T., Budzbon, J., Skokowski, J., Zegazrski, W., Dizdaroglu, M. (1992).

DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues. *FEBS Lett.*, 309: 193-198.

Ortiz de Montellano, P. R. (1986). Oxygen activation and transfer. In: *Cytochrome P-450. Structure, mechanism and bioChem.*, Ortiz de Montellano, P. R. (Ed), Plenum Press, New-York, pp 217-271.

Ostapczuk, P., Schladot, J. D., Emons, H., Oxyinos, K., Schramm, K-W., Grimmer, G., Jacob, J. (1997). Environmental monitoring and banking of marine pollutants by using common mussels. *Chemosphere.*, 34: 2143-2151.

Paige, C. E., Kennish, J. M., Forlin, L., Andersson, T. (1995). Cytochrome P4501A1 induction in Kenai River sculpin (*Cottus spp.*) as a monitor of freshwater pollution effects. Responses of marine organisms to pollutants (PRIMO 7). *Mar. Environ. Res.*, 39: 225-229.

Palmer, C. M., Serafini, D. M., Schellhorn, H. E. (1997). Near ultraviolet radiation (UVA and UVB) causes a formamidopyrimidine glycosylase-dependent increase in G to T transversions. *Photochem. Photobiol.*, 65: 543-549.

Pelmont, J. (1995). Enzymes. Catalyseurs du monde vivant. *Presses universitaires de Grenoble*.

Penning, T. M. (1993). Dihydrodiol dehydrogenase and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism. *Chem.-Biol. Interact.*, 89: 1-34.

Penry, D. L., Weston, D. P. (1998). Digestive determinants of benzo[a]pyrene and phenanthrene bioaccumulation by a deposit-feeding polychaete. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 2254-2265.

Peters, L. D., Nasci, C., Livingstone, D. R. (1998). Variation in levels of cytochrome P4501A, 2B, 2E, 3A and 4A-immunopositive proteins in digestive gland of indigenous and transplanted mussel *Mytilus galloprovincialis* in Venice Lagoon, Italy. *Mar. Environ. Res.*, 46: 295-299.

Pfau, W. (1997). DNA adducts in marine and freshwater fish as biomarkers of environmental contamination. *Biomarkers*, 2: 145-151.

Pflaum, M., Will, O., Epe, B. (1997). Determination of steady state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogen.*, 18: 2225-2231.

Phillips, D. H. (1983). Fifty years of benzo(a)pyrene. *Nature*, 303: 468-472.

Piechotta, G., Lacorn, M., Lang, T., Kammann, U., Simat, T., Jenke, H. S., Steinart, H. (1999). Apoptosis in dab (*Limanda limanda*) as possible new biomarker for anthropogenic stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 42: 50-56.

Pitot, H. C. (1990). Mechanisms of chemical carcinogenesis: Theoretical and experimental bases. In: *Chem. Carcinogen. and mutagenesis, Handbook of experimental pharmacology*, Cooper, C. S., Growler, P. L. (Eds), Springer-Verlag, London, vol 94/I, pp 2-29.

- Ploch, S. A., King, L. C., Kohan, M. J., Di Giulio, R. T. (1998). Comparative *in vitro* and *in vivo* benzo[a]pyrene-DNA adduct formation and its relationship to CYP1A activity in two species of Ictalurid catfish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 149: 90-98.
- Porte, C., Lemaire, P., Peters, L. D., Livingstone, D. R. (1995). Partial purification and properties of cytochrome P450 from digestive gland microsomes of the common mussel *Mytilus sp.* *Mar. Environ. Res.*, 39: 21-26.
- Potter, D., Clarius, T. M., Wright, A. S., Watson, W. P. (1994). Molecular dosimetry of DNA adducts in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to benzo(a)pyrene by different routes. *Arch. Toxicol.*, 69: 1-7.
- Puisieux, A., Lim, S., Groopman, J., Ozturk, M. (1991). Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens. *Cancer Res.*, 51: 6185-6189.
- Quan, T., States, J. C. (1996). Preferential DNA damage in the p53 gene by benzo[a]pyrene metabolites in cytochrome P4501A1-expressing xeroderma pigmentosum group A cells. *Mol. Carcinogen.*, 16: 32-43.
- Ramakrishna, N. V. S., Gao, F., Padmavathi, N. S., Cavalieri, E. L., Rogan, E. G., Cerny, R. L., Gross, M. L. (1992). Model adducts of Benzo[a]pyrene and nucleosides formed from its radical cation and diol epoxide. *Chem. Res. Toxicol.*, 5: 293-302.
- Ramana, C. V., Boldogh, I., Izumi, T., Mitra, S. (1998). Activation of apurinic/ apyrimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 5061-5066.
- Ramotar, D., Popoff, S. C., Gralla, E. B., Demple, B. (1991). Cellular role of yeast Apn 1 apurinic endonuclease/3'-diesterase: repair of oxidative and alkylation DNA damage and control of spontaneous mutation. *Mol. Cell. Biol.*, 11: 4537-4544
- Ravanat, J-L., Cadet, J. (1995). Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterization of the main oxidation products. *Chem. Res. Toxicol.*, 8: 379-388.
- Ravanat, J-L., Douki, T., Turesky, R., Cadet, J. (1997). Measurement of oxidized bases in DNA. Comparison between HPLC-EC and GC-MS assays. *J. Chim. Phys.*, 94: 306-312.
- Razin, A., Cedar, H. (1991). DNA methylation and gene expression. *Microbiol. Rev.*, 55: 451-458.
- Regoli, F. (1998). Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 34: 48-63.
- Reichert, W. L., French, B. L., Stein, J. E., Varanasi, U. (1991). 32P-postlabeling analysis of the persistence of bulky hydrophobic xenobiotic DNA adducts in liver of English sole (*Parophrys vetulus*), a marine fish. *Proc. Amer. Ass. Res.*, 32: 87.

Reynolds, S. H., Anderson, M. W. (1991). Activation of proto-oncogenes in human and mouse lung tumors. *Environ. Health Perspect.*, 93: 145-148.

Ribera, D., Narbonne, J-F., Daubèze, M., Michel, X. (1989). Characterization, tissue distribution, sexual differences of some parameters related to lipid peroxidation in mussels. *Mar. Environ. Res.*, 28: 279-283.

Ribera, D., Narbonne, J-F., Michel, X., Livingstone, D. R., O'Hara, S. (1991). Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C: 177-181.

Rice-Evans, C., Burdon, R. (1993). Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid Res.*, 32: 71-110.

RNO (1995). Le RNO: Surveillance du milieu marin. Edition 95. *IFREMER et Ministère de l'Environnement*, p32.

Roberfroid, M., Buc Calderon, P. (1995). *Free radicals and oxidation phenomena in biological systems*, Roberfroid, M., Buc Calderon, P. (Eds), Marcel Dekker Inc., New York, pp 91-141.

Rodriguez, H., Loechler, E. L. (1993a). Mutagenesis by the (+)-anti-diol epoxide of benzo(a)pyrene : What control mutagenic specificity ?. *Biochem.*, 32: 1759-1769.

Rodriguez, R., Loechler, E. L. (1993b). Mutational specificity of (+)-anti-diol epoxide of benzo(a)pyrene in a sup F gene of an *Escherichia coli* plasmid: DNA sequence context influences hotspots, mutagenic specificity and mutagenesis. *Carcinogen.*, 14: 373-383.

Rogan, E. G., Roth, R. W., Katomski-Beck, P. A., Laubscher, J. R., Cavalieri, E. L. (1980). Non-enzymatic ATP mediated binding of hydroxymethyl derivatives of aromatic hydrocarbons to DNA. *Chem.-Biol. Interact.*, 31: 51-63.

Rogan, E. G., Hakam, A., Cavalieri, E. L. (1983). Structure elucidation of a 6-methylbenzo[a]pyrene-DNA adduct formed by horseradish peroxidase *in vitro* and mouse skin *in vivo*. *Chem.-Biol. Interact.*, 47: 111-122.

Rogan, E., Cavalieri, E., Tibbels, S., Cremonesi, P., Warner, C., Nagel, D., Tomer, K., Cerny, R. Gross, M. (1988). Synthesis and identification of benzo[a]pyrene-guanine nucleoside adducts formed by electrochemical oxidation and by horseradish peroxidase catalyzed reaction of benzo[a]pyrene with DNA. *J. Amer. Chem. Soc.*, 110: 4023-4029.

Rogan, E. G., Devanesan, P. D., Ramakrishna, N. V. S., Higginbotham, S., Padmavathi, N. S., Chapman, K., Cavalieri, E. L., Jeong, H., Jankowiak, R., Small, G. J. (1993). Identification and quantitation of benzo(a)pyrene-DNA adducts formed in mouse skin. *Chem. Res. Toxicol.*, 6: 356-363.

Ross, J. A., Nelson, G. B., Zampieron, C., Venier, P. (1999). Benzo[a]pyrene-DNA adducts in



*Mytilus galloprovincialis* result from K-region oxidation. Présentation orale lors du 17<sup>ième</sup> Congrès de l'ISPAC, Bordeaux 25-29 octobre, France.

Sagher, E., Strauss, B. (1983). Insertion of nucleotides opposite apurinic/aprimidinic sites in desoxyribonucleic acids during *in vitro* synthesis: uniqueness of adenine nucleotides. *Biochem.*, 22: 4518-4526.

Sakai, M., Yoshida, D., Mizusaki, S. (1985). Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and quinones on *Salmonella typhimurium* TA 97. *Mutat. Res.*, 156: 61-67.

Salazar, J. J., Van Houten, B. (1997). Preferential mitochondrial DNA injury caused by glucose oxidase as a steady generator of hydrogen peroxide in human fibroblasts. *Mutat. Res.*, 385: 139-149.

Sarasin, A. (1982). La biologie du cancer. In: *La Recherche sur le cancer, Editions du Seuil, La Recherche, Paris, France*, pp 69-103.

Schnitz, A. R., O'Connor, J. M. (1992). *In vivo* DNA/RNA adduction of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) and benzo(a)pyrene (BaP) in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 11: 229-233.

Shaaper, R. M., Kunkel, T. A., Loeb, L. A. (1983). Infidelity of DNA synthesis associated with bypass of apurinic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 487-491.

Shaw, G. R., Connell, D. W. (1994). Prediction and monitoring of the carcinogenicity of Polycyclic Aromatic Compounds (PACs). In: *Reviews of Environ. Contamination and Toxicol.*, Ware, G. W., (Ed), Springer-Verlag, New-York, pp1-62.

Sheehan, D., MacIntosh, J., Power, A., Fitzpatrick, P. J. (1995). Drug metabolizing enzymes of mussels as bioindicators of chemical pollution. *Biochem. Soc. Trans.*, 23: 419-422.

Shigenaga, M. K., Ames, B. N. (1991). Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of *in vivo* oxidative DNA damage. *Free Radical Biol. Med.*, 10: 211-216.

Shou, M., Harvey, R. G., Penning, T. M. (1993). Reactivity of benzo[a]pyrene-7,8-dione with DNA. Evidence for the formation of desoxyguanosine adducts. *Carcinogen.*, 14: 475-482.

Shugart, L. R. (1988). Quantitation of chemically induced damage to DNA of aquatic organisms by alkaline unwinding assay. *Aquat. Toxicol.*, 13: 43-52.

Shukla, R., Geacintov, N. F., Loechler, F. L. (1999). The major, N2-dG adduct of (+)-anti-B[a]PDE induces G → A mutations in a 5'-AGA-3' sequence context. *Carcinogen.*, 20: 261-268.

Sikka, H. C., Rutkowski, J. P., Kandaswami, C., Kumar, S., Earley, K., Gupta, R. C. (1990). Formation and persistence of DNA adducts in the liver of brown bullheads exposed to benzo[a]pyrene. *Cancer Lett.*, 49: 81-87.

Sikka, H. C., Steward, A. R., Kandaswami, C., Rutkowski, J. P., Zaleski, J., Earley, K., Gupta, R. C. (1991). Metabolism of benzo[a]pyrene and persistence of DNA adducts in the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C: 25-28.

Sims, P., Grover, P. L., Swaisland, A., Pal, K., Hewer, A. (1974). Metabolic activation of Benzo(a)pyrene proceeds by a diol epoxide. *Nature*, 252: 326-328.

Sjölin, A. M., Livingstone, D. R. (1997). Redox cycling of aromatic hydrocarbon quinones catalyzed by digestive gland microsomes of the common mussel (*Mytilus edulis L.*). *Aquat. Toxicol.*, 38: 83-99.

Smithgall, T. E., Harvey, R. G., Penning, T. M. (1986). Regio- and stereospecificity of homogeneous 3 $\alpha$ -hydroxysteroid-dihydrodiol dehydrogenase for *trans*-dihydrodiol metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Biol. Chem.*, 261: 6184-6191.

Smithgall, T. E., Harvey, R. G., Penning, T. M. (1988). Oxidation of the *trans*-3,4-dihydrodiol metabolites of the potent carcinogen, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and other benz[a]anthracene derivatives by 3 $\alpha$ -hydroxysteroid-dihydrodiol dehydrogenase: effects of methyl substitution on velocity and stereochemical course of *trans*-dihydrodiol oxidation. *Cancer Res.*, 48: 1227-1232.

Smolowitz, R. M., Schultz, M. E., Stegeman, J. J. (1992). Cytochrome P4501A induction in tissues, including olfactory epithelium, of topminnows (*Poeciliopsis spp.*) by waterborne benzo[a]pyrene. *Carcinogen.*, 13: 2395-2402.

Solé, M., Porte, C., Albaigès, J. (1994). Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: its relation with contaminant body burdens. *Aquat. Toxicol.*, 30: 271-283.

Solé, M., Porte, C., Biosca, X., Mitchelmore, C. L., Chipman, J. K., Livingstone, D. R., Albaigés, J. (1996). Effects of the 'Aegean Sea' oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis L.*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 113C: 257-265.

Solé, M., Peters, L. D., Magnusson, K., Sjölin, A., Granmo, A., Livingstone, D. R. (1998). Responses of the cytochrome P450-dependent monooxygenase and other protective enzyme systems in digestive gland of transplanted common mussel (*Mytilus edulis L.*) to organic contaminants in the Skagerrak and Kattegat (North Sea). *Biomarkers*, 3: 49-62.

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.

- Stansbury, K. H., Flesher, J. W., Gupta, R. C. (1994). Mechanism of aralkyl-DNA adduct formation from Benzo[a]pyrene *in vivo*. *Chem. Res. Toxicol.*, 7: 254-259.
- Stavric, B., Klassen, R. (1994). Dietary effects on the uptake of benzo[a]pyrene. *Fd. Chem. Toxicol.*, 32: 727-734.
- Stegeman, J. J. (1985). Benzo(a)pyrene oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel (*Mytilus edulis*) and other bivalve mollusk species from the Western North Atlantic. *Mar. Biol.*, 89: 21-30.
- Stegeman, J. J. (1989). Cytochrome P450 forms in fish: catalytic, immunological and sequence similarities. *Xenobiotica*, 19: 1093-1110.
- Stegeman, J. J., Woodin, B. R., Smolowitz, R. M. (1990). Structure, function and regulation of cytochrome P-450 forms in fish. *Biochem. Soc. Trans.*, 18 : 19-21.
- Stegeman, J. J., Lech, J. J. (1991). Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environ. Health Perspect.*, 90: 101-109.
- Stein, J. E., Reichert, W. L., Nishimoto, M., Varanasi, U. (1989). 32P-postlabeling of DNA: a sensitive method for assessing environmentally induced genotoxicity. *Ocean's 89 Proc.*, 385-390.
- Stein, J. E., Reichert, W. L., French, B., Varanasi, U. (1993). 32P-postlabeling of DNA adduct formation and persistence in English sole exposed to benzo[a]pyrene and 7H-dibenzo[c, g]carbazole. *Chem.- Biol. Interact.*, 88: 55-69.
- Stein, J. E., Reichert, W. L., Varanasi, U. (1994). Molecular epizootiology: assessment of exposure to genotoxic compounds in teleosts. *Environ. Health Perspect.*, 102: 19-23.
- Steinert, S. A., Streib-Montee, R., Leather, J. M., Chadwick, D. B. (1998). DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutat. Res.*, 399: 65-85.
- Stern, S. J., Degawa, M., Martin, M. V., Guengerich, F. P., Kaderlik, R. K., Ilett, K. F., Breau, R., McGhee, M., Montague, D., Lyn-Cook, B. et al. (1993). Metabolic activation, DNA adducts, and H-ras mutations in human neoplastic and non-neoplastic laryngeal tissue. *J. Cell. Biochem. Suppl.*, 17F: 129-137.
- Stowers, S. J., Anderson, M. W. (1985). Formation and persistence of Benzo(a)pyrene metabolite-DNA adducts. *Environ. Health Perspect.*, 62: 31-39.
- Strandberg, B., Bendh, C., Van Blowel, B., Bergquist, P. A., Broman, D., Näf, C., Pettersen, H., Rappa, C. (1998). Concentrations, biomagnification and spatial variation of organochlorine compounds in a pelagic food web in the Northern part of the Baltic Sea. *Sci. Tot. Environ.*, 217: 143-154.

Suhr, Y-J., Liem, A., Miller, E. C., Miller, J. A. (1989). Metabolic activation of the carcinogen 6-hydroxymethylbenzo[a]pyrene: formation of an electrophilic sulfuric acid ester and benzylic DNA adducts in rat liver *in vivo* et in reactions *in vitro*. *Carcinogen.*, 10: 1519-1528.

Suteau, P. M., Narbonne, J-F. (1988). Preliminary data on PAH metabolism in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* from Arcachon Bay, France. *Mar. Biol.*, 98: 421-425.

Suteau, P., Daubèze, M., Migaud, M. L., Narbonne, J-F (1988). PAH metabolizing enzyme in whole mussels as biochemical tests for chemical pollution monitoring. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 46: 45-49.

Takker, D. R., Yagi, H., Akagi, H., Koreeda, M., Lu, A. Y. H., Levin, W., Wood, A., Conney, A. H., Jerina, D. M. (1977). Metabolism of benzo[a]pyrene VI stereoselective metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol to diol-epoxides. *Chem.-Biol. Interact.*, 16: 281-300.

Terzaghi, C., Buffagni, M., Cantelli, D., Bonfanti, P., Camatini, M. (1998). Physical-chemical and ecotoxicological evaluation of water based drilling fluids used in Italian off-shore. *Chemosphere*, 37: 2859-2871.

Todorovic, R., Ariese, F., Devanesan, P., Jankowiak, R., Small, G. J., Rogan, E., Cavalieri, E. (1997). Determination of Benzo[a]pyrene- and 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-DNA adducts formed in rat mammary glands. *Chem. Res. Toxicol.*, 10: 941-947.

Touati, D. (1989). The molecular genetics of superoxide dismutase in *E. coli*. An approach to understanding the biological role and regulation of SODs in relation to other elements of the defence system against oxygen toxicity. *Free Rad. Res. Comm.*, 8: 1-9.

Canestri Trotti, G, Baccarani, E. M., Giannetto, S., Giuffrida, A., Paesanti, F. (1998). Prevalence of *Mytilicola intestinalis* (Copepoda: Mytilicolidae) and *Urastoma cyprinae* (Turbellaria: Hypotrichinidae) in marketable mussels *Mytilus galloprovincialis* in Italy. *Dis. Aquat. Org.*, 32: 145-149.

UNEP (1990). GESAMP, The status of the marine environment. UNEP Regional Seas. In: *Report and studies N°115, United Nations Environmental Program, Paris.*

Van der Oost, R., Heida, H., Stegeman, J. J., Moore, M. N., Hahn, M. E. (1993). Bioaccumulation of organic micropollutants in different aquatic organisms: Sublethal toxic effects on fish. Responses of marine organisms to pollutants, part 2. *Mar. Environ. Res.*, 35: 202.

Van der Oost, R., Van Schooten, F-J., Ariese, F., Heida, H., Satumalay, K., Vermeulen, N. P. E. (1994). Bioaccumulation, biotransformation and DNA binding of PAHs in feral eel (*Anguilla anguilla*) exposed to polluted sediments: a field survey. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 859-870.

Varanasi, U., Nishimoto, M., Reichert, W. L., Le Eberhart, B-T. J. (1986). Comparative metabolism of benzo[a]pyrene and covalent binding to hepatic DNA in English sole, starry flounder and rat. *Cancer Res.*, 46: 3817-3824.

- Varanasi, U., Reichert, W. L., Le Eberhart, B-T., Stein, J. E. (1989a). Formation and persistence of Benzo[a]pyrene-diolepoxide-DNA adducts in liver of English sole (*Parophrys vetulus*). *Chem.-Biol. Interact.*, 69: 203-216.
- Varanasi, U., Reichert, W. L., Stein, J. E. (1989b). 32P-postlabeling analysis of DNA adducts in liver of wild English sole (*Parophrys vetulus*) and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Cancer Res.*, 49: 1171-1177.
- Venier, P., Canova, S. (1996). Formation of DNA adducts in the gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* treated with benzo[a]pyrene. *Aquat. Toxicol.*, 34: 119-133.
- Venier, P., Canova, S., Levis, A. G. (1996). DNA adducts in *Mytilus galloprovincialis* and *Zosterisessor ophiocephalus* collected from PAC-polluted and reference sites of the Venice Lagoon. *Poly. Arom. Comp.*, 11: 67-73.
- Viarengo, A., Canesi, L. (1991). Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture*, 94: 225-243.
- Walton, D. G., Acton, A. B., Stich, H. F. (1984). DNA repair synthesis following exposure to chemical mutagens in primary liver, stomach, and intestinal cells isolated from rainbow trout. *Cancer Res.*, 44: 1120-1121.
- Wang, D., Kreutzer, D. A., Essigmann, J. M. (1998). Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutat. Res.*, 400: 99-115.
- Wang, Y-J., Ho, Y-S., Lo, M-J., Lin, J-K. (1995). Oxidative modification of DNA bases in rat liver and lung during chemical carcinogenesis and aging. *Chem.-Biol. Interact.*, 94: 135-145.
- Watson, D. E., Reichert, W. L., Di Giulio, R. T. (1998). Induction of hepatic CYP1A in channel catfish increases binding of 2-aminoanthracene to DNA *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogen.*, 19: 1495-1501.
- Weinstein, I. B. (1987). Growth factors, oncogenes, and multistages carcinogenesis. *J. Cell. Biochem.*, 33: 213-224.
- Weitzman, S. A., Weitberg, A. B., Clark, E. P., Stossel, T. P. (1985). Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. *Science*, 227: 1231-1233.
- Weitzman, S. A., Turk, P. W., Howard-Milkowski, D., Kozlowski, K. (1994). Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 1261-1264.
- Wilson, J. T., Pascoe, P. L., Parry, J. M., Dixon, D. R. (1998). Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca : Pelecypode). *Mutat. Res.*, 399: 87-95.
- Wiseman, H., Kaur, H., Halliwell, B. (1995). DNA damage and cancer: measurement and

mechanism. *Cancer Lett.*, 93: 113-120.

Wirgin, I., Currie, D., Garte, S. J. (1989). Activation of the K-ras oncogene in liver tumors of Hudson river tomcod. *Carcinogen.*, 10: 2311-2315.

Wolterbeek, A. P. M., Roggeband, R., Baan, R. A., Feron, V. J., Rutten, A. A. J. J. L. (1995). Relation between benzo[a]pyrene-DNA adducts, cell proliferation and p53 expression in tracheal epithelium of hamsters fed a high beta-carotene diet. *Carcinogen.*, 16: 1617-1622.

Wootton, A. N., Herring, C., Spry, J. A., Wiseman, A., Livingstone, D. R., Goldfarb, P. S. (1995). Evidence for the existence of cytochrome P450 gene families (CYP1A, 3A, 4A, 11A) and modulation of gene expression (CYP1A) in the mussel *Mytilus sp.* *Mar. Environ. Res.*, 39: 21-26.

Wootton, A. N., Goldfarb, P. S., Lemaire, P., O'Hara, S. C. M., Livingstone, D. R. (1996). Characterization of the presence and seasonal variation of a CYP1A-like enzyme in digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.*, 42: 297-301.

Yang, L. L., Maher, V. M., McCormick, J. J. (1982). Relationship between excision repair and the cytotoxic and mutagenic effect of the 'anti' 7,8-diol-9,10-epoxide of benzo[a]pyrene in human cells. *Mutat. Res.*, 94: 435-447.

Yevich, P. P., Yevich, C., Pesch, G. (1987). Effects of Black Rock Harbor dredged material on the histopathology of the blue mussel *Mytilus edulis* and polychaete worm *Nephtys incisa* after laboratory and field exposures. *U.S. EPA technical report, D-87-8, Narragansett, RI.*

Yisraeli, J., Szyf, M. (1984). Gene methylation patterns and expression. In : *DNA methylation: biochemistry and biological significance*, Razin, A., Cedar, H., Riggs, A. D. (Eds), Springer Verlag, New York, pp 358-378.

Yu, T-W., Anderson, D. (1997). Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. *Mutat. Res.*, 379: 201-210.

Zhou, W., Doetsch, P. W. (1993). Effects of abasic sites and DNA single-strand breaks on prokaryotic RNA polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90: 6601-6605.

## **ANNEXES**





## ANNEXE I

### LATECHNIQUE DE POST-MARQUAGE AU P<sup>32</sup>

L'utilisation de molécules de cancérogènes radiomarquées a permis l'étude *in vitro* et *in vivo* des interactions entre les cancérogènes chimiques et les macromolécules cellulaires. Parmi les interactions constatées, la fixation par liaison covalente de certains composés chimiques à l'ADN a été particulièrement étudiée. La formation de ces ajouts ou encore adduits à l'ADN a en effet été proposée comme l'événement crucial de l'initiation de la cancérogenèse chimique (Miller et Miller, 1981).

Cette approche méthodologique ne permettait néanmoins l'étude de la formation d'adduits à l'ADN que pour les composés chimiques pour lesquels une forme isotopique radiomarquée était disponible dans le commerce. Cette dernière condition ne regroupant qu'une partie infime des mutagènes et des cancérogènes chimiques de l'environnement, il était indispensable de développer des méthodes de mesure alternatives. Parmi elles, le dosage immunochimique des adduits à l'ADN devait permettre d'étendre les études à d'autres composés. Néanmoins, le développement d'anticorps spécifiques étant onéreux et difficile de part la nécessité préalable d'isoler l'adduit, cette approche ne pouvait également répondre à la complexité des contaminants présents dans l'environnement (Gupta, 1996). Malgré le développement parallèle de méthodes de détection des adduits à l'ADN très sensibles, ce n'est seulement qu'avec l'avènement de la technique de post-marquage au <sup>32</sup>P que l'étude de la formation et de la signification biologique des adduits à l'ADN est devenu accessible pour un grand nombre de composés (Gupta et al, 1982, Beach et Gupta, 1992, Reddy, 1993).

En raison de son ultrasensibilité et de sa non spécificité, cette technique a été très appliquée en épidémiologie humaine et en biosurveillance de l'environnement. Elle est considérée aujourd'hui comme la méthode de référence de la mesure qualitative et semi-quantitative du niveaux d'adduits formés par les génotoxines de l'environnement. Initialement développée pour le séquençage et la détermination de la composition des acides nucléiques en bases et en 5-méthylcytosine (Reddy et al, 1981), cette technique présente de nombreux avantages (Gupta, 1996):

- c'est la méthode de détection des adduits à l'ADN la plus sensible. Nous verrons par la suite que l'amélioration de cette technique de dosage a parmi d'en descendre la sensibilité à 1 adduit/10<sup>10</sup> nucléotides.
- elle nécessite de faible quantité d'ADN rendant ainsi son application possible aux dosages d'échantillons obtenues par biopsie. C'est donc une technique qui peut être utilisée pour la réalisation de mesures non destructives.
- Ne nécessitant aucune connaissance préalable des génotoxines impliquées dans la formation des adduits mesurés, cette technique peut être utilisée pour l'étude des effets liés à l'exposition à des cancérogènes non identifiés de l'environnement.
- Elle peut détecter les adduits de différents composés collectivement rencontrés dans les mixtures de polluants auxquels les organismes peuvent être exposés.

Malgré ses différents attraits, cette technique présente néanmoins un inconvénient majeur puisqu'aucune information sur l'identité des adduits mesurés ne peut être obtenue par cette technique en l'absence d'adduits standards. Seul un nombre très restreint de composés ont fait l'objet d'une caractérisation des adduits formés. Pour chacun d'entre eux, la disponibilité

d'adduits standards reste encore le plus souvent limitée aux seuls laboratoires qui en entreprennent la synthèse.

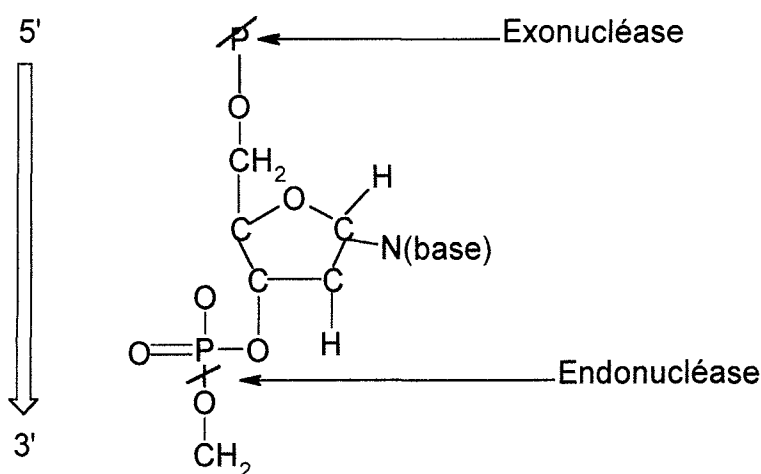
### I. Principe de la méthode de post-marquage au $^{32}\text{P}$ :

Initialement, la méthode de post-marquage au  $^{32}\text{P}$  était constituée de 5 étapes (Figure 1).

#### Première étape :

Après isolation de l'ADN celui-ci est digéré en déoxyribonucléosides 3'-monophosphate sous l'action combinée de deux enzymes:

- la phosphodiesterase de rate (endonucléase) coupe les liaisons internucléotidiques 5' → 3' phosphodiesters
- la nucléase de Staphylocoque (exonucléase) coupe les liaisons phosphates par leur extrémité 5'



Cette double digestion résulte en la libération de nucléosides normaux (Np, N= A, G, T, C ou  $m^5\text{C}$ ) et éventuellement de nucléosides porteurs d'adduits (Xp, Yp) lorsque l'organisme a été exposé à un composé génotoxique.

#### Deuxième étape :

Les 3'-phosphodéoxyribonucléosides ainsi obtenus sont marqués en position 5' par l'incorporation d'un  $^{32}\text{P}$  par la polynucléotide kinase du phage T4 en présence de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ . Il en résulte des 3', 5'-diphosphodéoxyribonucleotides normaux ( $^*\text{pNp}$ ) et porteurs d'adduits ( $^*\text{pXp}$ ,  $^*\text{pYp}$ ). A l'issue du marquage, le  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  en excès est éliminé par traitement à l'apyrase de pomme de terre.

#### Troisième étape :

Les nucléotides normaux sont séparés des nucléotides modifiés par chromatographie échangeuse d'ions sur couche mince de polyéthylèneimine-cellulose. Les adduits étant hydrophobes, les nucléotides normaux (hydrophiles) sont séparés par migration bidimensionnelle (D1, D2) dans des solvants aqueux (Figure 2). La migration se fait hors de

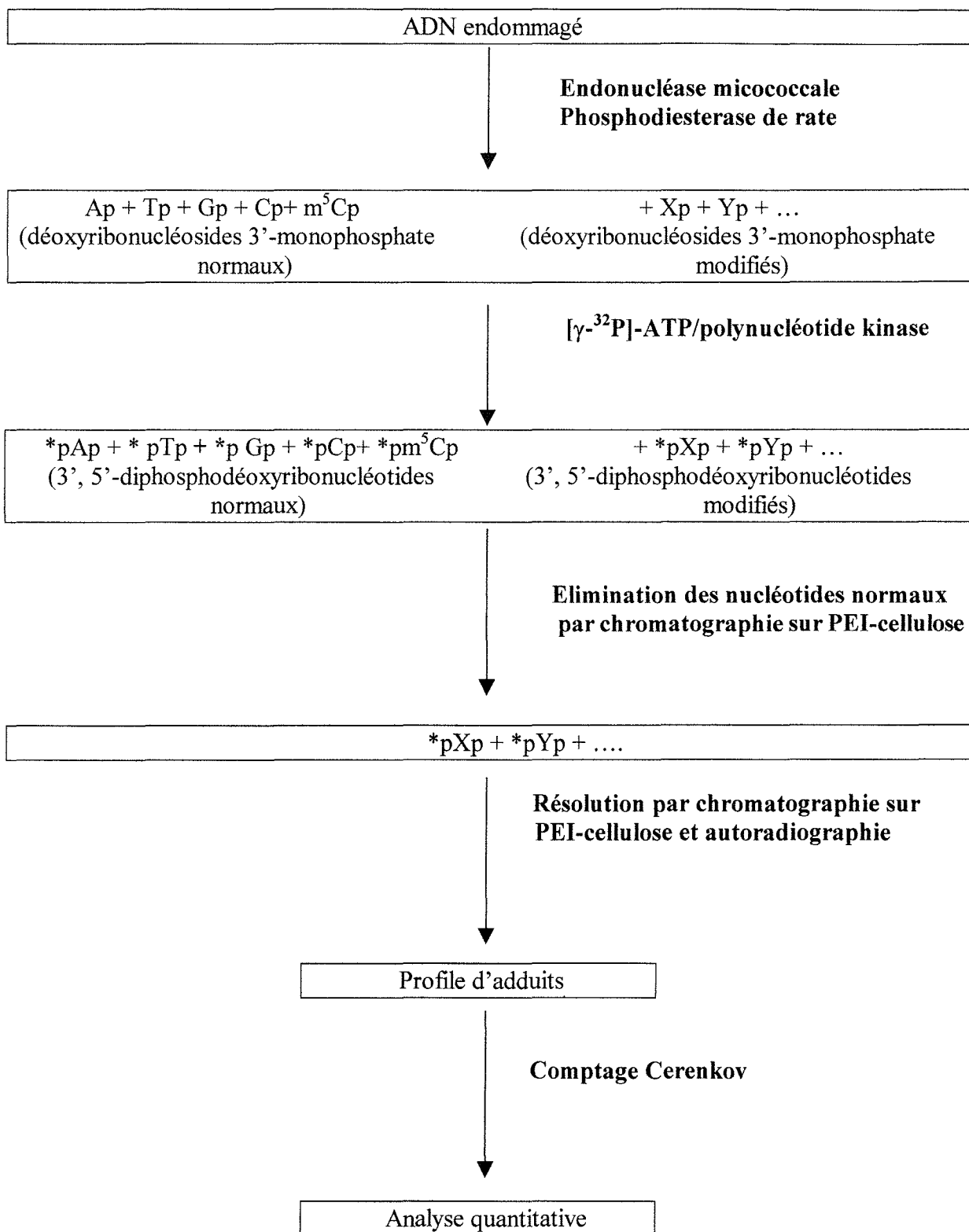


Figure 1: Les différentes étapes initialement proposées de la technique de post-marquage au <sup>32</sup>P

la plaque de PEI-cellulose, sur du papier Whatman agrafé à cet effet. Cette migration en deux dimensions permet également l'élimination des résidus de  $^{32}\text{P}$ i.  
Les nucléotides modifiés restent concentrés dans la zone de dépôt lors des migrations D1 et D2. Leur résolution est par la suite obtenue par migration bidimensionnelle (D3, D4) dans des solutions concentrées en urée.

#### Quatrième étape :

Après résolution, les adduits sont détectés par autoradiographie et une analyse qualitative du profil des adduits obtenus est effectuée.

#### Cinquième étape :

L'analyse semi-quantitative de la radioactivité associée à chaque spot est effectuée par spectrométrie à scintillation en mode Cerenkov. Les niveaux d'adduits obtenus sont exprimés en RAL (Relative adduct Labeling).

Alors que cette technique initiale présentait une sensibilité de l'ordre de  $10^6$ - $10^7$  nucléotides, des modifications ont permis par la suite d'en augmenter la sensibilité (1 adduit/ $10^{10}$  nucléotides) grâce à l'incorporation d'une étape d'enrichissement.

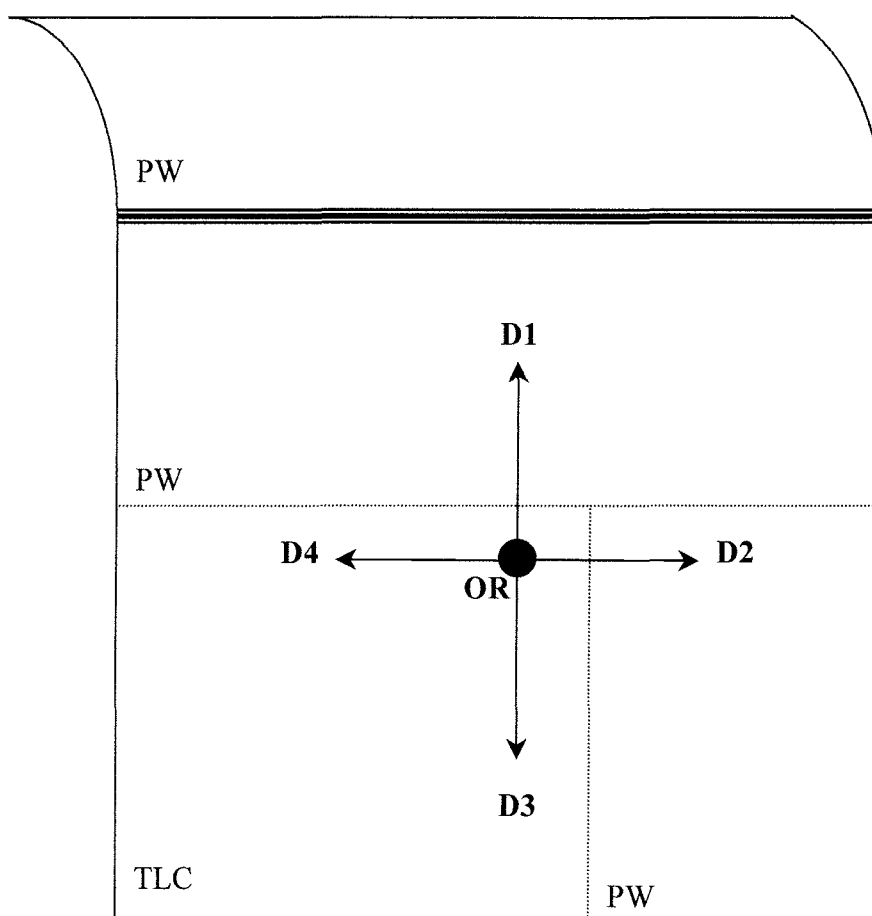


Figure 2: Migration multidimensionnelle des nucléotides marqués. TLC : plaque chromatographique sur couche mince, PW : papier Whatman, OR : origine du dépôt, D1, D2, D3, D4 : direction de chacune des 4 migrations effectuées.

## II. Méthodes d'enrichissement des adduits à l'ADN

Ces méthodes d'enrichissement sont basées sur l'élimination des nucléosides normaux avant l'étape de marquage au  $^{32}\text{P}$ . En permettant le marquage de nucléosides modifiés en plus grande quantité, cette étape d'enrichissement permet ainsi d'augmenter la sensibilité de la technique par un facteur 1000.

Différentes méthodes d'enrichissement ont été proposées.

### Méthode d'enrichissement à la nucléase P1 (Reddy et Randerath, 1986):

Cette technique basée sur l'utilisation de la nucléase P1 est l'une des plus utilisées. Alors que cette enzyme est capable de déphosphoryler les déoxyribonucléosides 3'-monophosphate, l'encombrement stérique provoqué par la présence d'un adduit rend inaccessible l'action de cette enzyme sur la liaison 3' phosphate. Les nucléosides normaux sont donc les seuls à être déphosphorylés. La polynucléotide kinase du phage T4 présentant une spécificité de substrat pour les 3'-phosphodéoxyribonucléosides, seuls les nucléosides modifiés peuvent être ainsi marqués au  $^{32}\text{P}$ .

### Méthode d'enrichissement au butanol (Gupta, 1985):

Les macroadduits ayant un caractère hydrophobe, cette technique consiste en l'extraction au butanol des nucléotides modifiés. Le butanol utilisé est préalablement distillé une à deux fois pour éliminer toute trace d'acidité généralement présente dans le produit manufacturé. Cette acidité peut en effet gêner l'action de la polynucléotide kinase lors du marquage.

### Méthodes chromatographiques :

La séparation des nucléosides normaux des nucléosides modifiés peut également être effectuée par chromatographie en phase inverse sur couche mince ou liquide haute performance. Bien que très efficaces, ces méthodes sont néanmoins peu utilisées.

## III. La technique de post-marquage au $^{32}\text{P}$ : considérations techniques

Nous verrons ici que pour plusieurs étapes de cette technique, le choix de certaines options peut être commandé par la nature chimique des adduits analysés.

### Etape de digestion de l'ADN

Quelque soient la nature et la structure chimique des cancérogènes impliqués, le protocole de digestion proposé reste applicable à tout ADN modifié. Il est important néanmoins de noter ici que deux exceptions ont été rapportées pour les ADN porteurs d'adduits de la sterigmatocystine et de l'aflatoxine B1. Pour ces deux composés, une hydrolyse incomplète de l'ADN en tri et dinucléotides a été observée après digestion par la nucléase micrococciale et la phosphodiesterase.

### Etape d'enrichissement :

Bien que les méthodes d'enrichissement au butanol et à la nucléase P1 soient toutes les deux efficaces à l'analyse des adduits lorsque ceux-ci possèdent tout au moins deux noyaux aromatiques, les adduits arylamines ne résistent pas à l'action de la nucléase P1. Déphosphorylés, ils échappent ainsi à l'analyse. Inversement, les adduits ne présentant qu'un voir aucun noyau aromatique (adduits de la mitomycine C, de l'oxyde de styrène et des métabolites du benzène par exemple) ne sont pas extraits par le butanol mais peuvent être efficacement enrichis à la nucléase P1.

La méthode d'enrichissement choisie devra donc tenir compte de la nature chimique des adduits étudiés (Gupta et Earley, 1988, Vaca et al, 1992). Que ce soit pour les adduits aromatiques de petites tailles ou les macroadduits non aromatiques, la méthode d'enrichissement à la nucléase P1 doit donc est utilisée. La méthode d'enrichissement au butanol est quant à elle requise pour l'analyse des adduits arylamines. En ce qui concerne les macroadduits de type HAP, ces deux techniques peuvent être utilisées. Néanmoins, la méthode d'enrichissement à la nucléase P1 étant plus simple d'utilisation, cette dernière technique est préférentiellement appliquée pour l'étude des adduits HAP.

Dans le cas d'une contamination à des cancérogènes non identifiés, l'application de ces deux techniques d'enrichissement apparaît donc comme indispensable pour une détection complète du profile d'adduits formés.

### Etape de marquage :

Cette étape ne dépend pas de la nature et de la structure chimique des adduits étudiés. On peut néanmoins noter ici que l'utilisation initiale d'apyrase de pomme de terre pour l'élimination du  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  en excès a été abandonnée avec l'évolution de la technique. En effet, la migration D1 par chromatographie sur couche mince de PEI-cellulose des échantillons en solution aqueuse est jugée suffisante pour l'élimination de ce composé radioactif dont la présence peut être responsable d'un bruit de fond important.

### Etape de migration :

Cette étape est très importante pour la purification et la résolution des adduits à l'ADN. La migration des adduits étant directement dépendante de leur polarité, le temps de migration et la composition des différents tampons utilisés doivent être choisis en conséquence.

D'une façon générale, la séparation des nucléotides normaux des nucléotides modifiés est effectuée par migration dans des solutions d'électrolytes (exempt d'urée) concentrées. Les adduits étant hydrophobes restent concentrés au point de dépôt alors que les petits résidus migrent hors de la plaque de PEI-cellulose. Lorsque les adduits sont de faibles poids moléculaires, une augmentation de la concentration en sels limitent leur migration hors de la zone de dépôt (cas des adduits à un noyau aromatique ou non aromatiques).

Cette séparation, initialement réalisée en direction D1 et D2 (Figure ) a été quelque peu modifiée. Elle reste basée sur une double migration, D1 et D3 mais chaque migration est effectuée à la verticale, dans des sens opposés (Gupta, 1996).

La résolution des adduits est quant à elle réalisée dans des solutions d'électrolytes concentrées en urée (7 à 8.5 M) ou dans des solvants organiques. Il est également possible à ce stade d'améliorer la séparation des différents adduits par la modification du pH (modification de la mobilité dans certains solvants) ou de la concentration en sels et en urée (migration moins

rapide). Cette double migration est effectuée dans le même sens, à l'horizontale, en direction D4 et D5. La composition des tampons communément utilisés est donnée dans le tableau 1.

Tableau 1: Exemple de tampons utilisées pour la purification et la résolution des adduits (d'après Gupta, 1993)

Direction de la migration	Composition
D1	Phosphate de sodium 1 M, pH 6
D3	Formate de lithium 4 M, urée 7 M, pH 3.5
D4	Chlorure de lithium 0.8 M, Tris-HCl 0.5 M, urée 7 M, pH 8
D4	Bicarbonate de sodium 0.2 M, urée 6 M
D3/D4	Bicarbonate de sodium 0.8 M, Tris-HCl 0.15 M, urée 8 M, pH 9.6
D4	H3BO3 0.5 M, Tris-HCl 0.5 M, EDTA 10 mM, 1.3 M NaCl, urée 8 M, pH 8
D4	Phosphate de sodium 0.8 M, Tris-HCl 0.5 M, urée 7 M, pH 8
D1/D5	Phosphate de sodium 1.7-2.7 M, pH 5.5

#### IV. Problèmes liés à la technique

Le résultat de plusieurs études méthodologiques sur la technique de post-marquage au  $^{32}\text{P}$  a permis de mettre en évidence différentes sources d'artéfacts possibles liées soit au protocole d'extraction de l'ADN soit aux étapes d'enrichissement et de marquage des adduits (Phillips, 1997, Harvey et Parry, 1998) (Tableau 2).

Outre la formation possible de ces artéfacts, de grande variabilité dans les niveaux d'adduits mesurés lors d'exercices d'intercalibration, rendent aujourd'hui nécessaire une standardisation du protocole. Une action d'assurance qualité est actuellement en cours dans le cadre du programme européen BELQUAM (1999). L'objectif est de comparer les différents protocoles utilisés pour permettre la proposition d'une méthode de référence chez les poissons de l'Atlantique Nord. Ce protocole sera applicable dans le cadre de la convention d'Oslo et Paris au sein du programme de surveillance 'Joint Assessment and Monitoring Programme' (JAMP).

Tableau 2: Récapitulatif de quelques artéfacts associés à l'application de la technique de post-marquage au  $^{32}\text{P}$

Etape du protocole concernée	Source	Solution proposée
Extraction de l'ADN	<p><b>Contamination aux ARN</b> Les adduits à l'ARN ayant des propriétés chromatographiques proches de celles des adduits à l'ADN, leur différenciation peut être difficile</p> <p><b>Solvants d'extraction</b> Des résidus de chloroforme et/ou de phénol peuvent être marqués par la polynucléotide kinase</p> <p>ou</p> <p>Des nucléotides endommagés par l'utilisation de ces solvants pendant l'extraction seraient marqués et détectés par la technique de post-marquage</p>	<p>Vérification de la pureté de l'ADN analysé par :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Spectrophotométrie</li> <li>- Electrophorèse sur gel d'agarose</li> <li>- CLHP et détection UV</li> </ul> <p>Distillation des solvants utilisés</p>
Etape d'enrichissement	<p><b>Butanol</b> Des impuretés présentes dans le butanol utilisé seraient responsables de la présence de spots parasites</p> <p>ou</p> <p>L'utilisation de butanol dans des tubes eppendorfs de couleurs serait responsable de spots liés à la dissolution de composés chimiques capables de réagir avec l'ADN</p>	<p>Distillation avant usage</p> <p>Utilisation d'eppendorfs non colorés</p>
Etape de marquage	<p><b><math>[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}</math></b> Incorporation de sous-produits de l'ATP (ADP) pendant le marquage ?</p>	



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Beach, A. C., Gupta, R. C. (1992).  $^{32}\text{P}$ -postlabeling assay and human biomonitoring. *Carcinogenesis*, 13 : 1053-1074.
- BELQUAM (Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programmes) (1999). BELQUAM Office, c/o Dr. Peter Matthiessen, Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, Remembrance Avenue, Burnham-on-Crouch, Essex CMO 8HA, UK.
- Miller, E. C., Miller, J. A. (1981). Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer*, 47: 2327-2345.
- Gupta, R. C. (1985). Enhanced sensitivity of  $^{32}\text{P}$ -postlabeling analysis of aromatic carcinogen-DNA adducts. *Cancer Res.*, 45 : 5656-5662.
- Gupta, R. C. (1993).  $^{32}\text{P}$ -postlabelling analysis of bulky aromatic adducts. In : D. H. Phillips, M. Castegnaro, H. Bartsch (ed), *Postlabelling methods for detection of DNA adducts*, IARC, Lyon, pp 11-23.
- Gupta, R. C. (1996).  $^{32}\text{P}$ -postlabeling for detection of DNA adducts. In : G. P. Pfeifer (ed), *Technologies for detection of DNA damage and mutations*. Plenum Press, New-York, pp 45-61.
- Gupta, R. C., Reddy, M. V., Randerath, K. (1982).  $^{32}\text{P}$ -postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts. *Carcinogenesis*, 3 : 1081-1092.
- Gupta, R. C., Earley, K. (1988).  $^{32}\text{P}$ -adduct assay : comparative recoveries of structurally diverse DNA adducts in the various enhancement procedures. *Carcinogenesis*, 9 : 1687-1693.
- Harvey, J. S., Parry, J. M. (1998). Application of the  $^{32}\text{P}$ -postlabelling assay for the detection of DNA adducts : false positives and artefacts and their implications for environmental biomonitoring. *Aq. Toxicol.*, 40 : 293-308.
- Phillips, D. H. (1997). Detection of DNA modifications by the  $^{32}\text{P}$ -postlabelling assay. *Mutation Res.*, 378 : 1-12.
- Reddy, M. V. (1993).  $^{32}\text{P}$ -postlabelling analysis of small aromatic and of bulky non-aromatic DNA adducts. In : D. H. Phillips, M. Castegnaro, H. Bartsch (ed), *Postlabelling methods for detection of DNA adducts*, IARC, Lyon, pp 25-33.
- Reddy, M. V., Gupta, R. C., Randerath, K. (1981).  $^{32}\text{P}$ -base analysis of DNA. *Anal. Biochem.*, 117 : 271-279.
- Reddy, M. V., Randerath, K. (1986). Nuclease P1-mediated enhancement of  $^{32}\text{P}$ -postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis*, 7 : 1543-1551.
- Vaca, C. E., Löfgren, M., Hemminki, K. (1992). Some quantitative considerations about DNA adduct enrichment procedures for  $^{32}\text{P}$ -postlabelling. *Carcinogenesis*, 13 : 2463-2466.

## ANNEXE II

### DOSAGE DE LA 8-OXO-7,8-DIHYDRO-2'-DEOXYGUANOSINE (8-oxodGuo)

Il existe plusieurs méthodes de mesure des bases oxydées de l'ADN faisant appel à différentes techniques (Cadet et al, 1997).

Méthodes directes :

- Chromatographie liquide haute performance/détection électrochimique (CLHP/DE)
- Chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse (CG/SM)
- CLHP/Post-marquage au  $^{32}\text{P}$
- Détection immunochimique

Méthodes indirectes :

- Endonucléases de réparation de l'ADN (formamidopyrimidine-DNA glycosylase, par exemple) /test Comet ou /élution alcaline

Parmi ces méthodes, la mesure de la 8-oxodGuo par CLHP/DE a été la plus utilisée en raison de sa très grande sensibilité et de sa simplicité relative (Floyd et al, 1986, Kaur et Halliwell, 1996). Cette technique présente l'avantage de coupler une technique de séparation spécifique des différentes bases de l'ADN (CLHP) à une méthode de détection tout aussi sensible et spécifique des produits d'oxydation électrochimiquement actifs.

#### I. Principe de dosage de la 8-oxodGuo par CLHP/DE

La mesure de la 8-oxodGuo par CLHP/DE peut être résumée en plusieurs étapes. Pour chacune d'entre elles, nous avons choisi de citer uniquement les principes de base, les protocoles utilisés au cours de ce travail de thèse ayant été détaillés de façon tout à fait explicite dans les articles 3 et 4.

##### Première étape :

L'ADN de tissu, de cellules ou de liquides biologiques est isolé et digéré en 2'-déoxyribonucléosides par voie enzymatique (nucléase P1 et phosphatase alcaline). Après digestion, la solution est injectée pour séparation en CLHP.

##### Deuxième étape :

L'analyse par CLHP permet non seulement la séparation des 2'-déoxyribonucléosides normaux mais également la séparation des 2'-déoxyribonucléosides oxydées. La 8-oxodGuo étant un composé apolaire, l'utilisation de colonnes de silice, notamment de type octadécylsilylé (ODS), est particulièrement recommandée.

L'élution est réalisée en mode isocratique dans un tampon d'électrolytes permettant l'établissement d'un courant de base au niveau des électrodes du détecteur électrochimique. Ce tampon contient également un faible pourcentage de méthanol pour l'élution des molécules hydrophobes.

##### Troisième étape :

De façon à permettre l'expression des résultats en nombre de lésions/10<sup>5</sup> dGuo, l'éluat est d'abord acheminé au niveau d'un détecteur UV de façon à permettre la mesure qualitative des

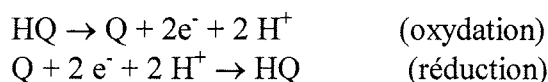
différents 2'-désoxyribonucléosides normaux de l'ADN (dAde, dCyd, dGuo, dThd). La détection est réalisée à une longueur d'onde de 260 nm. L'utilisation de standards a préalablement permis de déterminer le temps de rétention de chaque désoxyribonucléoside et d'établir une droite étalon pour le dosage de la dGuo (Figure 1).

#### Quatrième étape :

L'éluat a ensuite été acheminé vers la cellule de détection électrochimique pour la mesure de la 8-oxodGuo. L'injection de 8-oxodGuo standard a préalablement permis de déterminer le temps d'élution de cette base oxydée et d'en réaliser une droite étalon pour permettre la conversion du signal électrique en quantité de 8-oxodGuo analysée (Figure 2).

#### ***Principe de base de la détection électrochimique***

L'électrochimie est basée sur des réactions d'oxydoréduction au sein d'un couple redox (Q/HQ) pouvant être caractérisées par des échanges d'électrons du type :



En apportant l'énergie nécessaire à ces réactions sous la forme d'un potentiel électrique, la détection électrochimique permet une mesure quantitative de l'une des deux espèces chimiques impliquées dans cette réaction d'oxydoréduction. Cette mesure est réalisée de façon indirecte par la mesure du courant électrique résultant (en fonction de son état initial) de son oxydation ou de sa réduction.

Le potentiel est appliqué de façon constante au niveau d'une cellule vers laquelle est acheminé l'éluat de sortie de colonne. Alors que la réaction se produit au niveau d'une électrode dite de mesure, la contre réaction s'effectue au niveau d'une électrode auxiliaire. Au niveau de la cellule, une électrode de référence permet de contrôler le potentiel appliqué.

Il existe deux types de détecteurs électrochimiques qui diffèrent essentiellement par la zone de contact de l'éluat avec l'électrode de référence :

- détecteurs ampérométriques : pour ce type de détecteurs, l'éluat passe à la surface de l'électrode de mesure et permet une oxydation (ou une réduction) partielle des espèces actives électrochimiquement.
- détecteurs coulométriques : le passage de l'éluat à travers l'électrode de mesure permet l'oxydation (ou la réduction) de la quasi totalité des espèces électrochimiquement actives. Ce type de détecteurs présente ainsi une plus grande sensibilité et une plus grande précision de mesure

Lors de la mesure de la 8-oxodGuo le couple d'oxydoréduction étudié est donc le couple 2'-désoxyguanosine, dGuo (réduit)/ 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine, 8-oxodGuo (oxydé).

Les mesures présentées dans cette thèse ont été obtenue avec un détecteur ampérométrique pour lequel le potentiel d'oxydation avait été fixé, grâce à la réalisation d'un électrovoltamogramme, à 650 mV (Garcin, 1998).

## **II. Problèmes inhérents à la mesure des bases oxydées de l'ADN**

Parce que ce type de lésions à l'ADN se produit à l'état de traces (1 lésion/10<sup>6</sup> paires de bases)

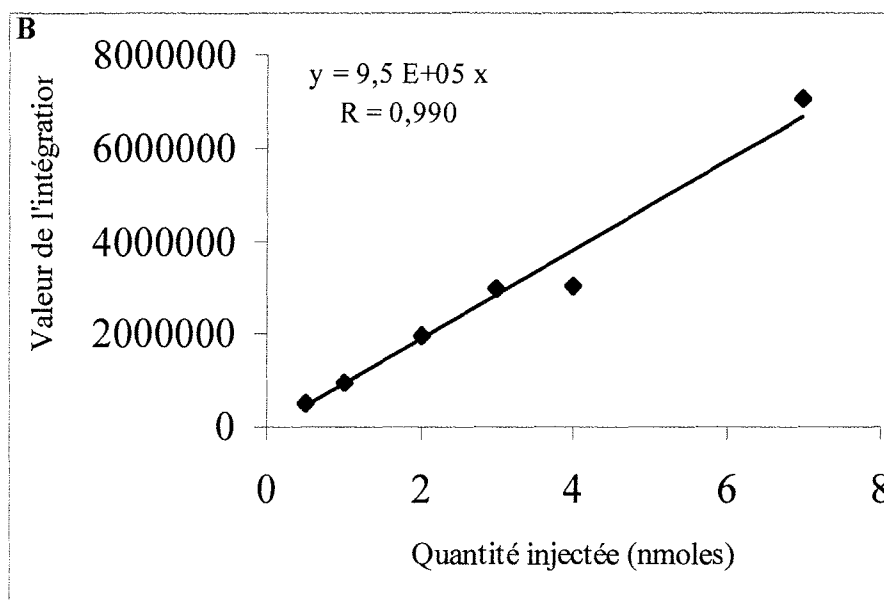
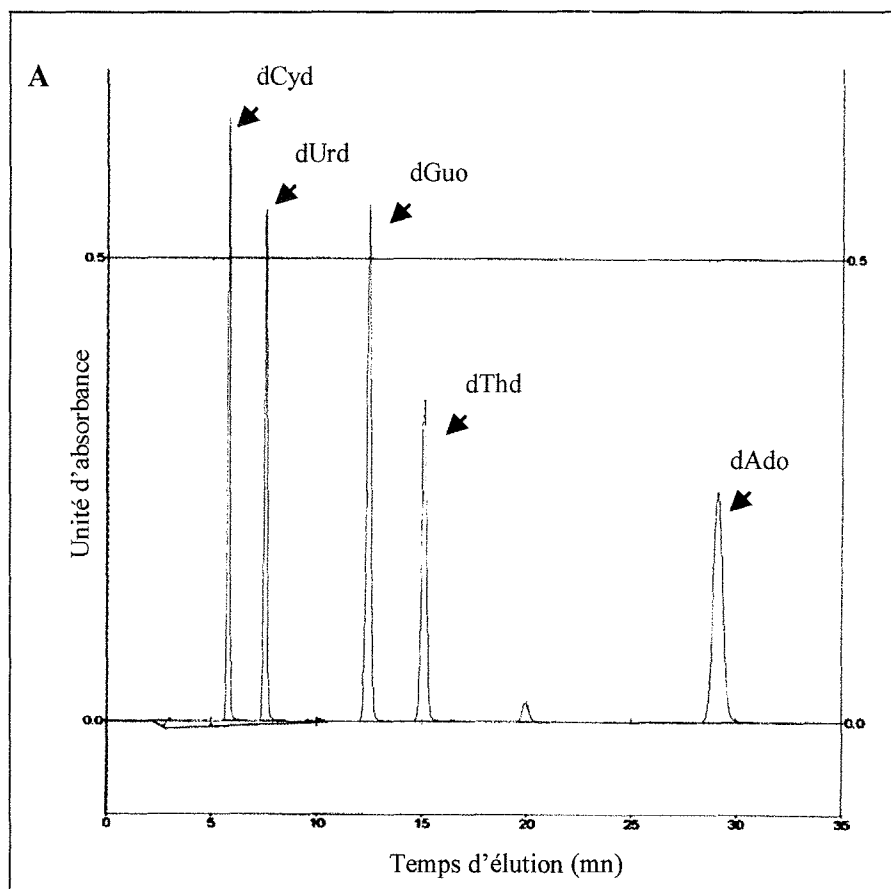


Figure 1 : (A) Profile chromatographique des 2'-désoxyribonucléosides, dGyd, dUrd, dGuo, dThd et dAdo par CLHP/détection UV: temps de rétion respectif de 6, 8, 14.5, 16 et 29 mn. (B) Droite étalon de la dGuo. CLHP (Beckman, System Gold 118)/décteur UV (Beckman, System Gold 166), pré-colonne Ultrasphère C-18 (Interchrom, ODS, 45 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m), colonne Uptisphère (Interchrom, ODB, 250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m), élution en mode isocratique : 10% méthanol, 10 mM acide citrique, 25 mM acétate de sodium, 30 mM hydroxide de sodium, 10 mM acide acétique, pH 5.3, débit 1 ml/mn, P = 100 bars.

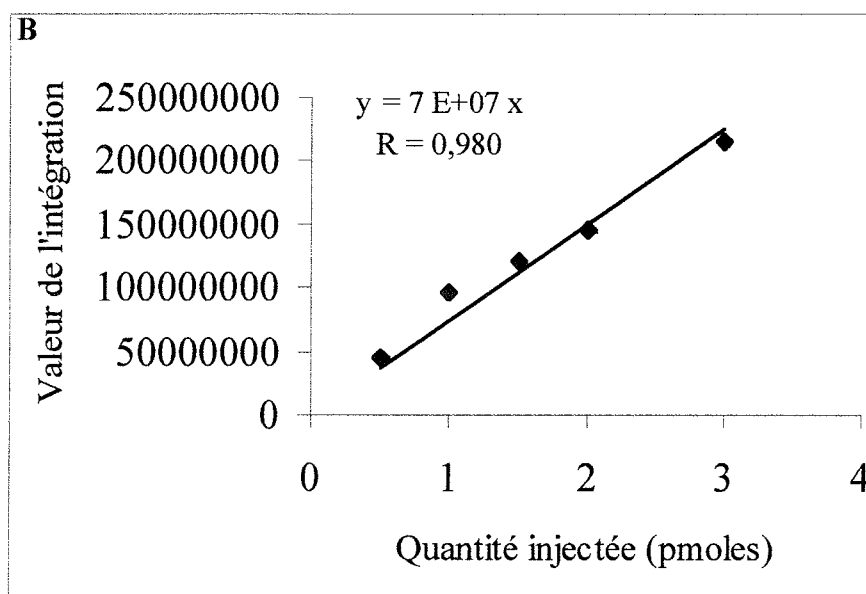
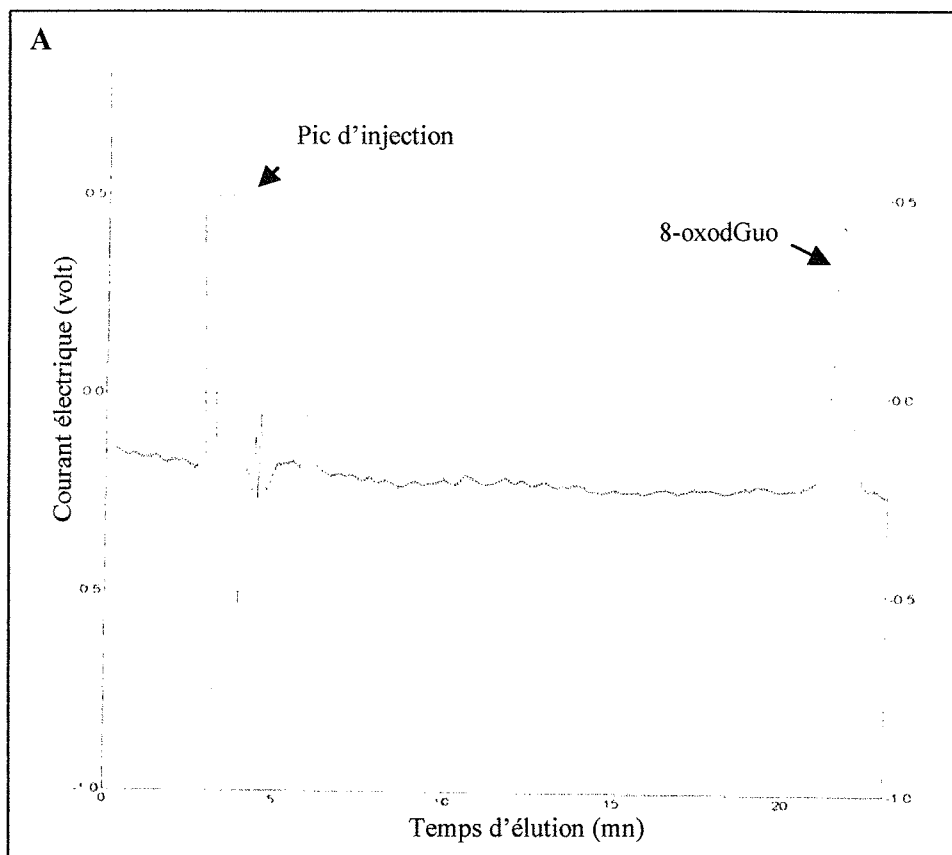


Figure 2: (A) Profil chromatographique de la 8-oxodGuo par HPLC/détection électrochimique, temps de rétention : 21.5 mn. (B) Droite étalon de la 8-oxodGuo. CLHP (Beckman, System Gold 118)/détecteur électrochimique (Kontron 405), pré-colonne Ultrasphère C-18 (Interchrom, ODS, 45 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m), colonne Uptisphère (Interchrom, ODB, 250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m), élution en mode isocratique : 10% méthanol, 10 mM acide citrique, 25 mM acétate de sodium, 30 mM hydroxide de sodium, 10 mM acide acétique, pH 5.3, débit 1 ml/mn, P = 100 bars, sensibilité du détecteur 1nA/volt.

les méthodes de mesure se doivent d'être très sensibles. L'augmentation des applications faites dans ce domaine et l'observation de différences dans les niveaux de bases oxydées rapportés dans la littérature (Tableau 1) a ainsi mis en avant plusieurs sources d'artéfacts liés le plus souvent à une oxydation artéfactuelle des échantillons d'ADN lors de leur préparation ou lors des différentes étapes analytiques de mesure (Tableau 2) (Harris et al, 1994, Cadet et al, 1997, 1998). Parce que ces artefacts peuvent être ainsi responsables d'une surestimation des niveaux mesurés, il devient alors difficile d'estimer le niveau de base de ces lésions. On estime alors que plus les valeurs rapportées sont faibles plus elles se rapprochent de la réalité biologique. Il en résulte ainsi une remise en cause permanente des méthodes de mesure lorsqu'une nouvelle technique évalue à la baisse les niveaux rapportés. Ces problèmes d'artéfacts sont responsables de nombreuses confusions suite aux quantités de données publiées dans la littérature. Ils donnent lieu à l'organisation de Congrès et de groupes de travail exclusivement consacrés à leur effet (Collins et al, 1997).

Tableau 1 : Niveaux de 8-oxodGuo mesurés dans des cellules animales et humaines par différentes méthodes de mesure des bases oxydées de l'ADN

Technique utilisée	Type de cellule	Niveaux mesurés 8-oxodGuo/10 <sup>5</sup> dGuo	Références
<b>CLHP/DE</b>	Lymphocytes	5.4 ± 0.7	Harris et al, 1994
		0.2 ± 0.1	Nakajima et al, 1996
		0.4 ± 0.3	Collins et al, 1997
		6.8 ± 0.5	Bashir et al, 1993
	Leucocytes	1.0 ± 0.0	Hanaoka et al, 1993
	HeLa	5.0 ± 2.0	Kasai et al, 1986
<b>CG/SM</b>	ADN de thymus de veau	3.9 ± 0.5	Ravanat et al, 1997
	Foie de rat	0.9 ± 0.2	Adachi et al, 1995
	Lymphocytes	23.1 – 49.3	Olinski et al, 1996
<b><sup>32</sup>P-postlabeling</b>	Leucocytes	14.4 – 16.6	Malins et Haimanot, 1991
	ADN de thymus de veau	91.8 ± 5.0	Ravanat et al, 1997
		72.1 ± 7.3	Aruoma et al, 1991
<b>Comet/Fpg</b>	Lymphocytes	7.3	Wilson et al, 1993
		30.2 ± 11.1	Devanaboyina et Gupta, 1996
<b>Comet/Fpg</b>	Lymphocytes	0.03	Collins et al, 1997
		0.03 ± 0.01	Collins et al, 1997

**Tableau 2** : Principales méthodes de mesure des bases oxydées de l'ADN : avantages et inconvénients de chaque méthode

Méthode de mesure	Sensibilité	Avantages/inconvénients	Sources d'artéfacts	Solutions proposées	Références
<b>CG/SM</b>	$1 \times 10^{-6}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- sensibilité de la mesure</li> <li>- identification univoque et analyse simultanée de plusieurs produits d'oxydation</li> <li>- appareillage et mise en route onéreux</li> <li>- surestimation des niveaux mesurés</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- oxydation des bases normales de l'ADN lors de leur dérivatisation<sup>1</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pré-purification par CLHP avant analyse par GC/MS. Utilisation de standards internes<sup>2</sup>.</li> <li>- purge du système à l'azote et diminution de la température et du temps de dérivatisation (conditions non suffisantes)</li> </ul>	<p>Douki et al, 1996 Ravanat et al, 1997 Ravanat, 1995</p>
<b>CLHP/DE</b>	$1 \times 10^{-6}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- sensible et spécifique</li> <li>- relativement facile à mettre en œuvre</li> <li>- analyse restreinte aux produits d'oxydation électrochimiquement actifs</li> <li>- surestimation possible des mesures lors des problèmes d'oxydation liés à la préparation des échantillons</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- cf artéfacts liés au protocole d'extraction de l'ADN</li> <li>- quantité d'ADN analysé</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- application d'un protocole d'extraction adapté</li> <li>- analyse d'une quantité d'ADN minimale</li> </ul>	<p>Helbock et al, 1998 Collins et al, 1997 Nakajima et al, 1996</p>

		- sous-estimation possible en raison d'une hydrolyse enzymatique incomplète		- optimisation des conditions d'hydrolyse	
<b>Fpg/ élution alcaline test Comet</b>	$0.1 \times 10^{-7}$	- technique rapide et sensible - problèmes de spécificité de substrats pour les enzymes de réparation utilisées	- sous-estimation des mesures ?		Pflaum et al, 1997
<b>Immunochimie</b>	$1 \times 10^{-5}$	- rapide, sensible, très spécifique  - surestimation des niveaux mesurés	Réactions croisées avec la guanine et autres dérivés structurellement apparentés		Park et al, 1992 Yin et al, 1995
<b>Post-marquage au <math>^{32}\text{P}</math></b>	$1 \times 10^{-4}$	- assez sensible - amélioration de la sensibilité de la mesure par pré-purification par CLHP  - Surestimation des niveaux mesurés	- oxydation des bases non modifiées par radiolyse du $^{32}\text{P}$		Cadet et al, 1992 Moller et Höfer, 1997
<b>Protocole d'extraction</b>		- problèmes d'oxydation artéfactuelle des échantillons lors de leur préparation	- nature des solvants utilisés. Exemple : Utilisation controversée du phénol  - température d'incubation  - teneur en oxygène	- dans le cas du phénol, en éviter l'utilisation ou le distiller et le purger avec un gaz inerte avant usage  - les températures élevées favorisent ces oxydations  - travail en anaérobie conseillée	Claycamp, 1992 Finnegan et al, 1995, 1996 Harris et al, 1994  Hofer et Möller, 1998  Nakajima et al, 1996 Claycamp, 1992 Adachi et al, 1995



---

- Utilisation de chélateurs d'ions puissants ou de molécules piègeurs de radicaux libres	Helbock et al, 1998 Hofer et Möller, 1998
---	--

<sup>1</sup> : les nucléobases de l'ADN n'étant pas assez volatiles pour une analyse en CG, une étape de dérivatisation est nécessaire : chauffage à 110-130°C pendant 20 mn puis dissolution dans un mélange (1 :1) d'acétonitrile et de N-bis (trimethylsilyl)trifluoroacetamide. <sup>2</sup> : permet une estimation des pertes éventuellement liées à l'étape de pré-purification

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adachi, S., Zeisig, M., Möller, L. (1995). Improvements in the analytical method for 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA. *Carcinogenesis*, 16 : 253-258.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Gajewski, E., Dizdaroglu, M. (1991). Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, 273 : 601-604.
- Bashir, S., Harris, G., Denman, M. A., Blake, D. R., Winyard, P. (1993). Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases. *Ann. Rheumat. Dis.*, 52 : 659-666.
- Cadet, J., D'Ham, C., Douki, T., Pouget, J-P., Ravanat, J-L., Sauvaigo, S. (1998). Facts and artifacts in the measurement of oxidative base damage to DNA. *Free Radical Res.*, 29 : 541-550.
- Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J-L. (1997). Artifacts associated with the measurement of oxidized DNA bases. *Environ. Health Perspect.*, 10 : 1034-1039.
- Cadet, J., Odin, F., Mouret, J-F., Polverelli, M., Audic, A., Giacomoni, P., Favier, A., Richard, M-J. (1992). Chemical and biochemical postlabeling methods for singling out specific oxidative DNA lesions. *Mutat. Res.*, 275 : 343-354.
- Claycamp, H. G. (1992). Phenol sensitization of DNA to subsequent oxidative damage in 8-hydroxyguanine assays. *Carcinogenesis*, 13 : 1289-1292.
- Collins, A., Cadet, J., Epe, B., Gedik, C. (1997). Problems in the measurement of 8-oxoguanine in human DNA. Report of a workshop, DNA oxidation, held in Aberdeen, UK, 19-21 January, 1997. *Carcinogenesis*, 18 : 1833-1836.
- Devanaboyina, U., Gupta, R. C. (1996). Sensitive detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by <sup>32</sup>P-postlabeling assay and the basal levels in rat tissues. *Carcinogenesis*, 17 : 917-924.
- Douki, T., Delatour, T., Bianchini, F., Cadet, J. (1996). Observation and prevention of an artefactual formation of oxidized DNA bases and nucleosides in the GC-EIMS method. *Carcinogenesis*, 17 : 347-353.
- Finnegan, M. T. V., Herbert, K. E., Evans, M. D., Griffiths, H. R., Lunec, J. (1996). Evidence for sensitisation of DNA to oxidative damage during isolation. *Free Radical Biol. Med.*, 20 : 93-98.
- Floyd, R. A., Watson, J. J., Wong, P. K., Altmiller, D. H., Rickard, R. C. (1986). Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine : sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Radical Res. Comm.*, 1 : 163-172.
- Garcin, J-C (1998). Mesure de lésions oxydatives de l'ADN dans les tissus et les fluides biologiques comme biomarqueurs de stress oxydatif : application in vivo chez le rat et l'homme. *Thèse n°1921, Université Bordeaux I.*

- Hanaoka, T., Tsugane, S., Yamano, Y., Takahashi, T., Kasai, H., Natori, Y., Watanabe, S. (1993). Quantitative analysis of 8-hydroxyguanine in peripheral blood cells: An application for asbestosis patients. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 65 : S215-S217.
- Harris, G., Bashir, S., Winyard, P. G. (1994). 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine present in DNA is not simply an artefact of isolation. *Carcinogenesis*, 15 : 411-413.
- Helbeck, 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. USA*, 95 : 288-293.
- Hofer, T., Möller, L. (1998). Reduction of oxidation during the preparation of DNA and analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Chem. Res. Toxicol.*, 11 : 882-887.
- Kasai, H., Crain, P. F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Ootsuyama, A., Tanooka, H. (1986). Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence of its repair. *Carcinogenesis*, 7 : 1849-1851.
- Kaur, H., Halliwell, B. (1996). Measurement of oxidized and methylated DNA bases by HPLC with electrochemical detection. *Biochem. J.*, 318 : 21-23.
- Malins, D. C., Haimanot, R. (1991). Major alterations in the nucleotide structure of DNA in cancer of the female breast. *Cancer Res.*, 51 : 5430-5432.
- Möller, L., Höfer T. (1997). [<sup>32</sup>P]ATP mediates formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine from 2'-deoxyguanosine, a possible problem in the <sup>32</sup>P-postlabeling assay. *Carcinogenesis*, 18 : 2415-2419.
- Nakajima, M., Takeuchi, T., Morimoto, K. (1996). Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine in human cells under oxygen-free conditions. *Carcinogenesis*, 17 : 787-791.
- Olinski, R., Zastawny, T. H., Foksinski, M., Windorbska, W., Jaruga, P., Dizdaroglu, M. (1996). DNA base damage in lymphocytes of cancer patients undergoing radiation therapy. *Cancer. Lett.*, 106 : 207-215.
- Park, E. U., Shigenaga, M. K., Degan, P., Korn, T. S., Kitzler, J. W., Wehr, C. M., Kolachana, P., Ames, B. N. (1992). Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 : 3375-3379.
- Pflaum, M., Will, O., Epe, B. (1997). Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis*, 18 : 2225-2231.
- Ravanat, J-L., Douki, T., Turesky, R., Cadet, J. (1997). Measurement of oxidized bases in DNA. Comparison between HPLC-EC and GC-MS assays. *J. Chim. Phys.*, 94 : 306-312.
- Ravanat, J-L., Turesky, R. J., Gremaud, E., Trudel, L. J., Sradler, R. H. (1995). Determination of 8-oxoguanine in DNA by gas chromatography-mass spectrometry and HPLC-

electrochemical detection : overestimation of the background level of the oxidized base by the gas chromatography-mass spectrometry assay. *Chem. Res. Toxicol.*, 8 : 1039-1045.

Wilson, V. L., Taffe, B. G., Shields, P. G., Povey, A. C., Harris, C. C. (1993). Detection and quantification of 8-hydroxydeoxyguanosine adducts in peripheral blood of people exposed ionizing radiation. *Environ. Health Perspect.*, 99 : 261-263.

Yin, B., Whyatt, R. M., Perera, F. P., Randall, M. C., Cooper, T. B., Santella, R. M. (1995). Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA. *Free Radical Biol. Med.*, 18 : 1023-1032.

## ANNEXE III

### Mise au point d'un protocole d'Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction (AP-PCR) pour l'espèce sentinelle *Mytilus* sp. Perspectives d'utilisation en biosurveillance de l'environnement marin

Qu'il s'agisse de la traditionnelle génétique formelle (Etude de la transmission d'un caractère phénotypique ou quantitatif d'un individu à l'autre) ou de la génétique des populations (Etude des forces avec lesquelles le génome d'une population varie au cours du temps : sélection, migration, mutation, dérive), les bases de chacune de ces disciplines reposent sur l'observation du phénotype même des individus. Le polymorphisme d'un gène est ainsi défini en répertoriant les variantes qualitatives (couleur, forme...) ou quantitatives (taille, nombre...) du caractère régit par ce gène.

En génétique, l'intégration récente des techniques de biologie moléculaire a permis une étude directe de l'information génétique : l'observation ne se limitant plus au résultat de l'expression d'un gène mais à la séquence nucléotidique du gène lui-même. Les différents allèles d'un gène, source du polymorphisme naturel, sont ainsi devenus identifiables par la donnée des variantes qualitatives (ordre et nature des bases) et quantitatives (taille du gène en nombre de bases) de la séquence nucléotidique du locus étudié.

Parmi les techniques les plus utilisées en génétique moléculaire, la Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) et l'Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction (AP-PCR) ont été les plus utilisées pour les études de DNA fingerprinting (Williams et al, 1990).

#### I. Principes de base de la Polymerase Chain Reaction et des méthodes dérivées

La Polymerase Chain Reaction (PCR) permet l'amplification *in vitro* d'une région génomique cible comprise entre deux séquences d'ADN connues (Saiki et al, 1988). Pour cet effet, deux petites séquences nucléotidiques de 15 à 25 nucléotides sont utilisées comme 'primers' ou amorces pour une série de réactions catalysée par une ADN polymérase. Ces amorces sont complémentaires des régions situées de part et d'autre de l'ADN cible, chacune étant complémentaire de l'un des brins de la molécule d'ADN à amplifier. Elles sont ajoutées en excès en présence d'une ADN polymérase et de son tampon, de déoxyribonucléotides triphosphate et de l'ADN cible. Par un jeu de température :

déshybridation des brins de l'ADN à amplifier à haute température (94°C)  
hybridation préférentielle des primers à faible température (30 à 60°C)  
polymérisation à 70-72°C

on réalise ainsi l'amplification de la région génomique située entre les deux amorces. Parce que les produits d'amplification servent de matrice pour le cycle suivant, chaque cycle successif double la quantité d'ADN amplifié. Au bout de n cycles d'amplification, on estime la quantité d'ADN cible à  $2^n$ . La réaction est donc qualifiée d'exponentielle.

La RAPD-PCR est basée sur le même principe mais elle utilise plusieurs amorces dont la séquence a été déterminée de façon aléatoire : les régions génomiques amplifiées restent donc inconnues. Cette technique qui ne nécessite aucune connaissance préalable quant à la

séquence de l'ADN cible, ne requiert aucune opération onéreuse de séquençage ou de clonage. Facile à mettre en œuvre, elle ne nécessite que de petites quantités de tissus, la réaction de PCR étant réalisée à partir d'une quantité d'ADN inférieure au microgramme. Cette technique de DNA fingerprinting a été testée avec succès sur de nombreux organismes : animaux (Welsh et al, 1990), végétaux (Hu et Quiros, 1991), bactéries (Jayaro et al, 1992) et champignons (Aufaure-Brown et al, 1992). Ses domaines d'application sont multiples :

- études taxonomiques pour l'identification et la différenciation de plusieurs clones, souches, espèces ou populations (Dinesh et al, 1993)
- analyses des populations (études des flux géniques, identification d'hybrides) (Arnold et al, 1991)
- analyses de pedigree (Hadrys et al, 1993)
- études épidémiologiques (Mazurier et al, 1992)
- diagnostics médicaux (Peinado et al, 1992)
- cartographie génétique par étude des coségrégations (Ronald et al, 1992)
- sélection génétique assistée par marqueurs (SAM), recherche de marqueurs à effets quantitatifs (QTL) (Paran et al, 1991)

Chacune de ces applications repose sur la définition de marqueurs de RAPD-PCR : un marqueur est le ou l'un des produits d'une amplification par la méthode de RAPD-PCR qui, par sa présence, permet de distinguer un individu d'un autre ou de certifier de la présence d'un caractère intéressant.

La méthode d'AP-PCR présente des applications similaires puisqu'elle ne diffère de la méthode précédente uniquement par le fait qu'elle est basée sur l'utilisation d'une amorce unique.

## **II. Perspectives d'utilisation en écotoxicologie**

Dans l'environnement marin, de nombreux polluants ont été identifiés comme étant génotoxiques pour les organismes exposés. La plupart d'entre eux dont certains HAP sont mutagènes et peuvent ainsi entraîner une modification de la séquence génétique. Comme il en a été question dans la synthèse bibliographique de la présente thèse, la formation d'adduits ainsi que l'oxydation des bases de l'ADN sont dans le cas des HAP des événements sources de mutations chez les animaux exposés. L'exposition à ces polluants est donc susceptible de modifier le polymorphisme naturel des animaux dont les méthodes de RAPD- et d'AP-PCR peuvent rendre l'étude possible.

On peut ajouter également que les animaux soumis à un stress oxydatif peuvent présenter des cassures simple et double brins de l'ADN lors de l'attaque de ce dernier par des espèces réactives de l'oxygène. Ces modifications physiques de l'ADN, lorsqu'elles se produisent dans la séquence génomique amplifiée, peuvent ainsi modifier fortement le profil d'amplification obtenu par ces deux techniques.

Les résultats prometteurs obtenus par la méthode de RAPD-PCR sur des poissons échantillonnés le long d'un gradient de pollution (Akcha et al, Rapport de DEA), ont ainsi motivé la mise au point d'un protocole chez la moule en vue d'investigations futures.

### III. Mise au point d'un protocole d'AP-PCR chez *Mytilus* sp.

Différentes amorces ont été testées sur de l'ADN de moule *Mytilus galloprovincialis* (Tableau 1). Parmi les amorces testées, seule l'amorce oligo 3 a permis l'obtention d'un profil d'amplification reproductible chez la moule. Cette amorce a donc été sélectionnée pour la mise au point du protocole proposé Figure 1 dont un des profils d'amplification est présenté Figure 2.

Tableau 1 : Amorces testées pour l'amplification d'ADN génomique de moule

Amorces testées	Séquence (5'-3')	% GC
Oligo 1	5'-ACC TGG GCC GTT CAA-3'	60
Oligo 2	5'-TTT GCA AGA GCG CAA-3'	47
Oligo 3	5'-GTT TCC GTA GGT AAA-3'	40
Oligo 4	5'-GGT CCA CCT ATA TCG-3'	53

Compte tenu des résultats obtenus, il serait intéressant dans le futur de poursuivre ces investigations avec d'autres amorces et d'appliquer ainsi le protocole développé sur différentes populations de moules prélevées le long d'un gradient de pollution.

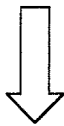
### Mélange réactionnel par échantillon (dans l'ordre)

- 180 pmoles de primer (Genset)
- qsp 30 µl eau MilliQ stérile
- 200 µmoles de chaque dNTP (Sigma)
- 1/10 vol de tampon de réaction 10X de la Taq Polymérase (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01 % gélatine)
- 1.4 U de Taq DNA polymérase (Sigma)
- 400 ng d'ADN génomique



### Cycle de température

- Dénaturation : 94°C pendant 3 minutes
- Dénaturation : 94°C pendant 30 secondes
- Hybridation : 45°C pendant 45 secondes (x 40 cycles)
- Polymérisation : 72°C pendant 45 secondes



**Migration sur gel de polyacrylamide à 3.5 % pendant 5 minutes à 60 V puis 1 h à 120 V**

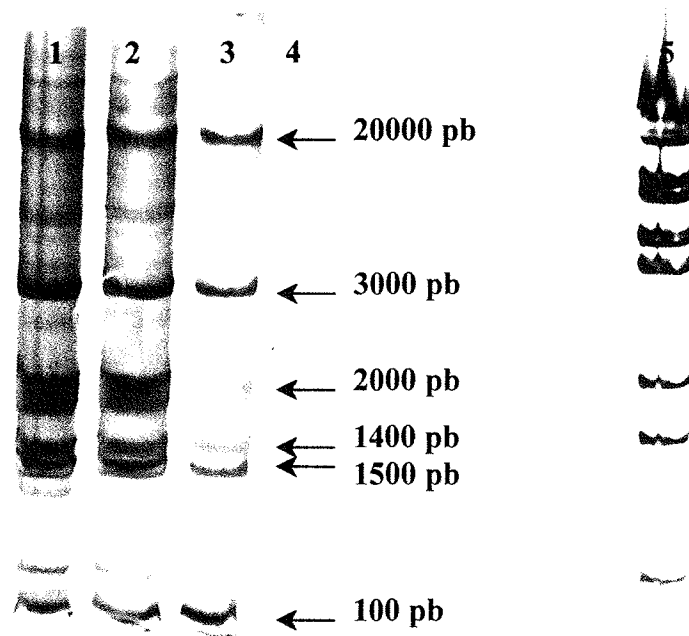


### **Révélation des fragments amplifiés par coloration à l'argent (Dinesh et al, 1993)**

- Fixation des produits d'amplification pendant 1 h dans 10 % éthanol/0.5 % acide acétique
- Incubation du gel pendant 30 minutes dans un bain de nitrate d'argent 0.011 M
- Rinçage à l'eau distillée
- Réduction des produits d'amplification pendant 5-6 minutes dans 0.75 M NaOH/0.085 M formaldéhyde
- Arrêt de la réaction par incubation 30 minutes dans 0.07 M de NaHCO<sub>3</sub>

**Figure 1 : Protocole d'AP-PCR pour l'amplification d'ADN génomique de moule**





**Figure 2 :** Profil d'amplification d'ADN génomique de moule obtenu avec l'amorce oligo 3. De gauche à droite : amplification dans les conditions décrites Figure 1 à l'exception faite des modifications suivantes (1) : 500 ng d'ADN génomique , (2) : 2U de Taq polymérase, (3) : amplification dans les conditions décrites Figure 1, (4) : témoin négatif (eau MilliQ), (5) : marqueur de poids moléculaire.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akcha, F., Galgani, F. (1995). Discrimination de populations de dragonnet, *Callionymus lyra*, de la Baie de Seine par la technique de RAPD-PCR. Perspectives d'utilisation en surveillance des effets biologiques. *Rapport de DEA présenté à l'Observatoire des Sciences de l'Univers de l'Université d'Aix-Marseille II*.
- Arnold, M. L., Buckner, C. M., Robinson, J. J. (1991). Pollen mediated introgression and hybrid separation in Louisian irises. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 : 1398-1402.
- Aufaure-Brown, A., Cohen, J., Holden, D. W. (1992). Use of randomly amplified polymorphic DNA markers to distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.*, 30 : 2991-2993.
- Dinesh, K. R., Lim, T. M., Chua, K. L., Chan, W. K., Phang, V. P. E. (1993). RAPD analysis : an efficient method of DNA fingerprinting in fishes. *Zool. Sci.*, 10 : 849-854.
- Hadrys, H., Schierwater, B., Dellaporta, S. L., Desalle, R., Buss, L. W. (1993). Determination of paternity in dragonflies by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Mol. Ecol.*, 2 : 79-87.
- Hu, J., Quiros, C. F. (1991). Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell. Rep.*, 10 : 505-511.
- Jayaro, B. M., Bassam, B. J., Caetano-Anollés, G., Grésshoff, P. M., Oliver, S. P. (1992). Subtyping of *Streptococcus uberis* by DNA amplification fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.*, 30 : 1347-1350.
- Mazurier, S. I., Audrier, A., Marquet-Van-der-Mee, N., Notermans, S., Wernars, K. (1992). A comparative study of randomly amplified polymorphic DNA analysis and conventional phage typing for epidemiological studies of *Listeria monocytogene* isolates. *Res. Microbiol.*, 143, 5 : 507-512.
- Paran, I., Kesseli, R., Michelmore, R. (1991). Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. *Genome*, 34 : 1021-1027.
- Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Velazquez, A., Perucho, M. (1992). Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 : 10065-10069.
- Ronald, P. C., Albano, B., Tabien, R., Abenes, L., Wu, K. S., McCouch, S., Tanksley, S. D. (1992). Genetic and physical analysis of the rice bacterial blight disease resistance locus. *Mol. Genet.*, 236, 1 : 113-120.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, R., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Sci.*, 239 : 487-491.

Welsh, J., McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.*, 18 : 7213-7218.

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 18, 22 : 6531-6535.

## ANNEXE IV

### Mesure des dommages oxydatifs à l'ADN via l'utilisation des enzymes de réparation

L'isolement et la caractérisation chez *Escherichia coli* d'enzymes capables d'inciser l'ADN au niveau des bases oxydées (Pflaum et al, 1997) a permis l'avènement de nouvelles méthodes de mesure des dommages oxydatifs à l'ADN (Jurado et al, 1998). La Fpg, formamidopyrimidine DNA glycosylase, a été particulièrement utilisée. Cette enzyme présente une grande affinité de substrat pour la 8-oxodGuo ainsi que pour les lésions de type formamidopyrimidines telles que la 4, 6-diamino-5-formamidopyrimidine (Fapy-A) et la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (Fapy-G) (Karakaya et al, 1997). Outre une activité N-glycosylase (coupure de la liaison N-glycosydique qui relie la base au ribose), la Fpg présente deux autres activités enzymatiques (Laval et al, 1998) :

- (1) elle excise la base oxydée par coupure de l'ADN au niveau des deux liaisons phosphodiester, situées en 3' et 5' du site abasique (réaction d'élimination  $\beta$ - $\delta$ )
- (2) elle élimine les déoxyriboses phosphates en position 5' (activité dRPase).

L'action de la Fpg sur la 8-oxodGuo conduit ainsi à la formation de sites apuriniques (AP), responsables lorsqu'ils ne sont pas réparés d'une inhibition de la réplication et de cassures de brins de l'ADN (Nakamura et al, 1998).

#### **I. Perspectives d'utilisation de la Fpg :**

Une des limites de la mesure du taux de bases oxydées par les techniques actuelles reste la non connaissance des parties du génome atteintes par ce type de dommages oxydatifs à l'ADN. L'utilisation de la Fpg couplée à la Polymerase Chain Reaction (PCR) pourrait rendre possible l'étude de la formation de ces bases oxydées dans une région génomique donnée. Un tel essai pourrait donc permettre d'illustrer de façon plus concrète la signification biologique que pourraient avoir ces lésions chez un organisme exposé à un stress oxydant.

Exemple : La 8-oxodGuo lorsqu'elle n'est pas réparée entraîne une substitution de paire de bases G/C  $\rightarrow$  A/T (Figure 1). De telles mutations au sein d'un gène primordial pour la reproduction d'un organisme ainsi exposé à des composés pro-oxydants pourraient avoir des conséquences sur sa descendance et donc sur sa population.

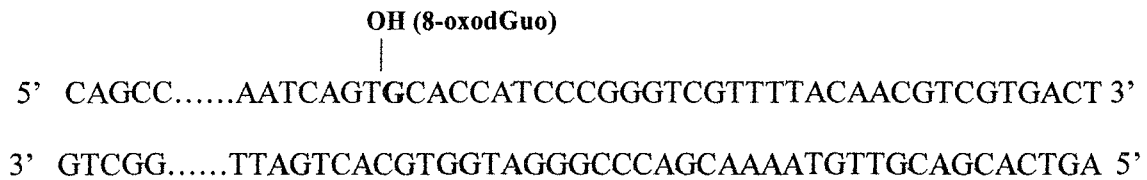
Un protocole de mesure possible, par Fpg/PCR, du taux de 8-oxodGuo dans une région génomique donnée est proposé Figure 2, selon les principes définis Figure 3.

#### **II/ Choix de la séquence à amplifier :**

Le choix de la séquence à amplifier est fonction de deux paramètres :

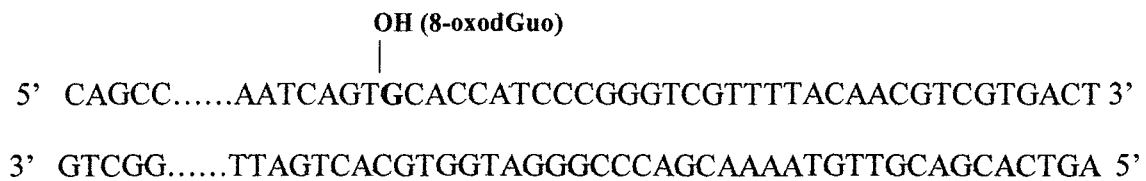
- 1) La séquence amplifiée doit être une partie codante du génome. Une altération de sa séquence nucléotidique doit, en raison des conséquences qu'elle pourrait avoir, être pertinente d'un point de vue écotoxicologique.

Exemple d'ADN double brins présentant la 8-oxodGuo



Amplification par PCR

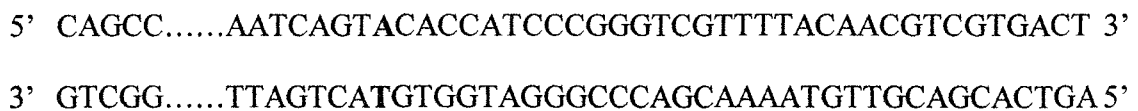
Mauvaise incorporation de l'ADN polymérase au passage de la 8-oxodGuo :  
substitution de paire de bases G/C → A/T.



↓ Amplification

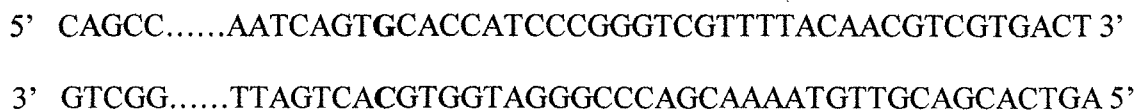
2 produits d'amplification sont obtenus

1) **50%** de :



(en l'absence d'enzyme de réparation, la substitution de paire de base n'est pas réparée, on a une séquence nucléotidique mutée)

2) **50%** de :



(séquence nucléotidique normale)

Figure 1 : Produits d'amplification d'ADN porteur de 8-oxodGuo.

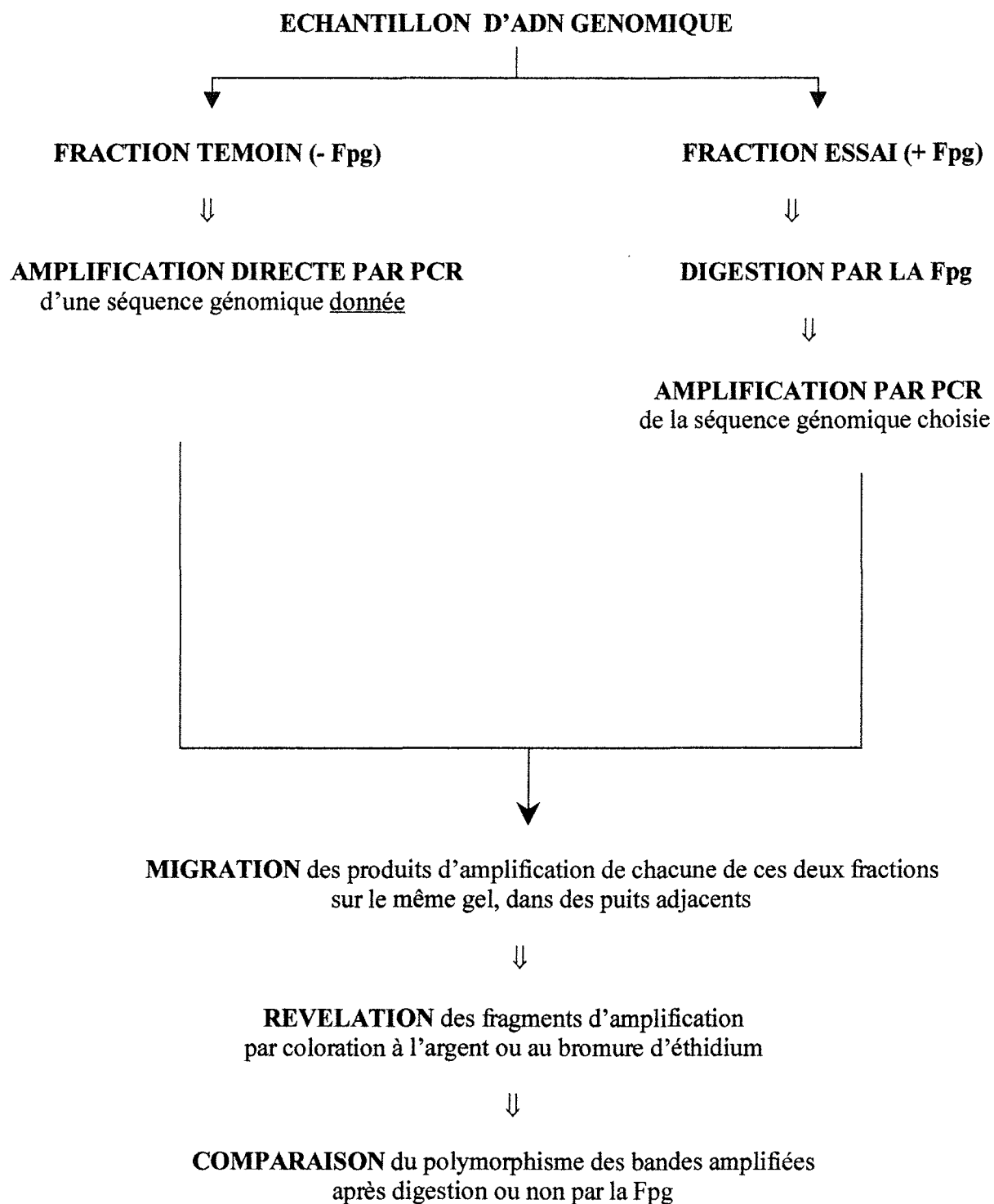


Figure 2 : Protocole de mesure possible par Fpg/PCR du taux de 8-oxodGuo dans une séquence génomique donnée

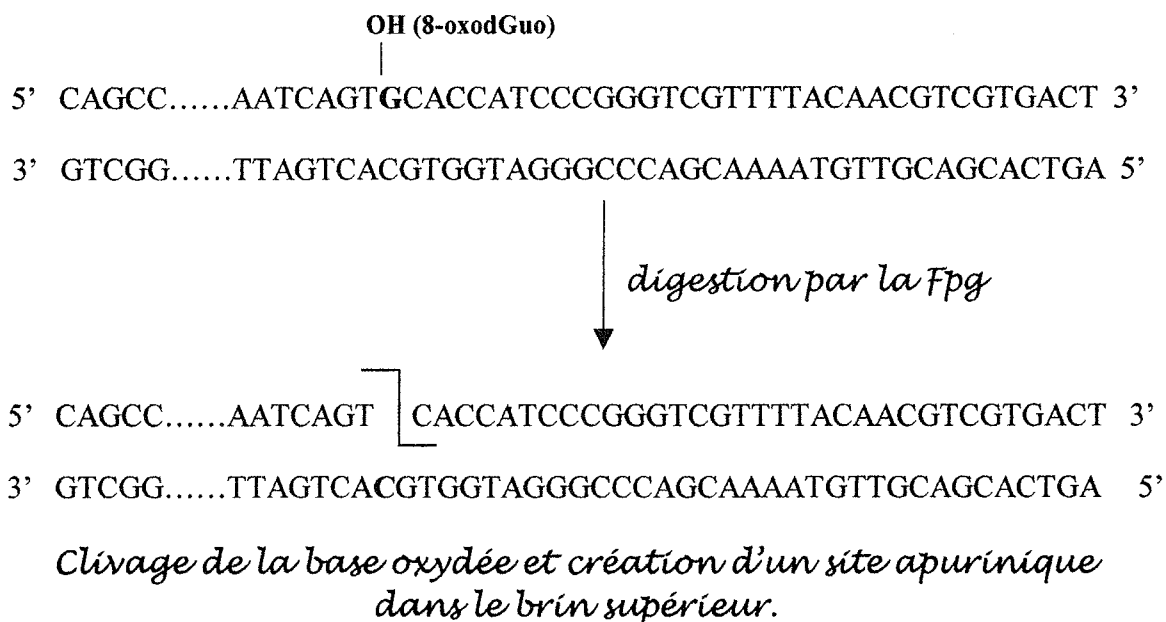


Figure 3 : Détermination du nombre de lésion de type 8-oxodGuo par Fpg/PCR. Lors de l'amplification par PCR, les brins sont dénaturés. A la température d'hybridation, les amorces vont pouvoir se fixer à cette séquence nucléotidique si elles en sont complémentaires. Le brin inférieur pourra être amplifié dans son intégralité. Le brin supérieur, lui, de par la présence d'un site apurinique, pourra engendrer l'amplification de deux séquences nucléotidiques différentes. La présence d'une base oxydée sera donc déterminée par le nombre de bandes d'amplification supplémentaires obtenues par rapport au témoin (ADN amplifié mais non digéré par la Fpg).

2) Le gène amplifié doit avoir une taille minimum. En effet, les taux les plus faibles de 8-oxodGuo que nous avons mesuré par la méthode chaotrope chez des moules issues du milieu naturel sont de l'ordre de :

- 2 lésions/10<sup>5</sup> dGuo dans l'ADN de branchies
- 6 lésions/10<sup>5</sup> dGuo dans l'ADN de glande digestive

En partant du principe que l'ADN de moule est constitué comme l'ADN de mammifères de 22% de guanine, ces taux correspondent respectivement à 8.8 et 26.5 lésions/10<sup>6</sup> paires de base. Pour un fragment de 1000 pb, la probabilité d'avoir une lésion est donc faible : malgré son identification en tant que tissu cible du stress oxydatif chez la moule, la fréquence de 8-oxodGuo à l'ADN de la glande digestive ne serait que de 0.03.

Une telle étude chez la moule ne semble donc réalisable que pour une séquence nucléotidique de grande taille. Chez cet organisme, une lésion est en théorie rencontrée toutes les 30 000 paires de bases. Néanmoins, une meilleure connaissance de l'étendue des dommages oxydatifs qui peuvent être induits chez la moule après exposition à des xénobiotiques pro-oxydants pourrait revoir à la baisse la taille minimale de la séquence étudiée.

Chez les mollusques, un nombre très limité de gènes a fait l'objet d'un séquençage (Teunissen et al, 1992, Heath et al, 1996, James et al, 1996, Freund et al, 1997). La taille de ces gènes étant inférieure à 10 000 pb, l'application d'un tel protocole chez la moule reste malheureusement prématurée en regard aux connaissances actuelles. Néanmoins, le développement de tels essais devraient permettre un gain de spécificité considérable en écotoxicologie.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Freund, J-N., Jost, B., Lorentz, O., Duluc, I. (1997). Identification of homologues of the mammalian intestinal lactase gene in non-mammals (birds and molluscs). *322* : 491-498.
- Heath, D. D., Hatcher, D. R., Hilbish, T. J. (1996). Ecological interaction between sympatric *Mytilus* species on the West coast of Canada investigated using PCR markers. *Mol. Ecol.*, *5* : 443-447.
- James, M. O., Boyle, S. M., Trapido-Rosenthal, H. G., Smith, W. C., Greenberg, R. M., Shiverick, K. T. (1996). cDNA and protein sequence of a major form of P450, CYP2L, in the hepatopancreas of the spiny lobster, *Panulirus argus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, *329*, *1*: 31-38.
- Jurado, J., Saparbaev, M., Matray, T. J., Greenberg, M. M., Laval, J. (1998). The ring fragmentation product of thymidine C5-hydrate when present in DNA is repaired by the *Escherichia coli* Fpg and Nth proteins. *Biochem.*, *37* : 7757-7763.
- Karakaya, A., Jaruga, P., Bohr, V. A., Grollman, A. P., Dizdaroglu, M. (1997). Kinetics of excision of purine lesions from DNA by *Escherichia coli* Fpg protein. *Nucl. Acids. Res.*, *25*, *3* : 474-479.
- Laval, J., Jurado, J., Saparbaev, M., Sidorkina, O. (1998). Antimutagenic role of base-excision repair enzymes upon free radical-induced DNA damage. *Mutat. Res.*, *402* : 93-102.
- Nakamura, J., Walker, V. E., Upton, P. B., Chiang, S. Y., Kow, Y. W., Swenberg, J. A. (1998). Highly sensitive apurinic/apyrimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions. *Cancer Res.*, *58*, *2* : 222-225.
- Pflaum, M., Will, O., Epe, B. (1997). Determination of steady state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogen.*, *18*, *11*: 2225-2231.
- Teunissen, Y., Geraerts, W. P. M., Van Heerikhuizen, H., Planta, R. J., Joosse, J. (1992). Molecular cloning of a cDNA encoding a member of a novel cytochrome P450 family in the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *J. Biochem.*, *112* : 249-252.



## Résumé

Dans le cadre du développement de biomarqueurs de génotoxicité pour les études de biosurveillance de l'environnement marin, la formation d'adduits et de bases oxydées de l'ADN a été étudiée pour l'espèce sentinelle, *Mytilus sp.*, dans le cas d'une exposition, par la voie trophique, au Benzo[a]pyrène (B[a]P). Les adduits à l'ADN et la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (8-oxodGuo) ont été respectivement mesurés par post-marquage au  $^{32}\text{P}$  et chromatographie liquide haute performance couplée à la détection électrochimique.

Le modèle d'exposition développé au cours de cette thèse a été validé pour la réalisation d'études toxicologiques chez *Mytilus sp.* La biodisponibilité du B[a]P pour les organismes exposés et sa biotransformation ont permis l'observation de variations dans l'activité de la majorité des biomarqueurs enzymatiques d'exposition mesurés. L'exposition a également permis l'expression des effets génotoxiques du B[a]P chez la moule.

Dans les branchies et la glande digestive, l'observation de corrélations entre le niveau d'adduits totaux à l'ADN et le temps d'exposition et la concentration en B[a]P de la moule entière est favorable à la proposition des adduits à l'ADN comme biomarqueurs de génotoxicité des HAP. Chez cet invertébré marin, Les branchies sont apparues comme un tissu cible de la formation d'adduits à l'ADN. Sur le terrain, la mesure des adduits à l'ADN a permis une discrimination des sites d'échantillonnage en fonction de leur degré de contamination présumé aux substances génotoxiques du milieu.

La 8-oxodGuo est apparue comme un biomarqueur potentiel de génotoxicité uniquement dans la glande digestive, tissu cible du stress oxydatif chez la moule. Sur le terrain, l'observation de corrélations entre le niveau de cette base oxydée et les biomarqueurs du stress oxydatif est favorable à la poursuite d'investigations supplémentaires chez la moule.

*Mots-clés : moule, B[a]P, adduits, 8-oxodGuo, biomarqueurs*

## Summary

In the aim to develop biomarkers of genotoxicity for the biomonitoring of the marine environment, the formation of DNA adducts and oxidized DNA bases was studied for the sentinel organism, *Mytilus sp.*, following exposure to B[a]P via the trophic supply. DNA adducts and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (8-oxodGuo) were respectively measured by  $^{32}\text{P}$  post-labeling technique and high performance liquid chromatography coupled to electrochemical detection.

The developed model of exposure was validated for the realisation of toxicological studies in *Mytilus sp.* The bioavailability of B[a]P for the exposed organisms and its biotransformation resulted in variations in most of the measured enzymatic biomarkers of exposure. Such an exposure allowed the expression of B[a]P genotoxic effects in mussels.

In mussel gills and digestive gland, the observation of correlations between total DNA adduct level and both exposure time and B[a]P concentration in whole mussel tissues was in favour of the proposal of DNA adducts as biomarkers of PAH genotoxicity. For the studied marine invertebrate, gills appeared as a target tissue for DNA adduct formation. In the field, DNA adduct measurement allowed the discrimination of the different sampling sites in accordance to their presumed level of contamination to genotoxic compounds.

8-oxodGuo appeared as a potential biomarker of genotoxicity only in the digestive gland, identified as a target tissue of oxidative stress in the mussel. In the field, observation of correlations between 8-oxodGuo level and response of the measured biomarkers of the oxidative stress was in favour of further investigations.

*Key-words: mussel, B[a]P, adducts, 8-oxodGuo, biomarkers*