



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

6 101080.

S

t

THESE

présentée devant l'Université de Metz

en vue de l'obtention du

Diplôme de Doctorat

Spécialité : Toxicologie de l'Environnement

par Marie-Odile FOUCHÉCOURT

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv	19960425
Cote	S/M3 96/21
Loc	Magasin

**Bioévaluation de la contamination organique
des sols : recherche de biomarqueurs chez
des rats sentinelles et mise au point d'un
bioessai avec le rat de laboratoire**

Thèse soutenue le 25 septembre 1996

Jury

- Président** : Melle Paule Vasseur, Professeur à l'Université de Metz
- Rapporteurs** : M. Benoît Rether, Professeur à l'Université de Strasbourg
M. Jean-Claude Lhuguenot, Professeur à l'ENSBANA, Dijon
- Examineurs** : M. Charles Descoins, Chef du Département de Phytopharmacie et
Ecotoxicologie, INRA
M. Jean-Louis Rivière, Directeur de Recherche, INRA
M. Denis Savanne, Service Recherche Impact et Milieux, Ademe, Paris

Je tiens à remercier l'ADEME pour la bourse d'études quelle m'a offerte et pour le sérieux avec lequel les Doctorants boursiers sont suivis.

J'exprime ma gratitude aux Professeurs Benoît Rether et Jean-Claude Lhuguenot qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail et à Melle Vasseur, M. Descoins, M. Savanne et M. Rivière, qui m'ont fait l'honneur d'être membres du jury.

Je remercie tout particulièrement M. Jean-Louis Rivière pour avoir bien voulu diriger ce travail, pour ses précieux conseils de rédaction et pour sa gentillesse, et l'INRA qui a accepté de m'accueillir au sein de l'Unité associée de Toxicologie Métabolique et d'Ecotoxicologie, à l'Ecole Vétérinaire de Lyon.

Une partie de ce travail n'aurait pas vu le jour sans la collaboration du Professeur Benoît Rether et de Marc. Qu'ils soient assurés de ma profonde reconnaissance pour leur extrême gentillesse et pour leur aide.

Je tiens également à remercier Philippe Berny pour son importante collaboration et pour sa sympathie.

Je remercie aussi M. Denis Savanne pour m'avoir permis de rejoindre le programme national de recherches concertées en écotoxicologie.

Je tiens à saluer et à remercier Michelle Mazallon pour son aide, sa bonne humeur et son amitié.

Comment ne pas remercier les reines de la documentation, Annie Rivière et Nicole Letourneau, qui m'ont énormément simplifié la tâche bibliographique. Je les remercie de leur disponibilité, de leur patience et de leur bonne humeur.

Je tiens également à saluer et remercier les secrétaires du service Monique Gaulin, Corinne Montagny et Brigitte Gerboud pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Mes remerciements s'adressent aussi à tout le personnel du laboratoire pour les bons moments que nous avons passés ensemble, à Annie Bourret pour son aide précieuse lors de certains prélèvements et à tous ceux qui m'ont aidée et que je n'ai pas cités.

Toute ma gratitude va à Maryline (CSE) qui m'a grandement facilité les tâches administratives, pour sa bonne humeur et sa disponibilité

Je remercie le Professeur Pallardy et Rémi (Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry), le Professeur Marie Favrot et le Dr. Combarec (Centre Léon Bérard) qui m'ont aidée dans mes investigations immunologiques, ainsi que Mme Cottin (Ecole Vétérinaire) pour son aide en histologie.

Je ne remercierai jamais assez mes parents qui m'ont toujours soutenue et sans qui cette thèse n'existerait peut-être pas et ma famille résidant dans la région lyonnaise qui a toujours fait preuve d'une générosité et d'une gentillesse qui m'ont beaucoup touchée.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	13
RÉSUMÉ	15
ABSTRACT	16
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	17
INTRODUCTION	18

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE **20**

I. Les polluants environnementaux	21
I.1. Sources, propriétés physico-chimiques et niveaux de pollution	21
I.1.1. Les polychlorobiphényles	21
I.1.2. Les chlorodioxines et les chlorodibenzofurannes	23
I.1.3. Les hydrocarbures	24
I.1.4. Les métaux	25
I.2. Devenir des polluants dans l'environnement	26
I.3. Niveaux de contamination et effets biologiques de la pollution environnementale	27
I.3.1. Sur la faune terrestre	27
I.3.1.1. Exposition des mammifères aux polluants organiques....	27
I.3.1.2. Exposition des mammifères aux métaux.....	29
I.3.2. Sur l'homme	30
I.3.2.1. Exposition aux polluants organiques.....	30
I.3.2.4. Exposition aux métaux lourds.....	33
I.4. Les sites pollués en France : réglementations et état des lieux	33
I.4.1. Aspect juridique	33
I.4.2. Recensement des sites pollués.....	34
I.5. Aperçu de la situation en Europe	37
II. Les mécanismes de défense contre les agressions chimiques ou biologiques	38
II.1. Les systèmes de détoxification	38
II.1.1. Le cytochrome P-450.....	39
II.1.1.1. Phylogénèse	39
II.1.1.2. Nomenclature.....	40
II.1.1.3. Structure.....	40
II.1.1.4. Propriétés spectrales.....	40
II.1.1.5. Spécificité de substrat.....	41

II.1.2. Le système multienzymatique à cytochrome P-450.....	41
II.1.2.1. Topologie membranaire.....	41
II.1.2.2. Cycle catalytique.....	41
II.1.2.3. Réactions catalysées par les cytochromes P-450.....	42
II.1.2.4. Régulation.....	42
II.1.2.5. Techniques de localisation et de quantification des différents isoenzymes de cytochrome P-450.....	42
II.1.3. Induction par les xénobiotiques.....	43
II.1.3.1. Les inducteurs type 3-méthylcholanthrène.....	44
II.1.3.2. Les inducteurs type phénobarbital.....	45
II.1.3.3. Les inducteurs type éthanol.....	46
II.1.3.4. Les inducteurs type prégnénone 16 α -carbonitrile.....	47
II.1.3.5. Les inducteurs de la prolifération des peroxysomes.....	47
II.1.4. Conséquences toxicologiques de l'induction.....	48
II.1.4.1. Cellules cibles des métabolites réactifs.....	48
II.1.4.2. Cytochromes P-450 impliqués dans la production de métabolites réactifs.....	48
II.1.4.3. Activation métabolique des PCB.....	49
II.1.4.4. Activation métabolique des HAP.....	50
II.1.4.5. Mécanismes de cancérogenèse.....	50
II.1.4.6. Pouvoir carcinogène des HAP.....	51
II.1.5. Inhibition des activités cytochrome P-450 dépendantes.....	52
II.1.6. Les activités cytochrome P-450 extrahépatiques.....	53
II.2. Les systèmes de défense contre le stress oxydant.....	54
II.2.1. Les espèces oxygénées réactives.....	54
II.2.2. Formation des entités oxygénées réactives et des radicaux libres.....	55
II.2.2.1. Intervention des cytochromes P-450.....	55
II.2.2.2. Autres sources.....	56
II.2.3. Effets toxiques.....	57
II.2.4. Le système de défense.....	58
II.2.4.1. Composés piègeurs de radicaux libres.....	58
II.2.4.2. Activités enzymatiques.....	58
II.3. Les systèmes de défense contre la toxicité des métaux.....	59
II.3.1. Métabolisme et stockage des métaux.....	59
II.3.2. Interactions avec les autres systèmes de défense.....	60
II.4. Le système immunitaire.....	60
II.4.1. Le système immunitaire des mammifères.....	61
II.4.1.1. Origine des cellules de l'immunité et organes lymphoïdes.....	61
II.4.1.2. L'immunité non spécifique.....	62
II.4.1.3. L'immunité spécifique.....	63
II.4.1.4. Régulation de la réponse immunitaire.....	64
II.4.2. Le système immunitaire en action.....	65
II.4.3. Le système immunitaire : cible de produits toxiques.....	67
II.4.3.1. Intérêt en toxicologie de l'environnement.....	67
II.4.3.2. Immunotoxicité des HAP et des HAPH.....	68
II.4.3.3. Immunotoxicité des métaux lourds.....	70
II.4.4. Stratégies et méthodes d'études en immunotoxicologie.....	71
II.4.4.1. Stratégies de détection d'effets immunotoxiques.....	71
II.4.4.2. Tests recommandés par le NTP.....	73

III. Surveillance biologique de l'environnement : animaux sentinelles, biomarqueurs et bioessais.....	77
III.1. Les systèmes d'animaux sentinelles.....	78
III.1.1. Définitions.....	78
III.1.2. Critères de sélection d'une espèce appropriée.....	78
III.1.3. Avantages et limites des dispositifs d'animaux sentinelles.....	79
III.1.4. Quelques exemples.....	80
III.1.5. Le surmulot, animal sentinelle de la pollution des sols.....	81
III.2. Les biomarqueurs.....	81
III.2.1. Définitions.....	81
III.2.2. Intérêt des biomarqueurs.....	82
III.2.3. Exemples de biomarqueurs utilisés dans l'étude de pollutions environnementales.....	82
III.2.3.1. Biomarqueurs d'exposition.....	83
III.2.3.2. Biomarqueurs d'effets.....	85
III.3. Intérêt des bioessais dans l'étude de sites pollués : méthodologies et orientations actuelles.....	86
III.3.1. Intérêt des bioessais dans l'évaluation du danger et du risque d'un sol pollué.....	87
III.3.2. Exemples de bioessais.....	89
III.3.2.1. Toxicité des extraits aqueux.....	90
III.3.2.2. Tests sur plantes.....	90
III.3.2.3. Tests sur espèces animales et peuplements.....	90
III.3.2.4. Tests de génotoxicité.....	91
III.3.2.5. Evaluation de l'efficacité des traitements de remédiation.....	92

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE..... 93

MATÉRIELS ET MÉTHODES..... 96

I. Caractéristiques du site et des sols étudiés 96

I.1. Le site pollué de Replonges.....96

I.1.1. Historique.....96

I.1.2. Géographie et géologie du site.....96

I.1.3. Analyses de terrain.....96

I.1.4. Prélèvements d'échantillons de sol pour les bioessais.....97

I.1.5. Analyse des échantillons prélevés.....97

I.2. Les sols fournis par l'IRH.....99

II. Etude du site pollué de Replonges..... 100

II.1. Etude *in situ* 100

II.1.1. Capture de surmulots sur le site.....100

II.1.2. Capture de surmulots élevés en semi-liberté.....100

II.1.3. Rats de laboratoire.....101

II.2. Mise au point d'un protocole d'exposition en laboratoire.....101

II.2.1. Élevage de surmulots au laboratoire.....101

II.2.2. Exposition des rats à différents types de litières.....101

 II.2.2.1. Exposition à des litières non polluées.....101

II.2.2.2. Exposition à des litières de sol provenant du site de Replonges.....	102
II.3. Recherche d'adduits à l'ADN et d'altérations du système immunitaire chez des rats exposés au sol Repl.III au laboratoire.....	103
II.3.1. Recherche d'adduits à l'ADN.....	103
II.3.2. Recherche d'altérations du système immunitaire.....	103
III. Exposition de rats de laboratoire à divers sols pollués.....	104
III.1. Mesure d'activités enzymatiques, relations dose-réponse et mesure de doses internes chez des rats exposés à différents sols.....	104
III.1.1. Exposition aux sols artificiellement contaminés.....	104
III.1.2. Exposition aux sols SIII et SIV dilués avec le sol ISO.....	104
III.1.3. Exposition aux sols SIII et SIV dilués avec d'autres matrices...	104
III.1.3.1. Influence de la matière organique sur la biodisponibilité des polluants.....	104
III.1.3.2. Dilution du sol SIV avec du sable.....	105
III.2. Recherche d'adduits à l'ADN chez des rats exposés au sol SIV.....	105
III.3. Exposition de rats aux sols SIII et SIV sans contact direct.....	106
IV. Sacrifice des animaux et préparation des fractions subcellulaires.....	106
IV.1. Anesthésie et sacrifice.....	106
IV.2. Préparation des organes et tissus destinés à la mesure d'activités enzymatiques et au dosage de PCB ou de métaux.....	106
IV.2.1. Matériels et réactifs.....	107
IV.2.2. Le foie.....	107
IV.2.3. Le poumon.....	107
IV.2.4. Le sang.....	107
IV.3. Traitement des organes destinés à la recherche d'adduits à l'ADN... 	107
IV.3.1. Matériels et réactifs.....	108
IV.3.2. Le foie.....	108
IV.3.3. Le poumon.....	108
V. Mesure des biomarqueurs.....	109
V.1. Activités cytochrome P-450 dépendantes.....	109
V.1.1. Activités alkoxyrésorufine O-désalkylases.....	109
V.1.2. Activité 4-nitrophénol hydroxylase.....	110
V.1.3. Dosage du cytochrome P-450 total.....	110
V.2. Activités enzymatiques de défense contre le stress oxydant.....	111
V.2.1. Catalase.....	111
V.2.2. Glutathion peroxydases.....	111
V.2.3. Superoxyde dismutase.....	112
V.3. Dosage des protéines et de l'hémoglobine.....	113
V.4. Recherche d'adduits à l'ADN hépatique et pulmonaire.....	113
V.4.1. Extraction et purification de l'ADN.....	114
V.4.2. Hydrolyse de l'ADN et enrichissement par la nucléase P1.....	114
V.4.3. Marquage au γ [³² P]-ATP.....	114
V.4.4. Séparation des adduits par chromatographie bidimensionnelle...	114
V.5. Recherche d'altérations du système immunitaire.....	115
V.5.1. Réponse anticorps primaire : immunisation par la KLH.....	115
V.5.1.1. Immunisation des rats.....	116

V.5.1.2. Prélèvement du sang.....	116
V.5.1.3. Dosage des IgM anti-KLH.....	116
V.5.2. Altération thymique et activité NK des splénocytes.....	117
V.5.2.1. Réponse cellulaire au niveau du thymus	117
V.5.2.2. Mesure de l'activité NK.....	117
V.6. Dosage des polychlorobiphényles.....	118
V.6.1. Extraction.....	118
V.6.2. Purifications.....	118
V.6.3. Chromatographie en phase gazeuse.....	118
V.6.4. Expression des résultats.....	119
V.7. Dosage des métaux lourds.....	119
VI. Traitements statistiques.....	120
RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	121
I. Mesure de biomarqueurs enzymatiques chez des surmulots capturés sur le site de Replonges.....	121
I.1. Résultats.....	121
I.1.1. Activités monooxygénases et teneurs en cytochrome P-450.....	121
I.1.1.1. Activités monooxygénases.....	121
I.1.1.2. Teneurs en cytochrome P-450 total.....	122
I.1.2. Activités des enzymes de défense contre le stress oxydant	122
I.2. Discussion.....	123
II. Mesure de biomarqueurs enzymatiques chez des rats exposés à différentes litières de sols	125
II.1. Exposition à des sols non contaminés : activités monooxygénases.....	125
II.1.1. Résultats.....	125
II.1.2. Discussion.....	126
II.2. Exposition au sol pollué Repl.III : activités monooxygénases et activités antioxydantes.....	126
II.2.1. Résultats.....	126
II.2.1.2. Comparaison des activités monooxygénases des rats de laboratoire et des rats d'origine sauvage	128
II.2.1.3. Activités monooxygénases : mise en évidence d'une relation dose-réponse	128
II.2.2. Discussion.....	130
II.3. Exposition au sol pollué SIII : activités monooxygénases.....	132
II.3.1. Résultats.....	132
II.3.1.1. Mise en évidence d'une relation dose-réponse.....	132
II.3.1.2. Influence de la matière organique sur la biodisponibilité des polluants inducteurs	135
II.3.2. Discussion.....	136
II.4. Exposition au sol pollué SIV : activités monooxygénases.....	137
II.4.1. Résultats.....	137
II.4.1.1. Mise en évidence d'une relation dose-réponse.....	137
II.4.1.2. Influence de la matière organique sur la biodisponibilité des polluants inducteurs	140
II.4.2. Discussion.....	142

II.5. Exposition à des sols artificiellement contaminés : activités monooxygénases	143
II.5.1. Résultats	143
II.5.2. Discussion	144
II.6. Exposition aux sol SIII et SIV par inhalation : activités monooxygénases	145
II.6.1. Résultats	145
II.6.2. Discussion	145
III. Recherche d'adduits à l'ADN hépatique et pulmonaire chez des rats exposés à différentes litières de sol pollué	146
III.1. Résultats	146
III.1.1. Rats exposés au sol Repl.III	146
III.1.1.1. Détection d'adduits dans le foie	146
III.1.1.2. Détection d'adduits dans le poumon	147
III.1.2. Rats exposés au sol SIV	148
III.1.2.1. Détection d'adduits dans le foie	148
III.1.2.2. Détection d'adduits dans le poumon	149
III.2. Discussion	151
IV. Recherche d'altérations du système immunitaire chez des rats exposés au sol Repl.III	154
IV.1. Résultats	154
IV.1.1. Topographie du thymus	154
IV.1.2. Activité NK	154
IV.1.3. Réponse primaire anti-KLH	154
IV.2. Discussion	155
V. Mesure de doses internes chez des rats exposés à différentes litières de sol	156
V.1. Teneurs en PCB dans le foie et le poumon de rats exposés au sol SIII	156
V.1.1. Résultats	156
V.1.1.1. Teneurs en PCB dans le foie	156
V.1.1.2. Teneurs en PCB dans le poumon	158
V.1.2. Discussion	158
V.2. Teneurs en métaux dans le foie de rats exposés aux sols SI, SIII ou SIV	160
V.2.1. Résultats	160
V.2.2. Discussion	161
CONCLUSION	162
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	164
Annexe I	193
Annexe II	194
Annexe III	199

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1 : Structure moléculaire et numérotation des positions des substituants des polychlorodibenzo- <i>p</i> -dioxines (PCDD), polychlorodibenzofurannes (PCDF) et polychlorobiphényles (PCB).	21-22
Figure 2 : Illustration schématique des propriétés physico-chimiques et biochimiques des composés organochlorés.	21-22
Figure 3 : Cycle et transport des PCB dans l'environnement.	22-23
Figure 4 : Structure chimique de quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques.	24-25
Figure 5 : Rôle de l'environnement dans le devenir et le comportement des polluants.	25-26
Figure 6 : Voies majeures d'exposition de l'homme aux polluants présents dans le sol.	29-30
Figure 7 : Voies d'absorption, de transport et d'excrétion des toxiques chez les espèces animales.	37-38
Figure 8 : Réactions de biotransformation de phase I.	38-39
Figure 9 : Représentation schématique du développement du cytochrome P-450 au cours de l'évolution.	39-40
Figure 10 : Structure des inducteurs de type "3-méthylcholanthrène".	40-41
Figure 11 : Cycle catalytique du cytochrome P-450.	41-42
Figure 12 : Induction des gènes <i>CYP1A1</i> et <i>CYP1A2</i> par le récepteur <i>Ah</i> dans une cellule de mammifère.	43-44
Figure 13 : Conséquences bénéfiques ou néfastes de l'induction du cytochrome P-450A1 : importance des activités de phase II et du mode d'exposition.	47-48
Figure 14 : Activation des PCB faiblement chlorés <i>via</i> des intermédiaires semi-quinoniques et des quinones.	48-49
Figure 15 : Activation métabolique du B(a)P et réaction catalysée par la dihydrodiol déshydrogénase.	48-49
Figure 16 : Métabolisme du B(a)P par le cytochrome P-450 et l'époxyde hydrolase microsomaux.	49-50

Figure 17 : Métabolisme stéréosélectif du B(a)P en un ultime métabolite carcinogène par les microsomes de foie de rat.	49-50
Figure 18 : Région “baie” des diol-époxydes de plusieurs HAP.	50-51
Figure 19 : Rôle des systèmes de détoxification et de défense antioxydante dans la protection contre la toxicité des produits chimiques.	53-54
Figure 20 : Cycle rédox d’un composé quinonique par une réductase, par exemple une NADPH-cytochrome P-450 réductase.	54-55
Figure 21 : La peroxydation lipidique et les différentes étapes d’une réaction en chaîne.	56-57
Figure 22 : Rôle du glutathion dans le système de défense antioxydante et le système de détoxification.	57-58
Figure 23 : Origine des cellules du système immunitaire.	60-61
Figure 24 : Principaux organes et tissus lymphoïdes.	60-61
Figure 25 : Rôle central des macrophages.	61-62
Figure 26 : Coopération cellulaire dans la réponse anticorps.	62-63
Figure 27 : Les voies de l’immunité à médiation cellulaire.	62-63
Figure 28 : Les réponses anticorps primaire et secondaire.	63-64
Figure 29 : Modèle décrivant les conséquences immunologiques défavorables de l’exposition à un produit toxique.	66-67
Figure 30 : Mécanismes possibles de l’immunosuppression induite par les HAP.	67-68
Figure 31 : Concordance des tests immunologiques individuels ou appariés pour la prédiction d’effets immunotoxiques.	74-75
Figure 32 : Concordance des tests immunologiques individuels ou appariés pour établir la prédiction de modifications de la résistance de l’hôte.	74-75
Figure 33 : Diagramme simplifié de la cascade d’événements compris entre l’exposition et les effets sur la santé, montrant les relations existant entre les marqueurs d’exposition, les marqueurs d’effets et les marqueurs de susceptibilité.	80-81
Figure 34 : Stratégie d’étude du site pollué de Replonges.	93-94

Figure 35 : Représentation schématique du protocole d'exposition de rats à des litières de sol pollué.	100-101
Figure 36 : Principe du postmarquage au γ[³²P]-ATP.	113-114
Figure 37 : Principe d'un dosage ELISA.	115-116
Figure 38 : Activités EROD, PROD, BROD et 4-NP hydroxylase hépatiques (A) et pulmonaires (B) mesurées chez des rats de laboratoire et des rats sauvages capturés dans un terrarium ou sur le site pollué de Replonges.	120-121
Figure 39 : Activités catalase, superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase (GSH-Px) et glutathion peroxydase Se-dépendante (Se-GSH-Px) hépatiques (A), pulmonaires (B) et érythrocytaires (C) mesurées chez des rats de laboratoire et des rats sauvages capturés dans un terrarium ou sur le site pollué de Replonges.	121-122
Figure 40 : Activités EROD (A), PROD (B) et BROD (C) hépatiques mesurées sur les fractions microsomales de rats de laboratoire ou de rats sauvages mâles en fonction de la durée de leur exposition à une litière composée de sciure ou de différents sols prélevés à Replonges.	125-26
Figure 41 : Activités EROD (A), PROD (B) et BROD (C) pulmonaires mesurées sur les fractions microsomales de rats de laboratoire ou de rats sauvages mâles en fonction de la durée de leur exposition à une litière composée de sciure ou de différents sols prélevés à Replonges.	126-127
Figure 42 : Activités EROD, PROD et BROD hépatiques (A) et pulmonaires (B) mesurées sur les fractions microsomales de rats de laboratoire ou de rats sauvages femelles après trois jours d'exposition à une litière composée de sciure, de sol témoin ou de sol Repl.III.	126-127
Figure 43 : Activités catalase, superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase (GSH-Px) et glutathion peroxydase Se-dépendante (Se-GSH-Px) hépatiques (A), pulmonaires (B) et érythrocytaires (C) mesurées chez des rats de laboratoire mâles en fonction de la durée de leur exposition à une litière composée de sciure, de sol témoin ou de sol Repl.III.	126-127
Figure 44 : Corrélations entre le logarithme des activités EROD (A), PROD (B) et BROD (C) hépatiques et EROD pulmonaire (D) et le logarithme du pourcentage de sol pollué Repl.III présent dans la litière de sol ISO.	129-130
Figure 45 : Corrélations entre le logarithme des activités EROD (A), PROD (B) et BROD (C) hépatiques et le logarithme du pourcentage de sol pollué SIII présent dans la litière de sol ISO.	131-132

Figure 46 : Corrélations entre le logarithme des activités EROD (A), PROD (B) et BROD (C) pulmonaires et le logarithme du pourcentage de sol pollué SIII présent dans la litière de sol ISO.	132-133
Figure 47 : Corrélations entre le logarithme des activités EROD (A), PROD (B) et BROD (C) hépatiques et le logarithme du pourcentage de sol pollué SIV présent dans la litière de sol ISO.	137-138
Figure 48 : Corrélations entre le logarithme des activités EROD (A), PROD (B) et BROD (C) pulmonaires et le logarithme du pourcentage de sol pollué SIV présent dans la litière de sol ISO.	138-139
Figure 49 : Corrélations entre le logarithme des activités EROD (A), PROD (B) et BROD (C) hépatiques et le logarithme du pourcentage de sol pollué SIV présent dans la litière de sable.	139-140
Figure 50 : Corrélations entre le logarithme des activités EROD (A), PROD (B) et BROD (C) pulmonaires et le logarithme du pourcentage de sol pollué SIV présent dans la litière de sable.	139-140
Figure 51 : Autoradiogramme des adduits obtenus à partir de l'ADN de foie (A et B) et de poumon (C et C) de rats de laboratoire SD mâles exposés pendant 88 ± 2 h au sol témoin ISO (A et C) ou au sol pollué Repl.III (B et D). Les autoradiogrammes ont été exposés pendant 24 heures.	146-147
Figure 52 : Autoradiogramme des adduits obtenus à partir de l'ADN de foie (de rats de laboratoire SD mâles exposés pendant 88 ± 2 h à la matrice témoin sable (A), au sol pollué SIV (B) ou au sol SIV dilué 1/2 avec du sable (C). Les autoradiogrammes ont été exposés pendant 24 heures.	147-148
Figure 53 : Autoradiogramme des adduits obtenus à partir de l'ADN de poumon de rats de laboratoire SD mâles exposés pendant 88 ± 2 h à la matrice témoin sable (A), au sol pollué SIV (B), au sol SIV dilué 1/2 (C) ou au sol SIV dilué au 1/4 avec du sable (D). Les autoradiogrammes ont été exposés pendant 24 heures.	147-148
Figure 54 : Titre d'IgM anti-KLH dans les sérums de rats exposés à une litière de sciure ou de sol Repl.III pendant deux semaines, puis immunisés par une injection i.p. de KLH, à raison de 50, 100 ou 200 $\mu\text{g}/\text{rat}$ (doses A, B et C, respectivement).	154-155
Figure 55 : Corrélations entre le total des 12 congénères de PCB mesurés dans le foie (A) et le poumon (B) et le pourcentage de sol SIII dans la litière de sol ISO.	157-158

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

: n° IUPAC
3-MC : 3-méthylcholanthrène
ADN : acide désoxyribonucléique
Ag : antigène
Ah : (récepteur) "Aryl hydrocarbon"
AHH : (activité) "Aryl Hydrocarbon Hydroxylase"
ARN(m) : acide ribonucléique (messenger)
ATSD : Agency for Toxic Substances and Disease
B(a)P : benzo(a)pyrène
B(b)F : benzo(b)fluoranthène
B(e)P : benzo(e)pyrène
BROD : (activité) benzoxyrésorufine *O*-débenzylase
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
ConA : concanavaline A (lectine mitogène)
CPA : cellule présentant l'antigène
CTL : (test de) lyse par les lymphocytes T cytotoxiques
CYP(1A1) : cytochrome P-450 (isozyme 1A1)
CYP(1A1) : gène codant pour le cytochrome P-450 (isozyme 1A1)
DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane
DE50 : dose effectrice 50
DHR : (réaction d')hypersensibilité retardée
DIS : déchets industriels spéciaux
DL50 : dose létale 50
dNp : désoxynucléotide 3'-monophosphate
EDTA : acide diéthylène triamine tétraacétique
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EPA : Environmental Protection Agency
EROD : (activité) éthoxyrésorufine *O*-déséthylase
GSH : glutathion (réduit)
GSH-Px : (activité) glutathion peroxydase
HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique
HAPH : hydrocarbure aromatique polycyclique halogéné
Hb : hémoglobine
heptaCB : heptachlorobiphényle
hexaCB : hexachlorobiphényle
HS : hypersensibilité
i.p. : (injection) intrapéritonéale
IARC : International Agency for Research on Cancer
Ig : immunoglobuline

IL : interleukine
K : (cellule) Killer
KLH : Keyhole from Limpet Hemocyanin
LPS : lipopolysaccharide (bactérien)
MAI : maladie auto-immune
MLR : Mixed Lymphocyte Reaction
NAD(H) : nicotinamide adénine dinucléotide (réduit)
NADP(H) : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (réduit)
NIPHEP : National Institute of Public Health and Environmental Protection
NK : (cellules) Natural Killer
NMDA : *N*-nitrosodiméthylamine
NOEL : No Observed Effect Level
Nt : nucléotide
NTP : National Toxicology Programm
PB : phénobarbital
PCB : polychlorobiphényle
PCDD : polychlorodibenzo-*p*-dioxine
PCDF : polychlorodibenzofuranne
PCN : prégnénolone 16 α -carbonitrile
pentaCB : pentachlorobiphényle
PFC : Plage Forming Cells (cellules formant une plage de lyse)
PHA : phytohémagglutinine (lectine mitogène)
PROD : (activité) pentoxyrésorufine *O*-dépenhtylase
SDS : sodium dodécyl sulfate
Se-GSH-Px : (activité) glutathion peroxydase séléno-dépendante
SOD : (activité) superoxyde dismutase
SRBC : Sheep Red Blood Cell (globule rouge de mouton)
STEP : (boue de) STation d'EPuration
Tc : (lymphocyte) T cytotoxique
TCE : trichloroéthylène
TEQ : équivalent toxique international
tétraCB : tétrachlorobiphényle
Th : (lymphocyte) T helper
triCB : (tri-)chlorobiphényle
XRE : Xenobiotic Responsive Element

RÉSUMÉ

L'étude bibliographique présente a) les caractéristiques et l'ampleur de la pollution environnementale par les produits chimiques ainsi que le niveau de contamination et les effets néfastes qui en résultent pour l'homme et la faune terrestre, b) l'ensemble des mécanismes de défense des organismes contre ces agressions chimiques, pouvant être utilisés comme biomarqueurs d'exposition ou d'effets et c) l'intérêt des systèmes d'animaux sentinelles et des bioessais dans la bioévaluation des sols pollués.

Dans la partie expérimentale de ce travail, nous avons étudié la biodisponibilité de polluants organiques (inducteurs des cytochromes P-450 1A1 et 2B) par la mesure des activités éthoxy-, pentoxy et benzoxy- résorufine *O*-désalkylases (respectivement, EROD, PROD et BROD) dans les fractions microsomales hépatiques et pulmonaires de surmulots (*Rattus norvegicus*) capturés sur le site pollué de Replonges. Les résultats montrent l'induction attendue de l'activité EROD hépatique, mais aussi une forte induction de l'activité EROD pulmonaire.

Dans cette approche déjà utilisée par d'autres auteurs, le degré d'exposition des animaux n'est pas connue avec précision. Nous avons donc mis au point une méthodologie permettant d'exposer des petits mammifères à des sols pollués par les voies naturelles (ingestion, inhalation et absorption percutanée) dans des conditions contrôlées. Des rats de laboratoire ou des rats sauvages sont maintenus sur une litière de sol pollué ou non pendant 88 ± 2 heures. Les résultats montrent que des sols pollués par des HAP et/ou des PCB induisent plus fortement et plus durablement l'activité EROD pulmonaire (9 à 78 fois) que l'activité hépatique (3 à 29 fois). Dans les mêmes conditions, les rats sauvages sont moins sensibles. Ce protocole permet d'étudier la relation dose-réponse en diluant les sols pollués avec des sols non pollués ou du sable : les activités EROD, PROD et BROD hépatiques, EROD pulmonaires et les teneurs en PCB dans le foie et le poumon de rats sont significativement corrélées à la teneur en sol pollué présent dans la litière.

Des résultats préliminaires montrent que les sols pollués par des HAP induisent la formation d'adduits dans le foie et le poumon, mais nous n'avons pas pu mettre en évidence de modification des activités antioxydantes (catalase, superoxyde dismutase et glutathion peroxydases).

ABSTRACT

The review presents a) characteristics and extent of environmental pollution by chemicals, and contamination levels and toxic effects on human and wildlife, b) mechanisms of defense against chemicals and their potential use as biomarkers, and c) the interest of sentinel animal systems and bioassays in bioevaluation of polluted soils.

In the experimental study, we have studied the bioavailability of organic pollutants such as PAH or PCB which are known inducers of cytochrome P-450 1A1 and 2B, by measuring ethoxy-, pentoxy- and benzoxy-resorufin *O*-dealkylase activities (EROD, PROD and BROD, respectively) in hepatic and pulmonary microsomal fractions from wild rats (*Rattus norvegicus*) caught on the polluted site of Replonges. Results show the expected induction of hepatic EROD activity, in parallel with a strong increase in pulmonary EROD activity.

In such *in situ* studies which have been used by other authors, the level of exposure is not characterized. Thus, we have developed a methodology where small mammals are exposed to polluted soils by natural routes in controlled laboratory conditions. Laboratory or wild rats were maintained on a litter of soil during 88 ± 2 heures. The results show that with PAH- and/or PCB-polluted soils, the induction of pulmonary EROD activity is higher and more long-lasting than hepatic EROD activity (9 to 78- fold and 3 to 29- fold, respectively). In the same conditions, wild rats are less responsive. With this protocol, it is possible to study dose-response relationships by diluting polluted soil with unpolluted soil or sand. Hepatic EROD, PROD and BROD activities, pulmonary EROD activities, and hepatic and pulmonary PCB burdens are significantly correlated to the concentration of polluted soil in the litter.

Preliminary results show that PAH polluted soils induce the formation of DNA adducts in lung and liver. No modification of antioxidant enzyme activities (catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidases) was detected.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

FOUCHECOURT M.O. & RIVIERE J.L. – 1995 – Activities of cytochrome P450-dependent monooxygenases and antioxidant enzymes in different organs of Norway rats (*Rattus norvegicus*) inhabiting reference and contaminated sites, *Chemosphere*, **31** (11/12), 4375-4386.

FOUCHECOURT M.O. & RIVIERE J.L. – 1996 – Activities of liver and lung cytochrome P450-dependent monooxygenases and antioxidant enzymes in laboratory and wild Norway rats exposed to reference and contaminated soils, *Arch. environ. Contam. Toxicol.*, **30**, 513-522.

RIVIERE J.L., FOUCHECOURT M.O. & WALKER C.H. – Biomarqueurs d'exposition des animaux terrestres aux polluants. In : *Utilisation de biomarqueurs en écotoxicologie*, Lagadic L., Amiard J.C., Caquet T. and Ramade F. (Eds), Collection Sciences de l'Environnement, Masson, Paris (à paraître).

COMMUNICATION ORALE

FOUCHECOURT M.O. & RIVIERE J.L., Evaluation of soil pollutants bioavailability by induction of monooxygenase activities in rats exposed to litters of soil in the laboratory, Secotox 96, 4th European Conference on Ecotoxicology and Environmental Safety, 25-28 août 1996, Metz, France.

POSTER

FOUCHECOURT M.O. & RIVIERE J.L., Induction des activités alkoxyrésorufines O-déalkylases hépatiques et pulmonaires du rat après exposition à des sols pollués, Colloque international : Marqueurs biologiques de pollution, 21-22 septembre 1995, Chinon, France.

RAPPORTS

Rapports d'activité semestriels pour l'ADEME : déc. 1994, juin et déc. 1995, juin 1996.

Rapport d'activité intermédiaire pour le programme de recherches concertées sur l'écotoxicologie des sols et des déchets : FOUCHECOURT M.O. – 1996 – Effet de l'exposition de rats à une litière contenant différentes concentrations de sol contaminé par des polluants organiques, sur trois activités monooxygénases hépatiques et pulmonaires, Ademe, Service Recherche Impacts et Milieux, Paris.

INTRODUCTION

Marqué par le progrès technologique, notre siècle est celui de l'urbanisation et de la pollution. La société de consommation est productrice de déchets ménagers, agricoles ou industriels ; l'atmosphère, l'eau et le sol se chargent de polluants minéraux et organiques, dont la toxicité est trop souvent mal connue.

Les conséquences de la pollution pour les animaux ne sont pas toujours visibles : si les pollutions aiguës sont en général rapidement détectées (mort massive d'animaux, marée noire...), les pollutions chroniques ne sont pas facilement repérables. En effet, en dessous de la dose létale, les produits toxiques peuvent provoquer de nombreux troubles physiologiques détectables seulement à long terme : altération du fonctionnement d'organes vitaux, troubles de la reproduction, génotoxicité, affaiblissement et baisse de la résistance aux agressions microbiennes ou virales, troubles du comportement et exposition accrue aux prédateurs.... Tous ces effets non létaux n'en sont pas moins très graves par leurs conséquences : perturbation des écosystèmes, dégénérescence voire disparition d'espèces, bioaccumulation dans la chaîne alimentaire....

Les relations existant entre le milieu, les polluants et les organismes exposés rendent difficile l'évaluation du risque. La toxicologie environnementale du milieu terrestre doit tenir compte a) des nombreux paramètres liés au sol et aux polluants, intervenant dans le potentiel toxique d'un sol pollué, b) des voies et de la durée d'exposition des organismes et c) de leur sensibilité spécifique et individuelle qui conditionnent le risque qu'ils encourent.

Les essais de toxicité ont l'avantage d'être pratiqués dans des conditions expérimentales facilement contrôlées (doses administrées aux animaux parfaitement connues, produits utilisés purs ou dilués dans des substances inertes...) mais ils ont l'inconvénient de mettre en oeuvre des doses particulièrement élevées, dans des conditions expérimentales souvent très lointaines des conditions d'exposition rencontrées dans l'environnement. Dans ces conditions, des valeurs de toxicité telles que dose létale 50 ou dose sans effet observé... ont été déterminées et le métabolisme et les effets toxiques des polluants ont pu être mis en évidence ; ils pourront être mis à profit pour le développement de biomarqueurs d'exposition ou d'effets toxiques en toxicologie environnementale.

Contrairement au domaine aquatique, très étudié jusqu'à nos jours, les études concernant la toxicité des sols pollués commencent seulement à apparaître. L'analyse chimique du sol renseigne sur la nature et l'importance de la pollution, mais elle porte sur des extraits organiques du sol et ne reflète en rien la biodisponibilité des polluants extraits. Par contre, la connaissance des polluants présents et de leurs proportions relatives permet d'orienter le toxicologue vers la recherche d'effets toxiques caractéristiques des polluants

déTECTÉS. Parallèlement aux analyses chimiques, on peut pratiquer des essais d'écotoxicité à partir de lixiviats ou d'extraits organiques du sol à étudier, sur des bactéries ou des crustacés. Ces tests ont les mêmes limites que les analyses chimiques du fait qu'ils sont réalisés à partir d'extraits de sol.

Devant la difficulté à évaluer la toxicité potentielle d'un sol, il devient nécessaire de développer des tests se pratiquant sur un sol non modifié, dans des conditions d'exposition proches des conditions naturelles. Plusieurs équipes françaises travaillent actuellement sur la mise au point de tests d'écotoxicité adaptés aux sols et aux déchets (programme dirigé par l'ADEME). Dans le cadre de ce projet, nous travaillons sur la mise en évidence de la biodisponibilité et des éventuels effets toxiques des sols pollués pour des petits mammifères exposés par les voies naturelles.

La mesure de biomarqueurs d'exposition et/ou d'effets chez des mammifères directement exposés à un sol pollué est un moyen réaliste d'évaluer la biodisponibilité et les effets toxiques d'un sol pollué. Comme nous le verrons dans la partie bibliographique de ce travail, certains biomarqueurs sont déjà couramment utilisés dans la surveillance de la pollution environnementale, alors que d'autres n'ont pas encore atteint l'étape de la validation.

Ayant pour objectif de mettre au point un système de détection d'une pollution potentiellement toxique pour les mammifères, sensible, facile à mettre en oeuvre et plus réaliste que les conditions de laboratoire, nous avons étudié le site de Replonges, pollué par des composés organiques (polychlorobiphényles, hydrocarbures) et des métaux lourds. Dans un premier temps, nous avons mené une étude *in situ* avec capture de surmulots (rats sauvages) et mesure de biomarqueurs d'exposition. Les nombreux inconvénients liés à cette technique nous ont conduits à mettre au point un protocole d'exposition de rats à un sol pollué, en laboratoire et sans administration forcée. Ce protocole nous a permis a) d'étudier l'influence de la durée d'exposition sur la réponse, b) de comparer la réponse de rats sauvages et de rats de laboratoire, c) d'établir une relation dose-réponse pour certains biomarqueurs et d) de tester d'autres sols pollués que le sol prélevé à Replonges.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES POLLUANTS ENVIRONNEMENTAUX

En un siècle, le développement des activités industrielles et agricoles a provoqué l'apparition de milliers de nouvelles molécules et un très fort accroissement de la production de déchets. Aux États-Unis, l'industrie produit plus de 384 millions de tonnes de déchets tous les ans, dont 275 millions sont des déchets dangereux (US EPA, 1988b, cité par Houk, 1992). La plupart des déchets dangereux ont des propriétés mutagènes, carcinogènes et/ou tératogènes et dans les pays industrialisés, ils sont séparés des autres déchets et soumis à une réglementation très stricte.

La répartition géographique des polluants chimiques n'est pas toujours liée à la localisation de leurs sources et la pollution environnementale est devenue un problème à l'échelle mondiale : la migration par voie atmosphérique est particulièrement importante et concerne de nombreux polluants (hydrocarbures halogénés ou non, métaux, SO_x, NO_x...). Ainsi, les continents Arctique et Antarctique et les sédiments océaniques sont pollués depuis des années par des composés tels que les organochlorés.

Les polluants peuvent être regroupés en deux grandes catégories : les composés organiques et les composés inorganiques. Les principaux polluants organiques sont les hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés (HAPH) qui englobent les polychlorobiphényles et les polybromobiphényles, les chlorodioxines et les chlorodibenzofurannes, les insecticides et les hydrocarbures (aliphatiques, aromatiques et aromatiques polycycliques). Les polluants inorganiques regroupent les métaux (si l'on ne tient pas compte de certains dérivés organiques comme le méthylmercure) et les polluants atmosphériques (SO_x, NO_x, ozone et chlorofluorocarbone). Notre travail étant essentiellement axé sur les polychlorobiphényles, les hydrocarbures et les métaux lourds, nous ne développerons pas ce qui concerne les pesticides et les polluants atmosphériques.

I.1. Sources, propriétés physico-chimiques et niveaux de pollution

I.1.1. Les polychlorobiphényles

Fabriqués à partir de 1929, les polychlorobiphényles (PCB) étaient des composants communément utilisés comme fluides diélectriques dans les transformateurs, fluides caloporteurs, retardateurs de flamme, diluants organiques, ou employés dans la fabrication de résines et adhésifs, peintures, encres, huiles de coupe,

Les PCB sont obtenus par la chloration du biphényle. Il en existe 209 congénères qui se différencient par le nombre et la position des atomes de chlore. Ces congénères ont été numérotés afin de faciliter leur désignation (N^oIUPAC¹, Annexe I ; Ballschmitter & Zell,

¹¹International Union of Pure and Applied Chemistry

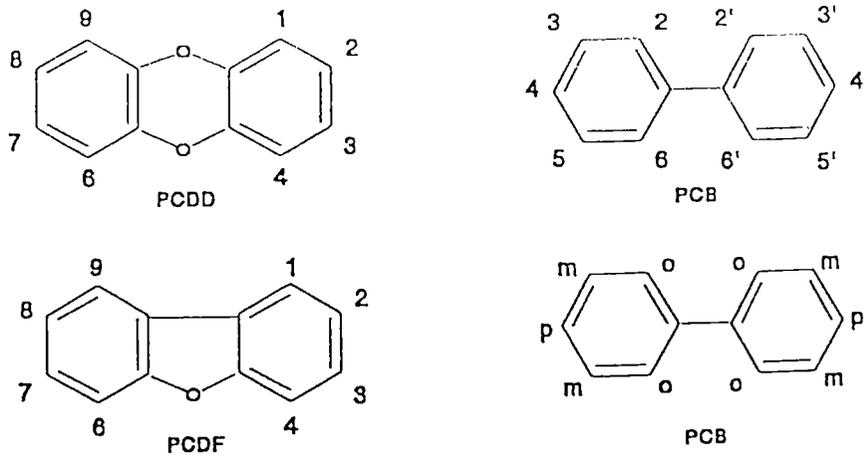


Figure 1 : Structure moléculaire et numérotation des positions des substituants des polychlorodibenzo-*p*-dioxines (PCDD), polychlorodibenzofurannes (PCDF) et polychlorobiphényles (PCB). Pour les PCB, les positions peuvent aussi être désignées par ortho (*o*), méta (*m*) ou para (*p*) (selon Bosveld, 1995).

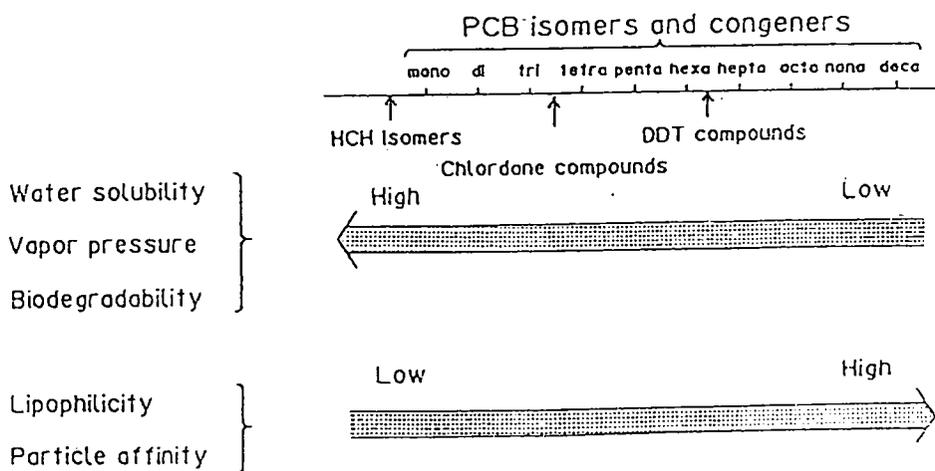


Figure 2 : Illustration schématique des propriétés physicochimiques et biochimiques des composés organochlorés (selon Loganathan et Kannan, 1994).

1980). Seuls les PCB non substitués en position *ortho* ou mono- ou di-substitués en cette position sont coplanaires (figure 1). Les préparations commerciales sont des mélanges de nombreux congénères ; les plus connus sont les Aroclor[®] 1242, 1254 ou 1260. Les deux derniers chiffres correspondent au pourcentage de chlore dans le poids du mélange : par exemple, 54% du poids de l'Aroclor 1254[®] correspond à du chlore. Les propriétés physico-chimiques des PCB dépendent du degré de substitution et de la position des substituants mais d'une manière générale, plus les congénères sont chlorés, plus ils sont lipophiles et s'adsorbent facilement et moins ils sont volatils, biodégradables et hydrosolubles (figure 2). Leur coefficient de partage octanol/eau ($\log K_{ow}$) est supérieur à 6, ce qui classe ces composés dans la catégorie des composés hautement bioaccumulables (Shore & Douben, 1994a) ; leur lipophilie leur permet d'être stockés dans les tissus adipeux et le lait des animaux et d'être bioaccumulés dans la chaîne alimentaire. Certains congénères (hexaCB #138 et #153, heptaCB #180) sont davantage retenus dans les tissus humains que d'autres (Safe, 1994). Les PCB ont une demi-vie dans le sol de 5 ans environ.

Les mélanges commerciaux les plus fortement chlorés (Aroclor[®] 1260) sont les plus carcinogènes et les plus immunotoxiques mais la létalité n'est pas corrélée au degré de substitution. Expérimentalement, les PCB sont promoteurs de carcinômes et de nodules néoplastiques dans le foie, le poumon et la peau ; les PCB sont classés parmi les 20 substances les plus dangereuses par l'ATSD, et sont probablement carcinogènes pour l'homme (groupe 2A ; IARC, 1987). L'EPA considère que l'ingestion de 1 µg de PCB/kg/jour pendant une vie provoque 77.000 cas de cancer supplémentaires par 10 millions de personnes.

En une quarantaine d'années, 1,2 millions de tonnes de PCB ont été produits dans le monde (Hansen, 1987). La faible toxicité aiguë des PCB (DL_{50} Aroclor[®] : 1,01-11,3 g/kg, rat, voie orale) et leur inactivité biologique (malgré l'observation de lésions cutanées et de troubles hépatiques) expliquent que leur usage et leur stockage n'aient pas été très surveillés à cette époque, ce qui a entraîné la dispersion d'environ un tiers de la production mondiale dans l'environnement. Dans les années 60, la dispersion dans l'environnement, la persistance et la toxicité de ces polluants ont été mises en évidence, ce qui a conduit les pays industrialisés à en arrêter la production dans les années 70. L'utilisation de transformateurs contenant des PCB a été interdite dans les pays membres de la CEE en 1985. Dans les années suivant l'arrêt de la production, l'émission de PCB dans l'environnement a chuté mais aujourd'hui, les teneurs environnementales ne diminuent que très lentement : les PCB présents dans l'environnement sont constamment remis en circulation (figure 3 ; Hansen, 1987) et il subsiste encore des sources de PCB qui n'ont pas été éliminées (transformateurs, décharges, épandage de boues de station d'épuration ; STEP). Aux États-Unis, des PCB ont été détectés dans au moins 216 des 1.177 sites dangereux faisant partie de la liste prioritaire (National Priority List). Le flux atmosphérique serait responsable des deux tiers de la remise en circulation des PCB, dont une partie va se déposer dans d'autres régions du globe. Ces migrations atmosphériques sont responsables de la contamination entre pays voisins, mais aussi entre

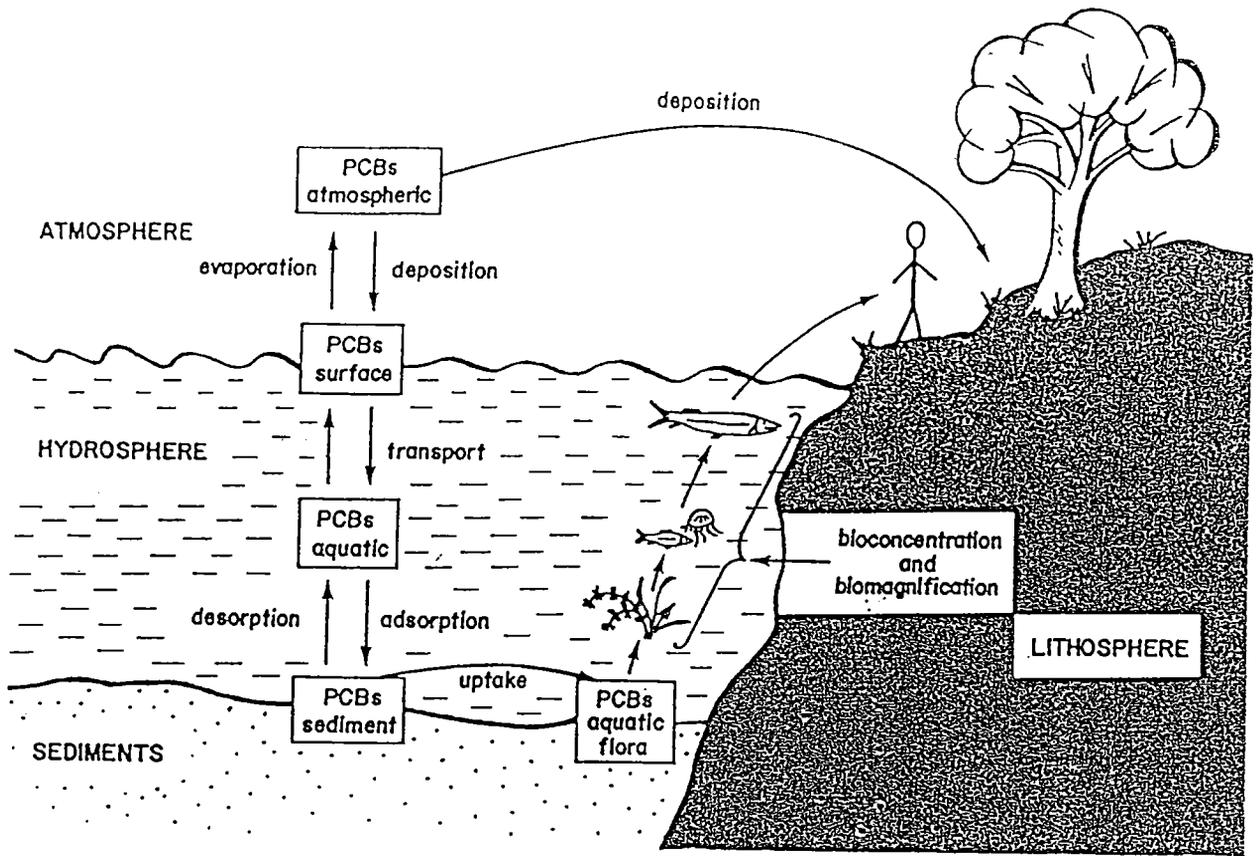


Figure 3 : Cycle et transport des PCB dans l'environnement (selon Safe *et al.*, 1987).

continents (dépôts de PCB sur les continents Arctique et Antarctique ; Loganathan & Kannan, 1994). Elles concernent essentiellement les congénères les plus faiblement chlorés (triCB #28, tétraCB #52 et pentaCB #101).

Au Royaume-Uni, la quantité totale de PCB est estimée à 400 tonnes, réparties dans le sol (93%), les sédiments d'eau douce (2,2%), l'eau douce (0,03%), les végétaux (1,8%), l'air (0,06%) et les animaux (1,9%) ; si l'on considère que la population humaine du Royaume-Uni représente 10% de la biomasse animale, 0,76 tonnes de PCB seraient contenus dans les tissus de cette population (Harrad *et al.*, 1994).

Les boues de STEP utilisées comme fertilisants contiennent souvent des PCB à des concentrations comprises entre 0,15 et 6,65 ppm avec une prédominance de congénères penta- et hexa- chlorés (revue par Alcock & Jones, 1993). La forte variabilité de ces teneurs peut s'expliquer par la diversité de l'origine des boues (industrielle, urbaine, rurale). Actuellement, les teneurs en PCB ne sont pas contrôlées dans les boues utilisées en agriculture.

Les valeurs de PCB mesurées dans le sol et relevées dans la littérature sont variables : selon Harrad *et al.* (1994), la teneur moyenne de PCB dans les sols est de 30 ppb (sur 5 cm de profondeur) au Royaume-Uni. Aux États-Unis, un site faisant partie des "Superfund Waste Sites", le site Pryor, contient 0,3 à 863 ppm d'Aroclor 1254[®] (Lubet *et al.*, 1992 ; Shaw-Allen & McBee, 1993). En Russie, à moins de 2 km de distance d'une usine de transformateurs, la concentration en PCB dans le sol est comprise entre 0,26 et 4,7 ppm, alors que le niveau admissible est d'environ 0,06 ppm (valeur fixée par le Ministère de la Santé Russe en 1991) ; la concentration atmosphérique est de 46 µg/m³ sur le site et varie entre 1,4 et 31 µg/m³ à 300 m du site (selon l'orientation) ; la concentration dans la neige varie entre 0,16 et 67 µg/litre ; sur les terrains inondés, la concentration est comprise entre 10 et 60 ppm dans les sols, entre 1 et 12 ppm dans les végétaux (à moins d'1 km de l'usine, Bobovnikova *et al.*, 1993).

L1.2. Les chlorodioxines et les chlorodibenzofurannes

Les dioxines sont un mélange de congénères : il existe 135 polychlorodibenzo-*p*-dioxines (PCDD) et 75 polychlorodibenzo-*p*-furannes (PCDF) (Safe, 1990 ; Gonzales *et al.*, 1991). La structure des PCDD et des PCDF est présentée sur la figure 1. Les dioxines sont des substances particulièrement préoccupantes : elles accompagnent souvent les chlorophénols et les préparations commerciales de PCB en tant qu'impuretés (le rapport PCDF/PCB est compris entre $2 \cdot 10^{-3}$ et $2 \cdot 10^{-6}$, suivant l'origine de la préparation) ou sont formées lors de la combustion incontrôlée de déchets ménagers (incinérateurs municipaux), industriels (sciure de bois traité aux chlorophénols, boues de STEP en aval d'usines à papier) ou hospitaliers, lors de la combustion de charbon, de tourbe, de carburants ou lors d'incendies de transformateurs ou de décharges (revues par Rappe, 1991 et Safe, 1990 ; Halonen *et al.*, 1993 ; Assmuth & Vartiainen, 1994). La formation des PCDD/PCDF est catalysée par la présence

de métaux ; cette situation est notamment rencontrée lors de l'incinération de boues de STEP (Halonen *et al.*, 1993).

Les incinérateurs étaient jusqu'à maintenant considérés comme une source importante de dioxines, mais de nouvelles technologies permettent de réduire efficacement leurs émissions (Schechter *et al.*, 1995). Les incendies de décharge seraient responsables d'une plus grande part des émissions : en Finlande et en Suède, les incendies de décharge produisent trois fois plus de PCDD/PCDF que les incinérateurs (soit respectivement, 50-70 et 35 g TEQ(Nordique)/an⁽²⁾ ; Ruokojärvi *et al.*, 1995). Les dioxines sont transportées par voie atmosphérique et la corrélation existant entre la présence de dioxines dans les "nuages" et la présence de SOx ou de NOx prouve l'origine urbaine ou industrielle de ces nuages (Tysklind *et al.*, 1993).

En Angleterre, des échantillons de sols et de végétaux archivés (de 1856 à 1988) ont été analysés : des dioxines ont été détectées dans tous les échantillons, la quantité de dioxines dans le sol a doublé entre la première (655 pg TEQ³/kg) et la deuxième guerre mondiale (1.080 pg TEQ/kg) puis s'est stabilisée (1.160 pg TEQ/kg en 1986). Dans les végétaux, la progression est plus lente jusque dans les années 60, puis les teneurs ont presque doublé entre 1970 (725 pg TEQ/kg) et 1988 (1.150 pg TEQ/kg). A partir de 1950 apparaît une augmentation de congénères hepta- et octa-chlorés qui indique l'influence de sources anthropogéniques comme le pentachlorophénol.

La déposition atmosphérique serait de l'ordre de 5 ng TEQ/m² en Norvège ou en Islande mais serait multipliée par 10 dans des zones moins isolées (en Suisse) et par 100 dans la zone des Grands Lacs Américains (Rappe, 1991). A proximité d'une usine de récupération de cuivre par pyrolyse de câbles usagés, des concentrations dans le sol comprises entre 0,253 et 27,800 µg TEQ/kg (Schrenk *et al.*, 1991) et allant jusqu'à 29 µg TEQ/kg sur un site semblable (Wuthe *et al.*, 1992) ont été mesurées. Sur ce site, 30 à 83 ng TEQ/kg de poussières prélevées dans les habitations voisines (à environ 200 m de l'usine) ont été mesurés (dans les greniers, les teneurs sont comprises entre 436 et 651 ng TEQ/kg de poussière). La teneur en dioxines à la surface du sol, à proximité d'une usine produisant des chlorophénols se situe autour de 21 µg TEQ/kg ; dans une décharge de scierie (bois traité), cette teneur est 10 fois plus faible (Assmuth & Vartiainen, 1994). Dans les cendres d'un incinérateur, les teneurs sont de l'ordre de 4 à 54 µg TEQ/kg (Pehlivan *et al.*, 1994). Ruokojärvi *et al.* (1995) ont mesuré des teneurs de 4 à 300 ng TEQ/kg dans les résidus d'incendies de décharge.

I.1.3. Les hydrocarbures

Les hydrocarbures regroupent les hydrocarbures aliphatiques, les hydrocarbures aromatiques (benzène...) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP : benzo(a)pyrène,

² Nordic Toxic Equivalent

³ Ici, International Toxic Equivalent (ou I-TEQ)

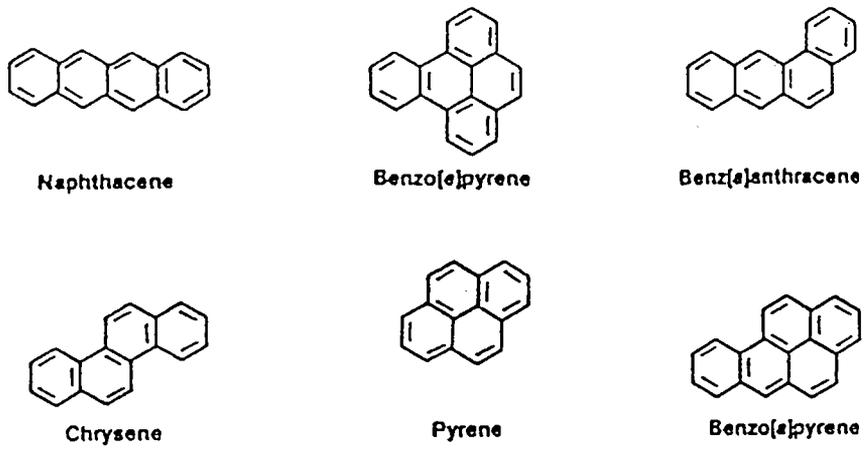


Figure 4 : Structure chimique de quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques.

benzo(a)anthracène, phénanthrène, fluoranthène...). Les HAP comportent au moins deux cycles benzéniques condensés ; quelques-uns sont présentés sur la figure 4.

Les hydrocarbures sont des molécules lipophiles. Certains hydrocarbures aromatiques sont davantage préoccupants que les hydrocarbures aliphatiques car ils sont très toxiques : le benzène, le dibenzo(a,h)anthracène, le benzo(a)pyrène (B(a)P), et le benzo(b)fluoranthène (B(b)F) font partie des 20 substances les plus dangereuses classées par l'"Agency for Toxic Substances and Disease" américaine (ATSD).

Les HAP peuvent être d'origine naturelle (volcans, feux de forêt, maturation de la matière organique) mais ils sont le plus souvent produits lors d'activités anthropiques telles que production d'énergie, transports et activités industrielles mettant en oeuvre une combustion incomplète de combustibles fossiles ou de matières organiques. Ils entrent dans la composition de la créosote, utilisée pour la conservation du bois. La plupart des sites fortement contaminés sont d'anciens sites industriels (cokeries, usines à gaz, usines de traitement du bois au créosote...), les décharges de produits toxiques ou les boues de STEP, mais les HAP sont des polluants ubiquistes détectés dans l'atmosphère, les sols, les eaux et les sédiments.

Des boues provenant de 23 stations d'épuration urbaines finlandaises (1.000 à 23.000 habitants) ont été analysées : la concentration totale en HAP varie de 0,018 à 11,9 mg/kg de résidu sec, avec une moyenne de 1,9 ppm. Ces concentrations sont plus faibles d'un ordre de grandeur que celles mesurées dans des boues en Allemagne ou au Canada, et plus élevées que les boues correspondant à des zones rurales (Sandell *et al.*, 1993).

Dans une forêt de pins située à proximité de hauts fourneaux, les concentrations en HAP en surface sont de l'ordre de 100 ppb (B(a)P + B(b+k)F). Entre 2 et 8 cm de profondeur (humus), la teneur est multipliée par 13 (Van Straalen *et al.*, 1993). La teneur en HAP (somme de 7 HAP) dans une zone comptant plusieurs usines à gaz varie entre 200 et 900 ppm en surface ; elle est de l'ordre de 10.000 ppm à 10 cm de profondeur (Shaw *et al.*, 1995). Des prélèvements effectués entre 0 et 50 cm de profondeur d'une dépression remblayée (site de Replonges) ayant reçu des vidanges de cuves d'hydrocarbures montrent des teneurs en HAP de l'ordre de 80 ppm (Fouchécourt & Rivière, 1996).

I.1.4. Les métaux

Bien qu'une faible quantité de la plupart des métaux soit indispensable à notre organisme, ils peuvent devenir toxiques à fortes doses (par exemple, le fluor) mais les métaux lourds sont presque toujours toxiques. Le plomb, le cadmium, le mercure et l'arsenic font partie des 20 substances les plus dangereuses, selon l'ATSD. Les métaux sont largement répandus dans l'environnement à la suite d'activités industrielles (exploitation de mines, stockage de déchets (terrils), industrie métallurgique, combustion de carburants...) et à l'épandage de boues de

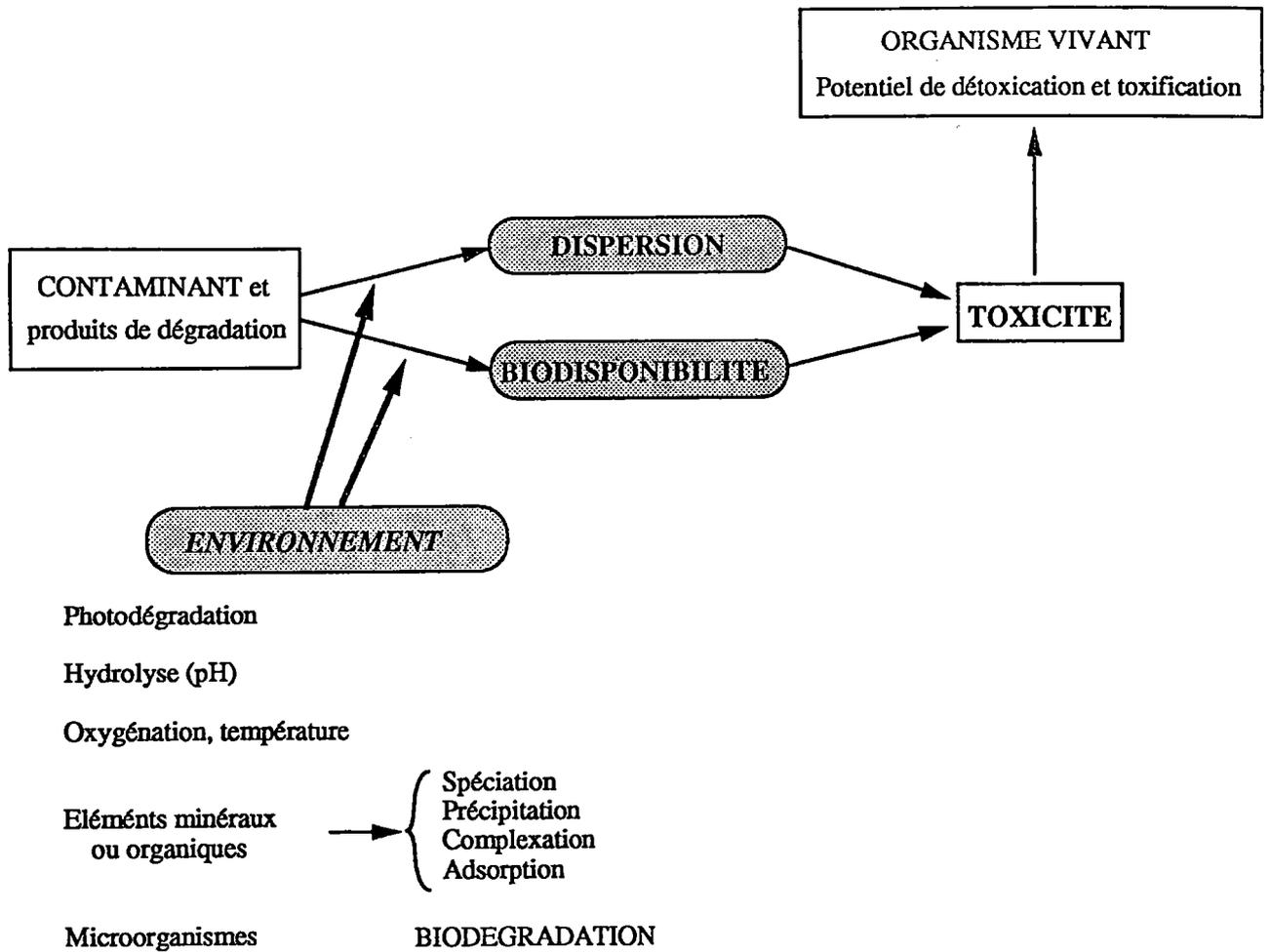


Figure 5 : Rôle de l'environnement dans le devenir et le comportement des polluants

STEP, mais la majorité des contaminations résulte de dépôts atmosphériques et concerne la surface des sols. Nous ne développerons ici que deux exemples.

Les nombreuses utilisations du *plomb* (industries, batteries, peintures, agriculture, carburants...) font que sa dispersion dans l'environnement est importante. De fortes concentrations sont observées aux alentours des usines de récupération de métaux non ferreux et, plus couramment, à proximité des autoroutes ou des lieux de trafic intense. Le développement du carburant sans plomb a permis de réduire de 40% les émissions de plomb dues au trafic automobile. Du plomb a été détecté dans 635 des 1.177 sites classés dangereux sur la liste prioritaire des Etats-Unis. Ce toxique cumulatif a une toxicité aiguë assez élevée (DL₅₀ : 10 mg/kg, rat, voie orale) et peut être transporté sur de grandes distances par voie atmosphérique. A proximité d'une usine de batteries, les concentrations de plomb dans le sol (0 à 2 cm de profondeur) sont comprises entre 38 et 130 ppm (de 50 à 500 m de l'usine), et entre 8 et 19 ppm (de 600 à 1.000 m), la concentration dans les sols témoins allant de 7 à 31 ppm ; sur le site, la teneur est de 180 ppm et dans l'herbe les concentrations varient entre 120 et 720 ppm (de 50 à 300 m de l'usine). Des concentrations de 205 à 370 ppm ont été mesurées dans de l'herbe poussant à côté d'une route à fort trafic (Beardsley *et al.*, 1978) ; dans la même étude, une moyenne de 21 ppm est mesurée dans les végétaux cultivés sur un sol fertilisé avec des boues.

Le *cadmium* est utilisé dans l'industrie (soudures, appareils électriques, alliages...) mais il est aussi présent dans les minerais de plomb ou de zinc. La contamination est importante dans les effluents d'usines (galvanoplastie par exemple), à proximité des mines de zinc ou de plomb et dans les zones agricoles (contamination naturelle des engrais, épandage de boues de STEP). Le cadmium est un toxique cumulatif : il n'est pratiquement pas éliminé de l'organisme et son accumulation dans les crustacés et les viandes est un problème majeur. Sa toxicité aiguë est faible (DL₅₀ : 88 mg/kg, rat, voie orale). Des granules de fertilisant provenant de boues de STEP, commercialisées dans le Milwaukee (USA) contenaient, entre autres métaux, environ 58 ppm de cadmium et 460 ppm de plomb (Anderson *et al.*, 1982).

I.2. Devenir des polluants dans l'environnement

Les polluants environnementaux sont soumis à divers phénomènes physiques, chimiques ou biologiques capables de modifier leur répartition, leur structure ou leur biodisponibilité (figure 5). Volatilisation, solubilisation, précipitation, adsorption, oxydation, réduction, hydrolyse, substitution nucléophile, complexation, photolyse, biodégradation sont autant d'événements qui dépendent de la nature du polluant et de paramètres du milieu (sol, eau, air). Par exemple, les phénomènes d'adsorption sont rencontrés dans les sols, surtout s'ils sont riches en humus et en argile, et dans les sédiments (Fletcher & McKay, 1993) ; les polluants présents dans l'atmosphère sont davantage soumis à la photodégradation que les polluants présents dans le sol, plutôt sujets à une biodégradation ; les phénomènes de complexation

concernent surtout les micropolluants minéraux... L'oxydation dépend de l'oxygénation ; dans le sol, il y aura des zones aérobies et anaérobies, ce qui peut également influencer la biodégradation (par des micro-organismes aérobies/anaérobies).

Le profil d'un mélange de polluants peut donc être modifié au cours du temps : par exemple, le rapport PCDF/PCDD est supérieur à 1 au niveau des émissions (proximité d'incinérateurs) mais devient inférieur à 1 lorsque l'analyse est effectuée sur l'air. Cet appauvrissement en PCDF et en congénères faiblement chlorés peut être dû à une dégradation photolytique ou à des réactions radicalaires agissant différemment sur les PCDD et les PCDF (Tysklind *et al.*, 1993).

I.3. Niveaux de contamination et effets biologiques de la pollution environnementale

I.3.1. Sur la faune terrestre

Les mammifères et les oiseaux sont les deux principaux groupes de vertébrés (numériquement parlant) constituant la faune sauvage terrestre. Au delà des cas de mortalité aiguë (marée noires, utilisation de pesticides dans de mauvaises conditions), l'exposition sublétales aux grandes familles de polluants (composés organohalogénés, métaux, pesticides) est plus difficile à mettre en évidence. Les effets toxiques des polluants ont surtout été étudiés chez les oiseaux, mais des études récentes ont montré leurs effets nocifs sur les mammifères.

La dissémination des insecticides organochlorés a eu des conséquences désastreuses sur les populations d'oiseaux (amincissement des coquilles d'oeufs et déclin de populations de rapaces en Grande-Bretagne ; Cooke, 1973 ; Newton *et al.*, 1993). Les PCB et les dioxines sont des contaminants majeurs des Grands Lacs Américains et sont responsables d'effets embryotoxiques et tératogènes chez les oiseaux d'eau et les rapaces (Kubiak *et al.*, 1989 ; Gilbertson *et al.*, 1991). Parmi les métaux lourds, le plomb est le plus dangereux et le plus répandu. La contamination des oiseaux d'eau par les plombs de chasse ou de pêche a été établie. En dehors de sa toxicité aiguë, le plomb peut contribuer par ses effets sublétaux à l'extinction de certaines populations d'oiseaux (revue par Rivière *et al.*, à paraître).

Les données concernant le risque des polluants pour les mammifères terrestres sont encore rares. Des études de terrain ont été menées sur des sites contaminés, mais la majorité de ces études se limite à la recherche de marqueurs d'exposition (teneurs en polluants dans l'organisme ou inductions enzymatiques ; Lubet *et al.*, 1992 ; Rattner *et al.*, 1993 ; Bhatia *et al.*, 1994...).

I.3.1.1. Exposition des mammifères aux polluants organiques

L'accident de Seveso (Italie) au cours duquel des symptômes d'intoxication ont été observés chez de nombreux animaux domestiques et sauvages a révélé la toxicité des dioxines au grand

public. Dans le Missouri, des chevaux contaminés par de l'huile de récupération déversée sur la sciure de leur manège ont présenté de sévères troubles hépatiques et cutanés (Buck, 1979). L'épithélium trachéal de petits mammifères et d'oiseaux vivant à proximité de centrales thermiques est altéré (augmentation des sécrétions de mucus, cils plus courts ; Llacuna *et al.*, 1993). Les animaux marins ne sont pas épargnés : la pollution chronique des côtes argentines par des hydrocarbures (dégazage, contamination au niveau des ports) est chaque année responsable de la mort de dizaines de pingouins migrateurs (Gandini *et al.*, 1994).

Batty *et al.* (1990) ont mis en évidence la disparition d'une population de musaraignes sur un site pollué par des PCB et des métaux lourds, et plusieurs travaux ont montré l'existence d'effets génotoxiques (échange de chromatides soeurs, adduits à l'ADN, aneuploïdie...) chez des rongeurs vivant sur des sites à pollution complexe (Nayak & Petras, 1985 ; McBee *et al.*, 1987, McBee et Bickham, 1988 ; Thompson *et al.*, 1988 ; McBee, 1991 ; Shaw-Allen & McBee, 1993), chez des rats musqués vivant auprès d'une rivière contaminée par des HAP (Halbrook *et al.*, 1993) ou chez des bovins vivant à proximité d'un site industriel (Parada & Jaszczak, 1993).

Dans les années 70, de très nombreuses équipes se sont intéressées à la contamination des animaux sauvages terrestres et marins par les PCB (revue par Kamrin & Ringer, 1994). Les PCB sont omniprésents dans le monde mais les plus fortes teneurs sont retrouvées dans l'hémisphère Nord ; le continent arctique n'est pas épargné, même si la contamination est moins importante que sur les autres continents. Le continent antarctique est le plus faiblement atteint. D'une manière générale, les mammifères mâles sont plus fortement contaminés que les femelles, qui éliminent une partie des PCB lors de la gestation et de l'allaitement : les teneurs en PCB mesurées sur des chauve-souris nouveau-nés varient entre une valeur indétectable et 25 ppm (exprimé par rapport aux matières grasses de l'organisme), les teneurs mesurées chez la mère étant comprises entre 3,6 et 25 ppm ; très souvent, le niveau de contamination est très semblable chez la mère et le nouveau-né. Des concentrations de 6 à 60 ppm et de 0,06 à 7,4 ppm ont été mesurées sur des visons, respectivement morts et vivants. Chez les loutres mortes, des teneurs allant jusqu'à 300 ppm ont pu être mesurées. En Europe (Suisse et Allemagne), des teneurs variant entre 1,1 et 121 ppm ont été mesurées sur des putois (Mason & Weber, 1990). A proximité d'une usine de transformateurs, des concentrations en PCB comprises entre 4,9 et 8,7, et 2,9 à 17,2 ppm ont été mesurées dans le foie et le muscle (respectivement) de campagnols, de souris et d'écureuils. Des souris vivant près d'une décharge d'usine électrique (transformateurs) contiennent 11,2 ppm, contre une valeur indétectable chez des souris non exposées. Des ours polaires capturés au Canada ont des teneurs comprises entre 1,6 et 8,25 ppm dans les tissus adipeux, contre 21 ppm chez un ours tué au Groenland ; les congénères hexachlorés #153 et #138 représentent respectivement 42% et 17% du total des congénères. Chez les mammifères marins, les teneurs sont très variables et dépendent de la localisation des animaux, de leur régime alimentaire, de leur sexe, de leur espèce et de leur âge. Les teneurs mesurées chez des baleines, des marsouins, des dauphins,

des lions de mer ou des phoques varient de quelques dixièmes de ppm à plusieurs centaines de ppm (dauphins de Californie du Sud), voire quelques milliers (phoques des côtes américaines et Européennes). Il est fort probable que ces produits ont un effet sur le déclin de ces populations de mammifères ou sur leur reproduction, mais il n'a pas été possible de le prouver par les enquêtes écoépidémiologiques.

Les poissons et les oiseaux vivant dans la région des Grands Lacs ou à proximité de décharges de produits dangereux sont plus fortement contaminés que les autres (2,3 pg/g de 2,3,7,8-TCDD, contre 0,03 pg/g chez les poissons provenant d'autres zones urbaines, Travis & Hattemer-Frey, 1990 cité par Fletcher & McKay, 1993) ; des truites vivant dans une rivière contaminée par des dioxines (1,3-3.228 ng TEQ/kg de sédiments) contiennent entre 163 et 982 ng TEQ/kg (ppt) de matière grasse. Les poissons sont une source de contamination pour les prédateurs et les dioxines sont particulièrement bien accumulées dans la chaîne alimentaire, la bioaccumulation des différents congénères de PCDD/PCDF dépendant de chaque congénère (Fürst *et al.*, 1993). Dans le lait de vache, les teneurs en dioxines ne sont pas liées au niveau de contamination du sol mais dépendent de la teneur dans l'herbe et l'air (Wuthe *et al.*, 1992). Des souris capturées à proximité d'une usine de pyrolyse de câbles usagés sont contaminées par des dioxines (28 à 158 ng TEQ/kg de foie) et les activités EROD hépatiques de ces souris sont multipliées 1,5 à 2 fois (teneurs dans le sol comprises entre 253 et 27.770 ng TEQ/kg ; Schrenk *et al.*, 1991).

I.3.1.2. Exposition des mammifères aux métaux

L'utilisation des boues de STEP urbaines comme fertilisant agricole contribue à la dispersion de métaux lourds. Ces métaux sont peuvent s'accumuler dans les végétaux et il a été montré au laboratoire et sur le terrain que les animaux nourris avec des végétaux cultivés sur un terrain agricole fertilisé par des boues accumulaient des métaux lourds dans leur organisme : la teneur en cadmium chez les campagnols est comprise entre 0,6 et 24 fois la valeur du témoin dans le foie, et 1,6 à 193 fois la valeur du témoin dans le rein (Anderson *et al.*, 1982). La durée de vie des campagnols est réduite lorsqu'ils vivent sur des terrains fertilisés depuis plusieurs années par des boues de STEP, particulièrement riches en cadmium (Maly, 1984).

L'accumulation corporelle de métaux lourds est hétérogène et dépend du métal, de l'organe (rein, foie, et moelle sont souvent les tissus les plus accumulateurs), du sexe (les femelles sont meilleures accumulatrices que les mâles) et de l'espèce (Way & Schroder, 1982 ; Anderson *et al.*, 1982).

Des surmulots vivants en zone urbaine ont des concentrations en cadmium décroissantes dans le rein, le foie, les muscles, les testicules et la moelle (Anderson *et al.*, 1982). Les surmulots vivant à Houston (USA) absorberaient environ 800 µg de plomb par jour, contre 85 µg pour des rats vivants en zone rurale (Way & Schroder, 1982). Il est difficile d'évaluer les conséquences toxicologiques d'une pollution par des métaux car leur toxicité est

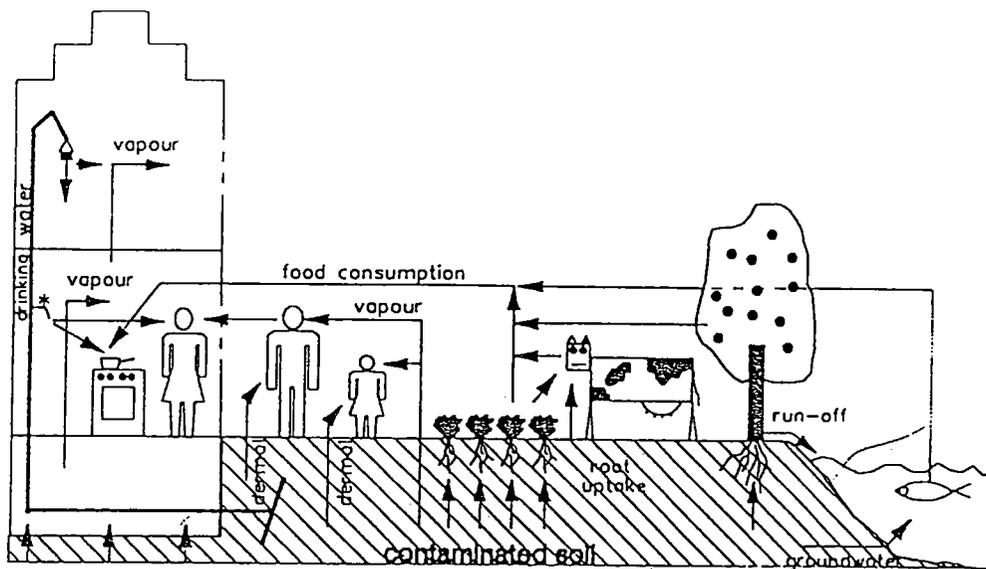


Figure 6 : Voies majeures d'exposition de l'homme aux polluants présents dans le sol (selon Poels et Veerkamp, 1992).

très dépendante de l'espèce (Shore et Douben, 1994b). La contamination des petits mammifères (musaraignes) consommant beaucoup d'Oligochètes est supérieure à celle des rongeurs car ils sont situés plus haut dans la chaîne alimentaire, mais la toxicité n'est pas facile à corrélérer avec la teneur en métal dans les organes. Ainsi, certaines espèces fortement accumulatrices (musaraignes) sont plus résistantes que d'autres (souris, campagnols) ; l'accumulation de métaux lourds sous une forme non toxique (liaison à une métallothionéine) protégerait efficacement ces espèces accumulatrices (Ma *et al.*, 1991 ; Shore & Douben, 1994b). L'ingestion de sol et de nourriture étant les voies majeures d'exposition (Beardsley *et al.*, 1978), la contamination des petits mammifères est corrélée à la teneur en métaux dans le sol et les végétaux ; la mesure des teneurs en mercure dans le sol, l'herbe, les vers de terre et les tissus de rongeurs vivant à proximité d'une industrie rejetant du mercure montre une augmentation dans ces échantillons par rapport à une zone non contaminée (Bull *et al.*, 1977). Dubétail peut aussi être suffisamment contaminé par ingestion d'herbe et inhalation d'air pollués par du plomb pour que la morbidité du troupeau soit augmentée (Kisseberth *et al.*, 1984). L'émail dentaire et sa genèse sont sévèrement altérés chez des cerfs et des rats vivant dans des régions fortement polluées par du fluor (Paranjpe *et al.*, 1994 ; Kierdorf *et al.*, 1996).

L.3.2. Sur l'homme

Pour la majorité des polluants, les expositions professionnelles sont les sources d'exposition majeures, si l'on exclut les expositions accidentelles, mais l'exposition environnementale ne doit pas être négligée : la consommation d'aliments contaminés (poissons, viande, lait) est une source importante de contamination de l'homme, dernier maillon de la chaîne alimentaire (Theelen & Liem, 1994 ; Krauthacker & Reiner, 1994), mais l'inhalation d'air contaminé et la résidence sur des sols contaminés sont également des sources d'exposition à prendre en compte. Les différentes voies d'exposition de l'homme aux polluants présents dans le sol sont représentées sur la figure 6.

L.3.2.1. Exposition aux polluants organiques

De nos jours il est admis que toute la population humaine est contaminée par les *PCB*, y compris les enfants (contamination par le lait). Un enfant nourri au sein ingérerait 3 µg de *PCB*/kg/jour à Zagreb (valeur médiane) et 5,9 µg de *PCB*/jour en France, pendant les trois premiers mois de sa vie (Bordet *et al.*, 1993 ; Krauthacker et Reiner, 1994).

En Russie, la concentration en *PCB* dans les oeufs de poules élevées à moins d'un km d'une usine fabriquant des transformateurs varie entre 1,5 et 40 µg/jaune d'oeuf ; la concentration dans le lait maternel est comprise entre 500 et 2.400 µg/l chez les femmes vivant à moins de 500 m de l'usine et travaillant à l'usine. De telles concentrations amènent les bébés âgés de 1 à 2 mois à absorber quelques 1.740 µg de *PCB* par jour, soit environ 500 fois la dose maximale admissible (1 µg/kg/jour). Les femmes vivant et travaillant à plus de 2

et 1,5 km (respectivement) ont encore des teneurs élevées (22 à 600 µg/l). Les effets observés sur les bébés sont réunis sous le terme général de diathèse, ce qui signifie que ces enfants souffrent de très nombreuses pathologies (Bobovnikova *et al.*, 1993).

Dans le lait, les congénères penta- et hexa- chlorés sont majoritaires ; les congénères hexachlorés #153 et #138 et heptachloré #180 représentent chacun environ 10 % du total des congénères (Bordet *et al.*, 1993 ; Safe, 1994 ; Wuthe *et al.*, 1996).

Les symptômes varient suivant la gravité de l'intoxication (James *et al.*, 1993). Cependant, les effets cliniques observés dans les deux cas accidentels de Yusho et de Yu-Cheng pourraient être fortement liés à la contamination importante des mélanges de PCB par des dioxines (le rapport PCDF/PCB des mélanges commerciaux à l'origine de la contamination était de $2,4 \cdot 10^{-3}$).

La présence de *dioxines* a été mise en évidence dans des animaux sauvages (poissons, tortues, oiseaux) et dans le lait, le sérum et le tissu adipeux humains. La demi-vie des PCDD/PCDF est d'environ 10 à 12 ans dans le sol et 7 à 10 ans chez l'homme (Pehlivan *et al.*, 1994 ; Shore & Douben, 1994a ; Pirkle *et al.*, 1995).

Les congénères substitués en positions 2,3,7,8 sont majoritaires dans les échantillons humains ou animaux (revue par Safe, 1990). La 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) est le congénère le plus toxique. Elle altère les fonctions de la reproduction, provoque des effets immunotoxiques et elle est classée dans le groupe 2B (possible carcinogène pour l'homme) par l'IARC, mais sa toxicité est extrêmement variable en fonction de l'espèce (DL₅₀ par voie orale : 0,6 µg/kg chez le cochon d'Inde, 22 µg/kg chez le rat mâle, 5.000 µg/kg chez le hamster). Les autres congénères (di-, hexa- et octa-substitués) sont nettement moins toxiques (DL₅₀ de 100 à plus de 2.000 mg/kg). Le stockage des dioxines (et autres molécules lipophiles) dans les tissus adipeux expliquerait les différences de toxicité importantes en fonction de l'âge, du sexe ou de l'espèce (Geyer *et al.*, 1993).

L'homme est exposé aux dioxines par la consommation de denrées contaminées ou l'inhalation de poussières chargées de dioxines. Les concentrations atmosphériques varient de 3-4 fg TEQ/m³ à plus de 500 fg TEQ/m³, respectivement en zones rurale et fortement industrialisée ; dans l'enceinte d'une aciérie suédoise, les teneurs varient entre 100 et 14.000 fg TEQ/m³. Dans les eaux de boisson, des teneurs de 2 pg TEQ/m³ ont été mesurées (revue par Rappe, 1991). Une étude américaine basée sur l'analyse des teneurs en dioxines dans les aliments (0,02 à 1,5 ppt TEQ) et tenant compte de la consommation journalière de différentes denrées, estime qu'un Américain adulte ingère entre 0,3 et 53 pg TEQ par kg par jour. Un bébé nourri au sein recevrait 35 à 53 pg TEQ/kg/jour pendant la première année de sa vie (Schechter *et al.*, 1994). Les teneurs en dioxines dans le lait sont particulièrement élevées du fait de l'association de ces composés lipophiles avec les lipides présents en grande quantité dans le lait. D'après la World Health Organization (WHO), le niveau de PCDD/PCDF dans le lait humain des individus vivant en Europe, aux Etats-Unis, au Japon ou au Vietnam, est

compris entre 8 et 39 pg TEQ/g de matières grasses du lait (Rappe, 1991). En Croatie, les congénères octa-, hepta- et hexa-PCDD sont les plus abondants (mesures effectuées entre 1981 et 1987 ; Krauthacker & Reiner, 1994).

L'EPA estime qu'une exposition journalière de 0,006 pg de TCDD/kg pendant 70 ans provoque un cancer pour un million de personnes. Quelques études épidémiologiques ont pu mettre en évidence l'implication d'une exposition aiguë ou chronique aux TCDD dans le développement de cancers (revues par Tritscher *et al.*, 1994). D'autres points finaux que le cancer peuvent être utilisés pour les études épidémiologiques : par exemple, les effets immunotoxiques, les troubles de la reproduction ou les troubles du développement.

Les HAP peuvent pénétrer dans l'organisme par trois voies : l'inhalation d'air contaminé (fumée de cigarettes par exemple), l'ingestion et le contact cutané (avec des huiles, des suies ou des sols). L'exposition professionnelle concerne les travailleurs des usines fabriquant des produits contenant des HAP (créosote par exemple), les mécaniciens, les personnes travaillant avec des goudrons, les ouvriers des cokeries et d'usines d'incinération..... La lipophilie des HAP explique leur capacité d'accumulation dans les tissus adipeux ou le lait. La toxicité aiguë des HAP est faible mais certains de leurs métabolites sont capables de former des adduits à l'ADN, souvent précurseurs du développement de cancers. Le benzène et la fumée de cigarettes sont classés parmi les agents carcinogènes pour l'homme (groupe 1) et de nombreux HAP sont classés dans le groupe 2A, 2B ou 2C (IARC, 1987). Le cancer du scrotum chez les ramoneurs est un exemple historique de cancer professionnel lié aux HAP.

La pollution atmosphérique est un problème de plus en plus préoccupant dans tous les pays : dans certaines zones, les teneurs en HAP et dérivés (comme les nitroarènes) sont très élevées. A Santiago du Chili, Quiñones & Gil (1995) ont détecté au moins 16 HAP différents dans les particules atmosphériques. Les HAP carcinogènes (B(a)P, benzo(a)anthracène, B(b)F, B(k)F, dibenz(a,h)anthracène et indéno(1,2,3c,d)pyrène) représentent 49 à 85% des HAP totaux mesurés dans les échantillons. Toujours selon ces auteurs, un habitant de Santiago inhalerait en moyenne 158 µg de B(a)P par an. L'incidence de maladies du système respiratoire (bronchites, emphysème pulmonaire) et de cancers du poumon pourrait être liée à la pollution atmosphérique, mais les études épidémiologiques ne permettent pas encore d'établir cette corrélation avec certitude. Toutefois, plusieurs études ont montré la mutagénicité et la carcinogénicité de particules recueillies dans l'air de zones urbaines fortement polluées (revues par Quiñones & Gil, 1995). Des cancers de la peau, du poumon et des leucémies ont pu être mis en évidence chez des animaux de laboratoire ; la corrélation entre ces types de cancers et l'exposition d'hommes sur leur lieu de travail a été établie (Simonato & Sarraci, 1983).

I.3.2.4. Exposition aux métaux lourds

La consommation d'eau, d'aliments, de sol et l'inhalation d'air contaminés sont les sources principales d'exposition au plomb. Chez l'homme adulte, la voie majeure d'exposition est l'inhalation (et l'ingestion pour les enfants). Le contact cutané est une voie d'exposition minime.

Le *plomb* fixé dans le squelette et les dents (90% du plomb présent dans l'organisme) a une durée de demi-vie de 20 ans, alors qu'elle n'est que de quelques semaines dans les tissus mous. Il est éliminé par voie fécale et urinaire. Les intoxications au plomb sont particulièrement graves pour les fœtus (tératogénèse) ou les jeunes enfants, car leur développement psychomoteur peut être affecté. Une exposition chronique peut provoquer de nombreux effets toxiques : troubles hématologiques (inhibition de la synthèse de l'hème), néphrites, troubles digestifs ("colique de plomb"), accidents cardiovasculaires, troubles du système nerveux central et parasympathique....

Le *cadmium* est un métal thioloprive (il monopolise les atomes de soufre et peut ainsi bloquer l'action de certaines enzymes) qui a la particularité de fortement induire la production de métallothionéines, protéines destinées à stocker le métal sous une forme non toxique. Le cadmium est principalement bioaccumulé dans les reins, le foie, le poumon et le pancréas. Son élimination est quasiment nulle (de 0,001 à 0,01 % de la charge corporelle par jour), ce qui signifie qu'une forte accumulation sera irréversible. Lorsque la charge corporelle dépasse 200 mg, les effets toxiques sont inévitables. Le cadmium peut provoquer différentes pathologies : emphysème pulmonaire (fumeurs), ulcération des cloisons nasales, troubles cardiovasculaire mais surtout, il est considéré comme carcinogène probable pour l'homme (groupe 2A). L'intoxication accidentelle la plus connue est la maladie dite de Itai-Itai : une rizière contaminée a provoqué l'intoxication de toute une population, ce qui s'est traduit par des néphrites et des déficiences en calcium et des cas d'ostéomalacie chez les femmes. .

I.4. Les sites pollués en France : réglementations et état des lieux

I.4.1. Aspect juridique

Juridiquement, trois lois à propos des sites et sols pollués (15 juillet 1975, 19 juillet 1976, et 13 juillet 1992) ont établi trois grands principes :

a) le pollueur est le payeur : les produits chimiques répertoriés et autres substances dangereuses ne peuvent être stockés, produits et utilisés sans autorisation. Ces "installations classées" doivent être conformes à certaines règles de protection de l'environnement et de sécurité. Le titulaire des autorisations doit prévenir tous les types de pollutions liés à ces installations, même après fermeture. En cas de pollution, il doit prendre en charge la réhabilitation du site. Si l'exploitant titulaire est défaillant et s'il n'est pas le propriétaire du site, le propriétaire du site peut être le payeur.

b) depuis 1992, le traitement et le stockage des déchets ne peuvent être autorisés que si l'exploitant dispose de capacités techniques et financières suffisantes.

c) il est obligatoire pour le vendeur d'un terrain industriel à activité classée d'informer l'acquéreur de ces activités.

La circulaire du 3 décembre 1993 évoque une politique de gestion administrative des sites pollués : un sol doit être adapté à son usage actuel ou futur et ne doit pas présenter de risques inacceptables pour la santé publique et l'environnement. La gestion des sites comprend 4 étapes : la première est le recensement des sites (le premier a été publié en 1994), la deuxième consiste en une étude succincte des différents sites, afin de différencier ceux nécessitant seulement des mesures de surveillance ou des restrictions d'usage, de ceux nécessitant prioritairement des investigations complémentaires. Les deux dernières étapes consistent en l'évaluation de l'impact du site en fonction de son utilisation et au traitement de dépollution suivi d'une nouvelle étude d'impact.

La loi du 2 février 1995 (décret d'application du 19 septembre 1995) instaure une taxe sur les déchets industriels spéciaux (DIS) destinée à financer la réhabilitation de sites orphelins (sites n'ayant pas de propriétaire solvable ou dont le propriétaire n'est pas identifié). Cette taxe est actuellement de 30 F/tonne de DIS traité et 60 F/tonne de DIS stocké, et devrait rapporter 115 millions de francs en 1998 (Brugilles, 1995).

I.4.2. Recensement des sites pollués

Un site pollué est défini comme "un site dont le sol, le sous-sol ou les eaux souterraines ont été pollués par d'anciens dépôts de déchets ou par l'infiltration de substances polluantes, cette pollution étant susceptible de provoquer une nuisance ou un risque pérenne pour les personnes ou l'environnement". Les sites pollués sont divisés en trois catégories (Ministère de l'Environnement, 1994) :

- les anciennes décharges, établies en dehors des règles techniques actuelles (notamment sans se soucier des risques de pollution pour les eaux souterraines),
- les dépôts de déchets ou de produits chimiques abandonnés à la suite de faillites d'entreprises ou résultant de pratiques frauduleuses d'importation ou d'élimination de déchets,
- les sols pollués par des retombées, des infiltrations ou des déversements de substances polluantes, liés à l'exploitation passée ou présente d'une installation industrielle ou à un accident de transport.

Les dangers et les risques pour la population avoisinant de tels sites sont rarement immédiats. L'accès à des sites contenant des matières dangereuses peut être limité par des mesures simples (clôture, enlèvement ou confinement des substances polluantes, gardiennage). Le risque le plus important consiste souvent en la contamination des eaux superficielles et souterraines.

Il convient aujourd'hui de traiter les sites pollués d'hier, tout en prévenant de nouvelles pollutions. La circulaire du 3 décembre 1993 avait donc pour objectif de mettre en place une politique de réhabilitation et de traitement des sites pollués basée sur le recensement et l'étude de ces sites, et à la définition de priorités de dépollution tenant compte des risques encourus pour l'homme et l'environnement.

Les 669 sites recensés en France en 1994 sont les sites connus par l'administration pour avoir un sol pollué ou étant à l'origine de la pollution des eaux superficielles ou souterraines. Les sites dépollués sans restriction d'usage, les anciennes décharges de déchets ménagers n'ayant pas entraîné de pollution et les sites pollués par des substances radioactives ne font pas partie du recensement.

La répartition régionale des sites pollués (présentée dans le tableau 1) est relativement bien corrélée au poids industriel. Les régions Nord-Pas de Calais, Rhône-Alpes et Ile de France sont celles contenant le plus de sites. Sur les 669 sites recensés en 1994, 611 ont un responsable identifié, 20 sont déclarés "orphelins" ; pour les autres, la recherche de responsabilité a été engagée (en 1994).

Tableau 1 : Localisation des sites pollués recensés en France en 1994 (d'après le Ministère de l'Environnement, 1994).

Régions	Nombre de sites par région	Régions	Nombre de sites par région
Alsace	48	Ile de France	77
Aquitaine	36	Languedoc Roussillon	7
Auvergne	5	Limousin	9
Basse Normandie	21	Lorraine	49
Bourgogne	17	Midi-Pyrénées	9
Bretagne	5	Nord-Pas de Calais	109
Centre	18	Pays de la Loire	16
Champagne Ardennes	24	Picardie	26
Corse	1	Poitou Charentes	9
DOM	16	Provence Alpes Cote d'Azur	23
Franche Comté	8	Rhône Alpes	90
Haute Normandie	46	TOTAL	669

Les activités sources des pollutions constatées sont les industries chimiques, pharmaceutiques et parachimiques (19,5%), l'industrie des métaux ferreux (18%), le traitement et l'élimination des déchets (14,3%), l'industrie du pétrole et du gaz naturel (10,6%), les cokeries et usines à gaz de ville (9,6%) et l'industrie des métaux non ferreux (7%). Les 21,6% de sites pollués

restant sont dus à des activités individuelles représentant chacune moins de 2% des sites et sols pollués.

Moins d'un site sur deux est situé en zone habitée, mais les trois quarts des sites recensés sont situés en zone vulnérable (habitation à moins de 300 m (32%), cours d'eau à moins de 500 m (36%), captage d'eau potable à proximité (15%)...).

Le tableau 2 présente la nature des polluants (présents dans le sol et la nappe) et des déchets.

Tableau 2 : Nature des polluants identifiés dans le sol et la nappe et nature des déchets identifiés sur les sites pollués recensés en 1994 (d'après le Ministère de l'Environnement, 1994).

Déchets	Nombre de sites
150 Mélanges liquides eau/hydrocarbures	91
224 Brais, goudrons, bitumes	47
203 Laitiers, scories, crasses, réfractaires usés	47
980 Déchets industriels banals en mélange	40
284 Résidus de décantation, filtration, centrifugation	36
202 Poussières fines et cendres volantes	27
121 Solvants halogénés	27
302 Absorbants, adsorbants, matériaux souillés notamment de produits organiques	23
204 Sables de fonderie usagés	23
201 Mâchefers, suies, et cendres non volantes	18
225 Loupés et sous-produits de fabrication de synthèse organique	18
305 Emballages souillés	18
970 Ordures ménagères	18
303 Absorbants, adsorbants, matériaux souillés notamment de produits inorganiques	16
122 Solvants non halogénés	15
108 Liquides, bains et boues contenant des métaux non précipités (autres que les déchets 101 à 107)	13
288 Boues de lavage de gaz	13
261 Oxydes métalliques résiduels solides	12
282 Boues d'hydroxydes métalliques n'ayant pas subi un traitement de déshydratation	12
930 Déchets de démolition	12

	Nombre de sites
Avec analyse	377
Sans analyse	110

Polluants	Nombre de sites
Arsenic	47
Baryum	14
Cadmium	38
Cobalt	7
Chrome	82
Cuivre	59
Mercure	30
Molybdène	3
Nickel	34
Plomb	100
Sélénium	2
Zinc	85
Cyanure	48
Hydrocarbures	231
H.P.A (1)	66
PCB (2), PCT (3)	34
Solvants halogénés	62
Solvants non halogénés	35
Pesticides	18
Autres	238

(1) : Hydrocarbures aromatiques polycycliques.

(2) : Polychlorobiphényles

(3) : Polychlorotriphényles.

Parmi les déchets, les hydrocarbures et les déchets hydrocarbonés sont les plus courants, suivis par les cendres, les poussières et les solvants halogénés. Comme nous l'avons vu, la majorité des déchets contient des HAP et des HAPH. Au niveau des sols et de la nappe,

hydrocarbures, HAP, PCB et solvants halogénés sont les polluants organiques majeurs ; le plomb, le zinc et le chrome sont les polluants minéraux les plus couramment rencontrés.

Les interventions à réaliser sur ces sites varient en fonction de la pollution et de l'usage prévu pour le site : dans certains cas, une couverture imperméable suffit à éviter le contact en surface et l'infiltration dans les sols, dans d'autres cas des mesures de dépollution doivent être prises, le niveau de dépollution à atteindre dépendant de l'usage ultérieur du site (site à vocation industrielle, zone de loisirs...). Pour 337 sites, un traitement de dépollution est effectué ou envisagé à court terme ; pour plus d'un tiers de ces sites, des traitements complexes seront nécessaires.

I.5. Aperçu de la situation en Europe

La situation en Europe de l'Ouest est bien contrôlée par de nombreux règlements sévères (par exemple, aux Pays-Bas), mais les problèmes de pollution les plus préoccupants viennent des pays d'Europe de l'Est. Dans ces pays, la contamination par les métaux est un problème majeur (revue par Carpenter *et al.*, 1996). Par exemple, en Bulgarie, la contamination est telle que certaines régions ne sont plus utilisables sur le plan agricole. Dans plusieurs zones très industrialisées, l'accumulation de plomb, de zinc et de cuivre a été mise en évidence chez l'homme dans le sang, les urines, les phanères et les dents. En moyenne, 400 g de substances toxiques émises par des activités industrielles seraient inhalés par chaque habitant, en un an. En République Tchèque, la pollution provient essentiellement des mines d'uranium et de charbon, mais d'anciennes zones militaires sont également la source de contaminations extrêmement importantes en hydrocarbures : des teneurs dans le sol pouvant aller jusque 100 g/kg ont été relevées, des couches d'hydrocarbures de 1 m d'épaisseur ont parfois été observées sur la nappe phréatique. L'Ukraine se distingue des pays voisins par la contamination radioactive de Tchernobyl, contamination qui serait responsable d'une diminution notable de l'espérance de vie. Largement contaminée par des métaux et des composés organiques toxiques, l'Europe de l'Est est aussi envahie par d'innombrables décharges, dans lesquelles déchets toxiques et ordures ménagères ne sont pas différenciés. Depuis quelques années, une réglementation commence à être mise en place, mais elle ne concerne pour l'instant que quelques centaines de décharges ; il en reste des milliers, qui ne sont ni conformes ni contrôlées.

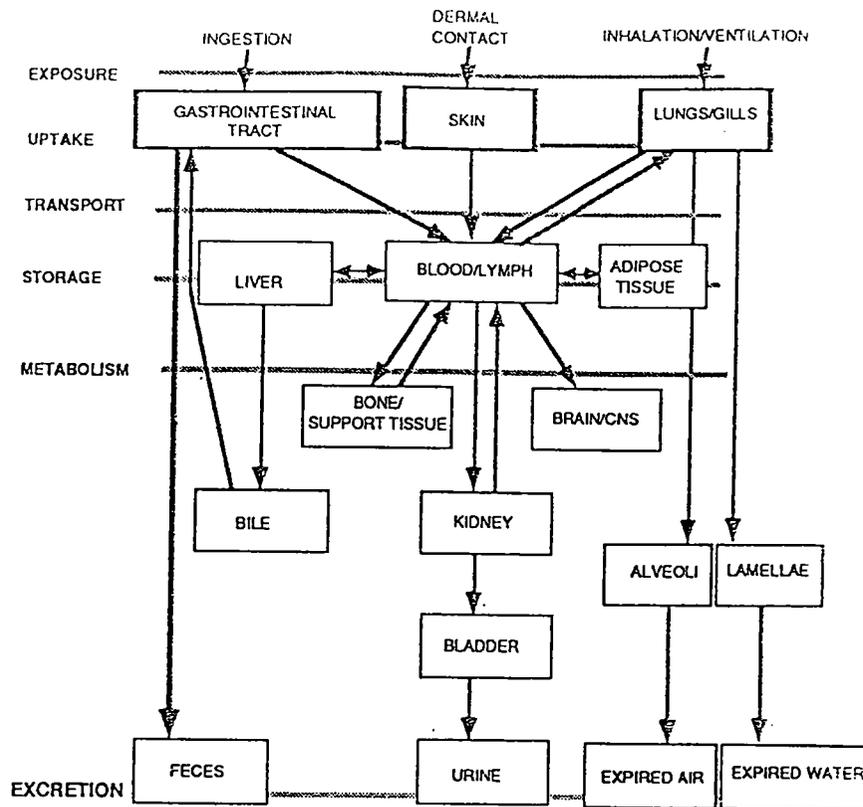


Figure 7 : Voies d'absorption, de transport et d'excrétion des toxiques chez les espèces animales (selon Landis, 1995).

II. LES MÉCANISMES DE DÉFENSE CONTRE LES AGRESSIONS CHIMIQUES

La plupart des polluants environnementaux organiques (HAP et HAPH) sont des molécules ubiquistes dans l'environnement et plus ou moins persistantes. Ces molécules ont des caractéristiques chimiques communes : elles sont hydrophobes, assez volumineuses (au moins deux cycles benzéniques) et certaines d'entre elles sont planes. Leur caractère lipophile leur permet de traverser facilement les membranes et de pénétrer dans l'organisme. Une partie des xénobiotiques sont métabolisés dès leur entrée dans l'organisme (cellules de la peau, cellules intestinales, cellules pulmonaires), l'autre partie se distribue dans les tissus et les organes par la voie sanguine (figure 7). Les métaux se différencient des composés organiques par leurs propriétés physico-chimiques, leurs voies d'exposition (surtout orale et pulmonaire) et leur métabolisme.

Les composés organiques sont métabolisés dans de nombreux organes par un système de détoxification qui comprend une phase de fonctionnalisation (phase I) et une phase de conjugaison (phase II). Ces deux étapes aboutissent à des métabolites plus polaires qui sont plus facilement éliminés. Parallèlement à ce système de détoxification, le système antioxydant composé d'enzymes antioxydantes et de molécules piègeuses de radicaux libres lutte contre les radicaux oxygénés ou les oxydants. Un troisième système de défense, le système immunitaire, est un système biologique extrêmement complexe qui permet la reconnaissance des éléments étrangers à l'organisme (grosses molécules, micro-organismes...). Il peut être directement sollicité par les polluants environnementaux (allergies) mais il est aussi susceptible d'être perturbé indirectement par des toxiques (ou leurs métabolites), ce qui peut entraîner une immunomodulation, souvent suivie de la baisse de résistance de l'organisme à des agents pathogènes.

Dans un premier temps, nous décrirons les systèmes de détoxification et de lutte contre le stress oxydant et les liens qui existent entre ces deux processus, puis nous présenterons les événements consécutifs à une intoxication par des métaux. Le fonctionnement du système immunitaire étant très complexe, nous en ferons une présentation très succincte, qui permettra la compréhension des événements immunotoxiques que nous développerons ensuite.

II.1. Les systèmes de détoxification

L'élimination d'un composé organique exogène se fait en trois étapes :

a) phase I : les composés sont fonctionnalisés par des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse qui assurent l'introduction ou la libération de fonctions chimiques polaires dans le xénobiotique, favorisant ainsi l'action des enzymes de phase II. Les oxydations sont principalement catalysées par les monooxygénases à cytochrome P-450 et les monooxygénases à flavine ; les hydrolyses sont effectuées par les estérases. La figure 8 regroupe les différentes réactions de phase I.

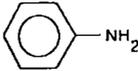
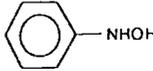
<i>type of reaction</i>	<i>substrate</i>	<i>product(s)</i>
A. oxidations		
<i>I mixed-function oxidase-dependent reactions</i>		
aromatic hydroxylation	$R - \langle \langle \rangle \rangle$	$R - \langle \langle \rangle \rangle - OH$
aliphatic hydroxylation	$R - CH_3$	$R - CH_2OH$
epoxidation	$R - C = C - R$ H H	$R - C - C - R$ H O H
N-hydroxylation		
O-dealkylation	$R - O - CH_3$	$ROH + CH_2O$
N-dealkylation	$R - NHCH_3$	$R - NH_2 + CH_2O$
S-dealkylation	$R - S - CH_3$	$R - SH + CH_2O$
deamination	$R - \underset{\substack{ \\ NH_2}}{CH} - CH_3$	$R - \underset{\substack{ \\ O}}{C} - CH_3 + NH_3$
S-oxidation	$R - S - R'$	$R - \underset{\substack{ \\ O}}{S} - R'$
dechlorination	CCl_4	$[CCl_3^*] \rightarrow CHCl_3$
oxidative desulphuration	$R_1 - O - \underset{\substack{ \\ S}}{P} - O - R_3$ R ₂ -O	$R_1 - O - \underset{\substack{ \\ O}}{P} - O - R_3$ R ₂ -O
<i>II amine oxidation</i>		
	$R - CH_2 - NH_2$	$R - CHO + NH_3$
<i>III dehydrogenation</i>		
	$CH_3 - CH_2 - OH$	$CH_3CHO \quad CH_3COOH$
B. reductions		
azoreduction	$R - N = N - R'$	$R - NH_2 + R' - NH_2$
nitroreduction	$R - NO_2$	$R - NH_2$
carbonyl reduction	$R - \underset{\substack{ \\ O}}{C} - R'$	$R - \underset{\substack{ \\ OH}}{CH} - R'$
C. hydrolyses		
esters	$R - \underset{\substack{ \\ O}}{C} - O - R'$	$R - \underset{\substack{ \\ O}}{C} - OH + R' - OH$
amides	$R - CONH_2$	$R - COOH + NH_3$

Figure 8: Réactions de biotransformation de phase I.

b) phase II : les enzymes de conjugaison additionnent une molécule endogène hydrosoluble sur le xénobiotique ou un de ses métabolites primaires. Ces additions font intervenir diverses enzymes de conjugaison spécifiques du substrat endogène conjugué : glutathion *S*-transférases (glutathion), uridine diphosphate glucuronosyl transférase (acide glucuronique), sulfotransférase (3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate), acétyl-coenzyme A N-acétyltransférase (acétyl-coenzyme A) et époxyde hydrolase (eau) en sont les principales.

c) élimination des métabolites.

II.1.1. Le cytochrome P-450

Le pigment "P-450" a été découvert en 1958 par ses propriétés d'absorption à 450 nm lorsqu'il est réduit par du dithionite en présence de monoxyde de carbone. En 1964, Omura & Sato montrent que le "P-450" est une hémoprotéine qui sera désormais appelée "cytochrome P-450". Les études ultérieures mirent en évidence l'existence de plusieurs formes de cytochrome P-450 ayant des spectres d'absorption différents et ne répondant pas de la même façon à différents inducteurs (notamment le phénobarbital et le 3-méthylcholanthrène).

II.1.1.1. Phylogénèse

Les premiers gènes codant pour le cytochrome P-450 seraient apparus il y a trois milliards d'années ; le rôle des cytochromes P-450 était alors vraisemblablement limité à des réactions de réduction (conditions d'anaérobiose). Les gènes de cytochromes P-450 sont apparus chez les animaux et les plantes il y a un milliard d'années, dans des conditions d'aérobiose cette fois et avec des fonctions oxydantes (figure 9). Les premiers gènes codaient pour les cytochromes P-450 métabolisant les molécules endogènes, comme les stéroïdes ou les acides gras (familles 3 et 4). Les gènes codant pour le métabolisme des xénobiotiques (familles 1 et 2) dateraient de 800 millions d'années seulement ! Le nombre de gènes de cytochromes P-450 aurait vraisemblablement augmenté en fonction de l'évolution, surtout pendant les derniers 400 millions d'années (figure 9). La diversification qui s'est produite sur ces différents gènes peut s'expliquer par les changements de conditions de vie (passage du milieu aquatique au milieu terrestre, métabolisme secondaire des plantes...).

La connaissance de ces gènes a très vite évolué : en 1987, seulement 31 gènes différents étaient identifiés (Goepfert *et al.*, 1995) ; en 1990, 154 gènes codant pour le cytochrome P-450 étaient (sur un total de 23 eucaryotes et 7 prokaryotes) regroupés en 29 familles, dont 9 étaient retrouvées chez les mammifères. Chez le rat, 38 gènes étaient identifiés, chaque gène codant pour une protéine (Nebert, 1991). En 1996, Nelson *et al.* (1996) ont établi une nouvelle liste, comprenant 481 gènes et 22 pseudogènes, décrits chez 105 espèces (85 eucaryotes et 20 prokaryotes). Ces gènes sont regroupés dans 74 familles ; 14 de ces familles existent chez tous les mammifères observés et sont divisées en sous-familles.

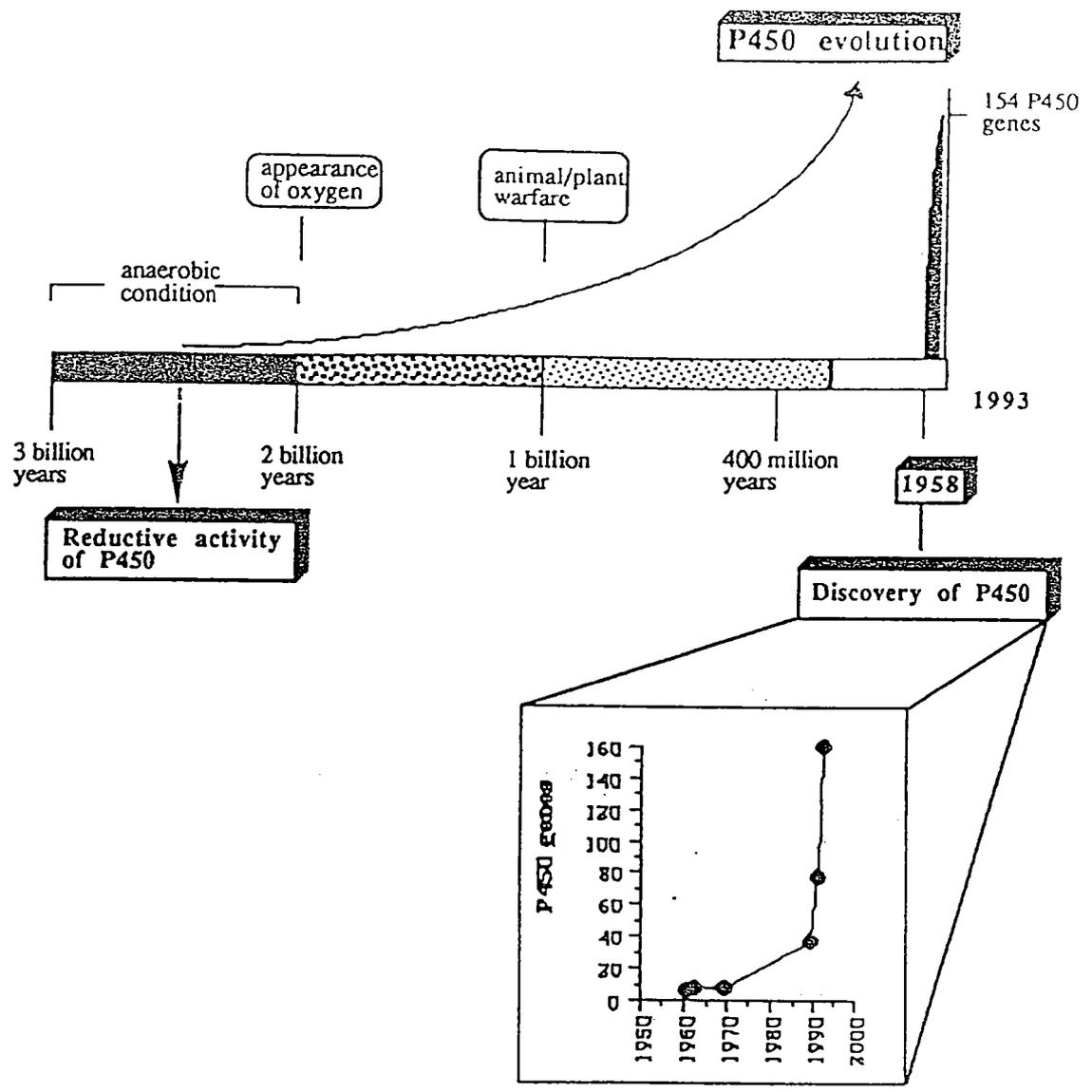


Figure 9 : Représentation schématique du développement du cytochrome P-450 au cours de l'évolution (selon Goepfert *et al.*, 1995).

II.1.1.2. Nomenclature

La nomenclature établie par Nebert *et al.* (1987, 1991) est basée sur l'homologie des séquences primaires de la partie protéique du cytochrome P-450 : les différentes formes sont classées par familles ou sous-familles de gènes. En règle générale, les familles regroupent les protéines ayant au moins 40 % d'homologie ; elles sont indiquées en chiffre arabe (par exemple : CYP1). Les protéines ayant au moins 59% d'homologie font partie de la même sous-famille, indiquée par une lettre majuscule (CYP1A). Les différents cytochromes appartenant à la même sous-famille sont signalés par un chiffre arabe (CYP1A1). Les gènes sont désignés par les caractères majuscules (homme) ou minuscules (souris) italiques (CYP1A, CYP2B1...).

II.1.1.3. Structure

Les cytochromes P-450 sont des hémoprotéines de poids moléculaire compris entre 45 et 55 kD, la partie hémique se situant dans une cavité hydrophobe de la partie protéique. Le noyau hémique des cytochromes P-450 est constitué d'une ferroporphyrine IX. L'atome de fer est coordonné à quatre ligands équatoriaux (atomes d'azote des noyaux pyrroliques) et à deux ligands axiaux qui sont le groupement thiol d'une cystéine faisant partie de l'apoprotéine et probablement une molécule d'eau.

La structure primaire de la partie protéique est connue, puisqu'elle est à la base de la classification des différentes formes de cytochromes P-450. Certaines régions sont plus conservées que d'autres : la partie N-terminale de tous les cytochromes P-450 eucaryotes (riche en résidus hydrophobes) qui assure l'ancrage de l'hémoprotéine dans la bicouche lipidique du réticulum endoplasmique, les régions de fixation de l'hème (région riche en résidus cystéine à l'extrémité C-terminale) et de l'oxygène (zone centrale de l'hélice D). La structure secondaire et tertiaire n'a pu être déterminée qu'à partir du cytochrome P-450 soluble de *Pseudomonas putida* (P-450 101, métabolisant le camphre) : la protéine du cytochrome P-450 est constituée de 12 hélices α et 4 feuillets β . L'hème est située entre les hélices I et C et le feuillet β_3 .

II.1.1.4. Propriétés spectrales

Le cytochrome P-450 réduit par de la dithionite et fixant du CO absorbe dans le bleu, avec un pic d'absorption à 450 nm. Les changements de l'état de spin du fer hémique provoquent des différences spectrales de type I, II ou I inversé. Un spectre de type I résulte de l'interaction entre un ligand faible (hydrophobe) et l'apoprotéine : l'état de spin du fer est augmenté, et le système a un fort potentiel d'oxydo-réduction (cas des CYP1A). Les spectres de type II sont obtenus avec des ligands forts, pour lesquels l'état de spin du fer est diminué (cas du CYP2B). L'origine des spectres de type I inversé est mal connue.

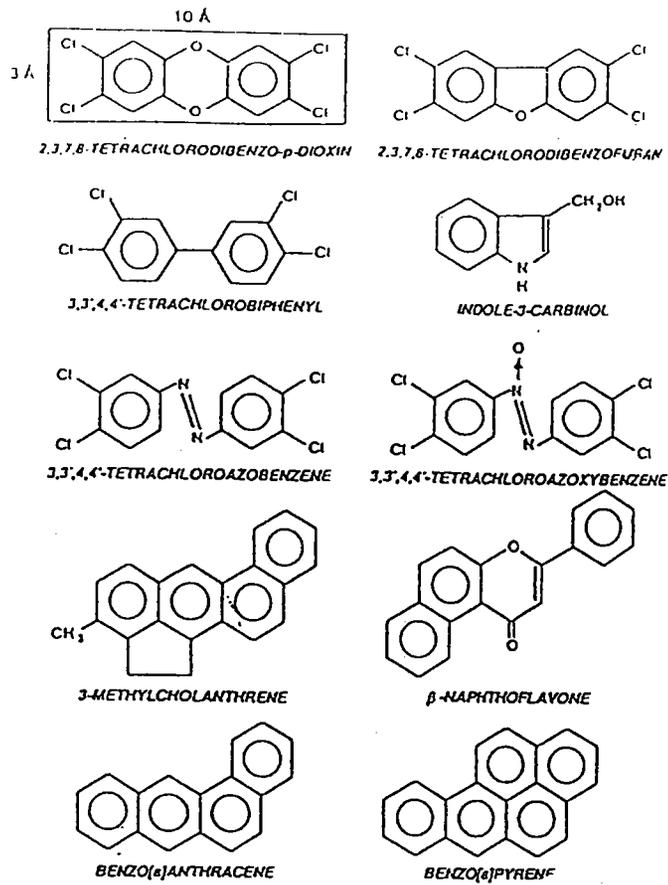


Figure 10 : Structure des inducteurs de type "3-méthylcholanthrène" (selon Okey, 1990)

II.1.1.5. Spécificité de substrat

L'hème faisant partie intégrante du site actif, le substrat doit pouvoir s'insérer entre l'hème et la protéine. Ainsi, le CYP1A1 est spécifique des molécules planes (les hydrocarbures aromatiques polycycliques plans dont la double liaison doit être oxydée pour former un époxyde doivent se positionner sur une surface comprise entre 7 et 10 Å ; figure 10), alors que les cytochromes P-450 2B s'accrochent à des molécules globulaires.

II.1.2. Le système multienzymatique à cytochrome P-450

II.1.2.1. Topologie membranaire

Chez la majorité des eucaryotes, les isozymes de cytochromes P-450 sont situés dans la membrane du réticulum endoplasmique ou des mitochondries. L'ancrage ne concerne que la partie N-terminale de la protéine, le reste du cytochrome étant situé côté cytosol. Dans le système multienzymatique à cytochrome P-450, le cytochrome P-450 est associé à une NADPH-cytochrome P-450-réductase, et parfois à un cytochrome b_5 et sa réductase. Il y aurait environ 15 molécules de cytochrome P-450 pour une réductase ; la fluidité membranaire permet à la réductase de se déplacer au sein de la membrane et de s'associer aux cytochromes P-450 (Blanck & Ruckpaul, 1993).

II.1.2.2. Cycle catalytique

Le cytochrome P-450 est le catalyseur terminal de la chaîne de transfert d'électrons du système multienzymatique à cytochrome P-450. En l'absence de substrat, le fer est sous une forme ferrique prédominante (hexacoordonnée), probablement sous l'action d'une molécule d'eau, qui sert de sixième ligand. La fixation du substrat (hydrophobe) sur le site catalytique chasse la molécule d'eau, ce qui provoque un déplacement du fer vers une forme pentacoordonnée. L'atome de fer ne fait alors plus partie du plan de l'hème (figure 11). La réduction du complexe enzyme-substrat par la NADPH-cytochrome P-450 réductase conduit à la réduction du fer, et la fixation d'oxygène moléculaire (O_2) sur le fer réduit lui fournit un électron. Le complexe enzyme-substrat- O_2^\bullet est réduit une deuxième fois par un électron provenant du NAD(P)H (réaction catalysée par une NADPH-cytochrome-P-450 réductase ou une NADH-cytochrome b_5 réductase-cytochrome b_5). La réduction d'un des deux atomes d'oxygène en eau et l'insertion du deuxième atome dans le substrat, conduit à la libération de celui-ci et à la régénération du cytochrome P-450 sous sa forme oxydée initiale.

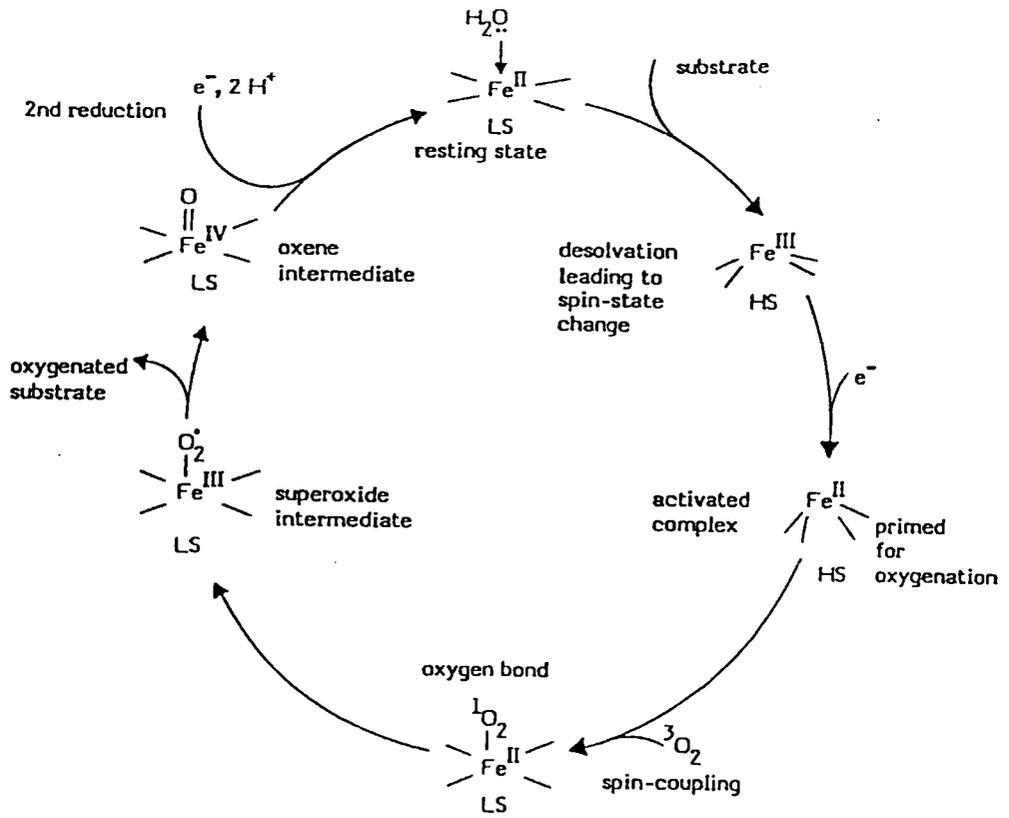


Figure 11 : Cycle catalytique du cytochrome P-450 (selon Lewis *et al.*, 1989).
 HS : état de haut spin, LS : état de bas spin

II.1.2.3. Réactions catalysées par les cytochromes P-450

Les cytochromes P-450 peuvent catalyser plusieurs types d'oxydation qui peuvent se résumer ainsi :



Les monooxygénases à cytochrome P450 peuvent oxyder des liaisons C-H sur des hydrocarbures aliphatiques ou des hydrocarbures azotés, soufrés, nitrés ou halogénés (oxydation en position α), des doubles liaisons C=C (époxydation des alcènes et des hydrocarbures aromatiques) ou des hétéroéléments (*N*-oxydation, *S*-oxydation). Lorsque les cytochromes P-450 sont sous forme réduite (fer ferreux), il peuvent catalyser la réduction des dérivés nitrés ou des *N*-oxydes et la déshalogénéation de composés tels que le tétrachlorure de carbone. Ces réactions interviennent dans le métabolisme de substances endogènes (stéroïdes, prostaglandines, acides gras, cytokines) et dans la métabolisation des xénobiotiques (médicaments, polluants).

II.1.2.4. Régulation

La régulation de ces activités monooxygénases peut être endogène ou exogène. De nombreuses hormones (hormones de croissance, hormones sexuelles, insuline, hormones thyroïdiennes) interviennent sur la régulation du métabolisme des molécules endogènes par les enzymes cytochrome P-450 dépendantes, ce qui explique les différences liées au sexe, à l'âge, à l'espèce... Des phénomènes externes (température, nutrition, stress...) peuvent influencer ces régulations et certains xénobiotiques sont capables d'induire ou d'inhiber des activités cytochrome P-450 dépendantes. L'inductibilité des monooxygénases à cytochrome P-450 par les xénobiotiques est particulièrement intéressante, puisqu'elle permet de mettre en évidence la présence de composés inducteurs. Le classement des inducteurs basé sur l'induction de cytochromes P450 spécifiques présente l'avantage d'être simple, mais il n'est pas très réaliste, une même substance étant susceptible d'induire simultanément plusieurs formes de cytochromes P-450. Par exemple, le toluène induit au moins six isozymes de cytochrome P-450 (Nakajima & Wang, 1994).

II.1.2.5. Techniques de localisation et de quantification des différents isoenzymes de cytochrome P-450

Les cytochromes P-450 peuvent être localisés au sein des tissus par des techniques d'immunohistochimie. La mise en évidence des différentes formes de cytochromes P-450 était autrefois réalisée en utilisant leurs propriétés spectrales, mais aujourd'hui elles peuvent être identifiées par électrophorèse après dénaturation des protéines ; l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux permet de les quantifier. La quantification des ARNm par immunochimie permet de mettre en évidence les inductions à régulations transcriptionnelles ;

la quantification des protéines a l'avantage de pouvoir détecter également les inductions à régulations post-transcriptionnelles (CYP2E1 par exemple). La mesure d'activités enzymatiques spécifiques d'un ou plusieurs isozymes peut également être utilisée (revue par Nims & Lubet, 1995).

II.1.3. Induction par les xénobiotiques

Les premières inductions d'activités cytochromes P-450 dépendante par les xénobiotiques ont été observées dans les années 60. En 1963, Remmer & Merker constatent que le traitement chronique de rats avec le phénobarbital (barbiturique) diminue progressivement le temps de sommeil, ce qui serait dû à un métabolisme accru du phénobarbital. En 1967, Conney observe une diminution du pouvoir cancérigène de colorants azoïques lorsqu'ils sont administrés en même temps que du 3-méthylcholanthrène. Ces effets sont rapidement mis en relation avec l'induction d'activités cytochrome P-450 dépendantes ; une synthèse *de novo* de ces enzymes est évoquée par Conney dès 1967.

L'inductibilité par les xénobiotiques ne concerne que quelques familles de cytochromes P-450 et seulement quelques sous-familles (tableau 3).

Tableau 3 : Gènes de cytochrome P-450 inductibles par des xénobiotiques chez les eucaryotes et leurs substrats enzymatiques (d'après Denison & Whitlock, 1995).

Inducteur	Cytochrome P-450	Substrat spécifique
Certains HAP, HAH ^a et PCB	CYP1A1	HAP
	CYP1A2	Médicaments, stéroïdes
	CYP1B1	HAP, stéroïdes ?
	CYP2A3	Stéroïdes
Barbituriques, DDT, dieldrine, certains PCB	CYP2A1	Stéroïdes
	CYP2B1/2	Médicaments, stéroïdes, HAP
	CYP2H1/2	Médicaments, stéroïdes, HAP
	CYP2C1/6/7/11	Stéroïdes, acides gras, médicaments
	CYP3A1/2	Stéroïdes, médicaments, antibiotiques
Proliférateurs de peroxysomes	CYP6A1	Pesticides
	CYP2B1	Médicaments, stéroïdes, HAP
Dexaméthasone, PCN, glucocorticoïdes	CYP4A1/2/3/6/7	Acides gras
	CYP3A1	Stéroïdes, médicaments, antibiotiques
	CYP2B1/2	Médicaments, stéroïdes, HAP
	CYP2C6	Stéroïdes, acides gras, médicaments

^a : hydrocarbures aromatiques halogénés

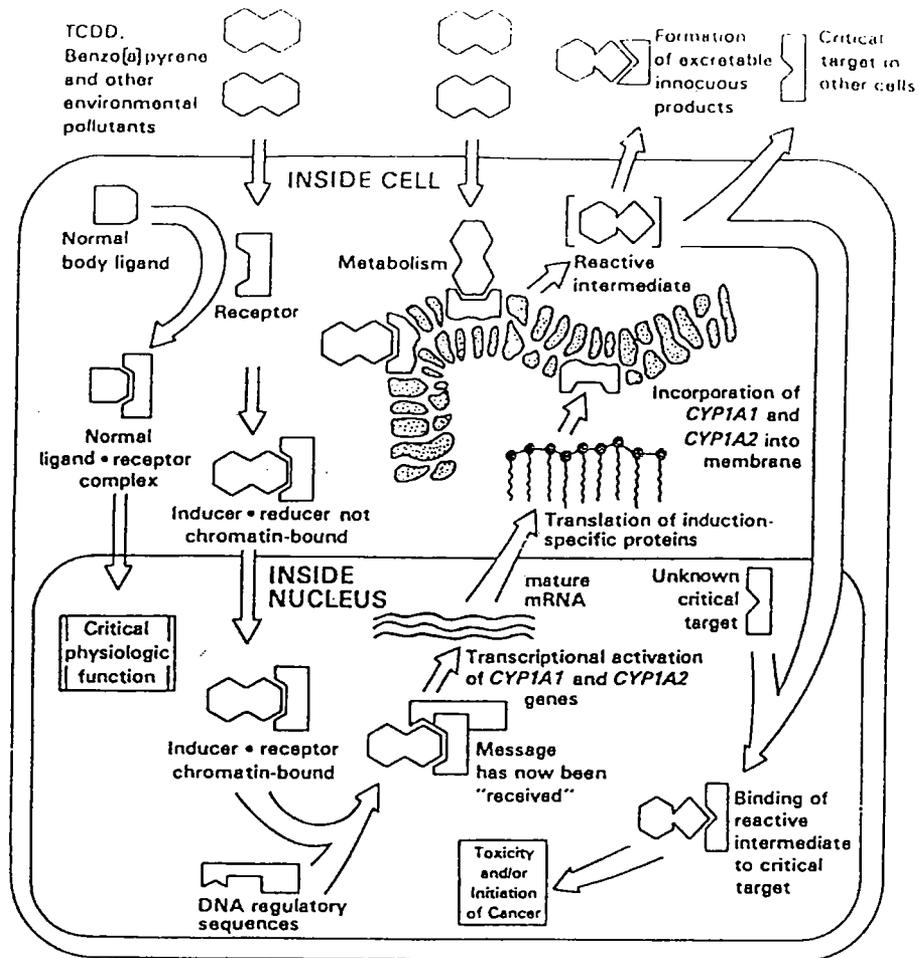


Figure 12 : Induction des gènes *CYP1A1* et *CYP1A2* par le récepteur *Ah* dans une cellule de mammifère (selon Nebert, 1989).

II.1.3.1. Les inducteurs type 3-méthylcholanthrène

Les inducteurs de type 3-méthylcholanthrène (3-MC) sont des molécules planes et lipophiles ; ils regroupent de nombreuses familles de polluants environnementaux comme les HAP, les PCDD et PCDF ou les PCB coplanaires, des molécules d'origine végétale (flavones, indoles) et des produits alimentaires (tableau 4).

L'existence de souris non inductibles a facilité la compréhension du mécanisme d'induction du cytochrome P-450 1A1 (revue par Nebert, 1989) : la capacité d'induction est fortement liée à la structure de l'inducteur, puisque chez des souris ne portant pas l'allèle dominant *b*, nécessaire à l'induction par le 3-MC, le CYP1A1 est quand même inductible par la 2,3,7,8-TCDD. L'induction serait donc liée à un récepteur ayant une forte affinité pour la 2,3,7,8-TCDD (Poland & Glover, 1974).

Tableau 4 : Composés chimiques ayant des propriétés inductrices de type 3-méthylcholanthrène (d'après Batt *et al.*, 1993).

-
- Hydrocarbures aromatiques polycycliques : 3-méthylcholanthrène, B(a)P, benzo(a)anthracène, benzo(a,h)anthracène, benzo(a,c)anthracène
 - PCDD
 - PCDF
 - PCB et PBB
 - Ellipticine
 - Extraits de pétrole brut
 - Produits de la photooxydation de l'histidine et du tryptophane
 - Phénothiazines : β -naphthoflavone et autres flavones
 - Indoles végétaux : indole-3-acétonitrile et indole-3-carbinol
 - Indolocarbazoles (nourriture grillée au barbecue, fumée de cigarettes)
-

La 2,3,7,8-TCDD est le plus puissant inducteur du CYP1A1 : sa capacité d'induction est 30.000 fois supérieure à celle du 3-MC, et sa DE₅₀ est seulement de 0,85 nmol/kg (Poland & Glover, 1974). Le gène *CYP1A1* n'est pas exprimé constitutivement et peut être induit dans de nombreux organes par l'intervention d'un inducteur associé à un récepteur. Deux types de récepteurs sont connus : le récepteur *Ah* ("arylhydrocarbon") découvert en 1976 par Poland *et al.* également appelé récepteur de la dioxine ("dioxin-like" receptor) ou récepteur 8S, peut se lier avec la dioxine ou le 3-MC ; les benzopyrènes induisent le CYP1A1 en se liant à un autre récepteur, la protéine 4S. Ces deux récepteurs agissent d'une façon semblable, mais le complexe ligand récepteur se lie sur une séquence différente de l'ADN.

Le mécanisme de l'induction par la TCDD est maintenant bien connu (figure 12) : la TCDD se lie au récepteur *Ah*, lui-même lié à une protéine de choc thermique (*hsp90*). Le complexe xénobiotique-récepteur-protéine migre dans le noyau, libère la protéine et va se fixer sur une région 5'-flanquante du gène *CYP1A1*, la région XRE (Xenobiotic Responsive

Element) ; une autre région 5'-flanquante du gène interagit en synergie avec le site XRE pour stimuler la transcription du gène *CYP1A1*.

Le récepteur *Ah* est un complexe hétéromérique de plus de 270 kD, constitué de la sous-unité de liaison du xénobiotique (95 kD), de la protéine de choc thermique *hsp90* (90 kD), d'une protéine de 56 kD et peut-être d'une *hsp70*. Ce récepteur a un point commun avec les récepteurs d'hormones thyroïdiennes ou stéroïdiennes : la liaison du site récepteur du xénobiotique (ou de l'hormone) avec la protéine *hsp90* empêche le récepteur de se fixer sur l'ADN. Cette inhibition est levée lorsque l'*hsp90* est éliminée après fixation du xénobiotique.

Il existe des activités cytochrome P-450 dépendantes autres que *CYP1A1* pouvant métaboliser les hydrocarbures aromatiques tels que le B(a)P ou le toluène (*CYP2C11*, *CYP2B1/2*), ce qui explique l'observation d'une activité enzymatique avec des substrats communs sans prétraitement par un inducteur (Nakajima *et al.*, 1994 ; Nakajima & Wang, 1994). Les métabolites produits par le *CYP1A1* sont 10 à 100 fois plus toxiques, mutagènes ou carcinogènes que ceux produits par les autres isoenzymes. Le *CYP1A1* étant inductible chez l'embryon, ce phénomène expliquerait le caractère tératogène de certains inducteurs (notamment les dioxines). Dans le poumon et dans le foie, l'induction du *CYP1A1* est corrélée à la survenue de cancers (revue par Nedelcheva & Gut, 1994).

La régulation du cytochrome P-450 1A1 étant transcriptionnelle, son induction peut être mise en évidence par la quantification de son ARN messager (ARNm) ou par la mesure d'activités enzymatiques qui lui sont spécifiques (par exemple, l'activité AHH).

Le *CYP1A2* est une forme constitutive inductible par les hydrocarbures aromatiques polycycliques et par des amines et des amides aromatiques, présents dans certaines denrées alimentaires (tableau 4). Contrairement aux *CYP1A1*, le *CYP1A2* n'est pas inductible avant la naissance. Son induction est surtout régulée par des mécanismes post-transcriptionnels (stabilisation des ARNm et des protéines), mais l'induction par la TCDD est essentiellement transcriptionnelle.

II.1.3.2. Les inducteurs type phénobarbital

Les inducteurs de type phénobarbital (PB) n'ont pas de spécificité structurale et leur nature chimique est variée (tableau 5). On remarquera la présence de polluants environnementaux parmi ces composés (PCB, insecticides organochlorés ; revue par Nims et Lubet, 1995). Chez le rat, ces composés provoquent une hypertrophie hépatique, une prolifération importante du réticulum endoplasmique lisse dans le foie, et l'induction de nombreuses enzymes intervenant dans le métabolisme des xénobiotiques (*CYP2B1*, *CYP2B2*, époxyde hydrolase, NADPH-cytochrome P-450 réductase, UDP-glucuronyltransférase...). D'autres cytochromes P-450 sont également induits par les inducteurs type phénobarbital (revue par Batt *et al.*, 1993). L'induction des *CYP2B1* et *CYP2B2* nécessite des doses mille fois plus élevées que l'induction des cytochromes de la famille 1A et consiste en l'activation de la transcription de

leurs gènes respectifs (revue par Adesnik & Atchinson, 1986). La transcription des ARNm commence dès les 30 premières minutes après l'administration du barbiturique. Sans induction, l'isozyme CYP2B2 hépatique est très légèrement exprimé, et le CYP2B1 est indétectable.

Tableau 5 : Composés chimiques ayant des propriétés inductrices de type phénobarbital (d'après Okey, 1990 ; Batt *et al.*, 1993).

- Phénobarbital et autres barbituriques	- Octachlorostyrène
- Phénytoïne (5,5'-diphényl-hydantoïne)	- Oxyde de trans-stilbène
- Benzène pentaméthylé	- DDT ⁴ (inducteur chez la souris, mais pas chez le rat)
- PCB non coplanaires	- Acétylamino-2-fluorène

L'absence d'une relation structure/activité suggère que l'induction ne résulte pas d'une reconnaissance entre le substrat et un récepteur, mais pourrait résulter de plusieurs phénomènes (revue par Denison & Whitlock, 1995). Shaw *et al.* (1993) ont mis en évidence l'existence d'une régulation transcriptionnelle : le PB inhiberait l'action d'un répresseur d'où une activation de la transcription, mais des recherches complémentaires sont nécessaires à la compréhension des mécanismes d'activation de la transcription par les inducteurs type phénobarbital. Le fait que l'on n'observe pas d'induction du CYP2B en culture cellulaire ne facilite pas les recherches.

II.1.3.3. Les inducteurs type éthanol

L'induction des cytochromes P-450 par l'éthanol a été mise en évidence par l'observation d'une meilleure dégradation de l'alcool lorsque celui-ci était administré chroniquement (Lieber & De Carli, 1968). L'alcool peut aussi accélérer (induction du cytochrome P-450 correspondant) ou ralentir (par compétition) le métabolisme de certains médicaments. Le cytochrome P-450 2E1 est inductible par diverses molécules de petit poids moléculaire (tableau 6).

Tableau 6 : Composés chimiques ayant des propriétés inductrices de type éthanol (d'après Batt *et al.*, 1993).

- Ethanol	- Acétone
- Isopropanol	- Trichloroéthylène (TCE)
- Imidazole	- Pyrazole
- Isoniazide	- Méthylpyrazole (jeûne ou diabète)

Sur le lieu de travail, certains composés inducteurs sont susceptibles d'être rencontrés à des doses suffisamment élevées pour provoquer une induction ; aux USA, 3,5 millions de

⁴ Dichlorodiphényltrichloroéthane, insecticide organochloré

travailleurs ont été exposés au TCE⁵, 100.000 y sont encore exposés en permanence sur leur lieu de travail (Atkinson *et al.*, 1993). Le jeûne, le diabète ou l'obésité sont également susceptibles d'augmenter les activités du CYP2E1. Le cytochrome P-450 2E1 métabolise de nombreux solvants (DMSO, mercaptoéthanol, glycérol...), le CCl₄, divers alcools, le benzène et certains médicaments comme l'influrane (anesthésique).

La régulation de l'induction du CYP2E1 est transcriptionnelle et post-transcriptionnelle, mais la régulation post-translationnelle prédomine lors des inductions par les xénobiotiques.

II.1.3.4. Les inducteurs type prégénolone 16 α -carbonitrile

Les inducteurs type prégénolone 16 α -carbonitrile (PCN) présentés dans le tableau 7 induisent les cytochromes P-450 3A1, 2B1/2 et 2C6 du rat. Ces cytochromes interviennent essentiellement dans le métabolisme de molécules endogènes comme les stéroïdes, ou de molécules exogènes comme les antibiotiques macrolides ou la cyclosporine. La PCN et la dexaméthasone activent la transcription du gène *CYP3A1* par une régulation *cis* : une région de l'ADN voisine du gène sensible à ces deux inducteurs a été mise en évidence (revues par Batt *et al.*, 1993 ; Denison & Whitlock, 1995).

Tableau 7 : Composés chimiques ayant des propriétés inductrices de type cyanoprégénolone (d'après Batt *et al.*, 1993).

- Glucocorticoïdes endogènes et synthétiques	- Diphénylhydantoïne
- Dexaméthasone	- DDT
- Spironolactone	- PCB
- PB	- antibiotiques de type macrolides
- Imidazoles antifongiques (clotrimazole, kétoconazole)	(triacétyloléandomycine, érythromycine, rifampicine)

II.1.3.5. Les inducteurs de la prolifération des peroxysomes

Les agents hypolipémiants (clofibrate, ciprofibrate), certains stéroïdes naturels, les agents plastifiants (phtalates) et certains herbicides (chlorophénoxyacides ; revue par Nims & Luby, 1995) induisent une hépatomégalie, associée à la prolifération des peroxysomes et à une augmentation de l'activité catalase et des cytochrome P-450 4A impliqués dans le métabolisme des acides gras, des leucotriènes et des prostaglandines. Un récepteur nucléaire de la famille des récepteurs hormonaux intervient dans l'induction des CYP4A en se fixant sur une région régulatrice du gène (revue par Batt *et al.*, 1993 ; Denison & Whitlock, 1995).

⁵ Solvant largement utilisé dans les industries chimiques ou pharmaceutiques et comme dégraissant des métaux

THE INTACT ANIMAL - GENERALIZATIONS

HIGH P₁-450 LEVELS ARE Beneficial WHEN:

1. high P₁-450 levels are tightly coupled with high levels of Phase II conjugating enzymes
2. the PAH precarcinogen is given orally or IP

→ "first pass clearance" of carcinogen

Examples: a) high P₁-450 in liver protects peripheral tissues

- mammary gland
- bone marrow

b) high P₁-450 in placenta may protect the fetus from PAHs

HIGH P₁-450 LEVELS ARE Detrimental WHEN:

1. high P₁-450 is *not* accompanied by high levels of Phase II enzymes
2. the PAH precarcinogen is applied directly to a susceptible "target" tissue

Examples: • lung tumors (smoke inhalation)
• skin tumors (topical PAH application)
• sarcomas (subcutaneous injection)

Figure 13 : Conséquences bénéfiques ou néfastes de l'induction du cytochrome P-4501A1 : importance des activités de phase II et du mode d'exposition (selon Okey, 1990).

II.1.4. Conséquences toxicologiques de l'induction

Les composés inducteurs métabolisés par les cytochromes P-450 induisent leur propre métabolisme et stimulent le métabolisme d'autres substrats, exogènes ou endogènes (stéroïdes), dont l'oxydation est catalysée par la forme de cytochrome P-450 induite.

Le métabolisme des xénobiotiques génère des métabolites soit moins toxiques (détoxication), soit plus toxiques (activation métabolique) que le composé initial. La prise en charge des métabolites dépend de l'équilibre entre la production de métabolites lors de la phase I et leur prise en charge par les enzymes de phase II (figure 13). Chez les animaux non traités, les CYP1A représentent environ 5% du total des cytochromes P-450, et dans ces conditions, les enzymes de phase II peuvent éliminer tous les intermédiaires réactifs (Ayrton *et al.*, 1990). L'induction des enzymes de phase II par les xénobiotiques est possible (Mäntilä *et al.*, 1983 ; Hanioka *et al.*, 1995 ; Schrenk *et al.*, 1995 ; Van Birgelen *et al.*, 1995 ; Madra *et al.*, 1996) mais elle est souvent plus faible que celle des monooxygénases à cytochromes P-450 ; un déséquilibre entre les deux phases peut se produire et les métabolites réactifs sont alors libérés dans l'organisme. Ainsi, même si le phénomène d'induction n'a pas de signification toxicologique univoque, il faut tout de même tenter de déterminer si il n'est pas préjudiciable à l'individu, en tenant compte de la nature de l'inducteur (qui détermine quel cytochrome P-450 et quelles enzymes de conjugaison seront mis en oeuvre), de la nature du substrat métabolisé (connu ou non pour ses métabolites réactifs) et de la voie d'administration qui détermine en partie les organes et les tissus cibles.

Deux types de molécules toxiques peuvent être générées : des métabolites du substrat inducteur du cytochrome P-450 ou des entités oxygénées réactives. Le problème posé par ces dernières sera traité plus loin.

II.1.4.1. Cellules cibles des métabolites réactifs

Le foie, organe central du métabolisme des xénobiotiques, est particulièrement exposé aux métabolites toxiques mais toutes les cellules ayant une activité métabolique inductible produisant des entités réactives (les cytochromes P-450 1A et 2E1 notamment) sont susceptibles de subir leur agression (par exemple, les cellules du système immunitaire ; Germolec *et al.*, 1995). La voie d'exposition, qui détermine la répartition du xénobiotique dans les organes et les tissus, joue un rôle important dans la localisation des conséquences toxiques.

II.1.4.2. Cytochromes P-450 impliqués dans la production de métabolites réactifs

Le *N*-nitrosodiméthylamine (NMDA) est un contaminant ubiquiste de notre environnement : il est présent à faible concentration dans l'air, de nombreux aliments, l'eau, le tabac, les

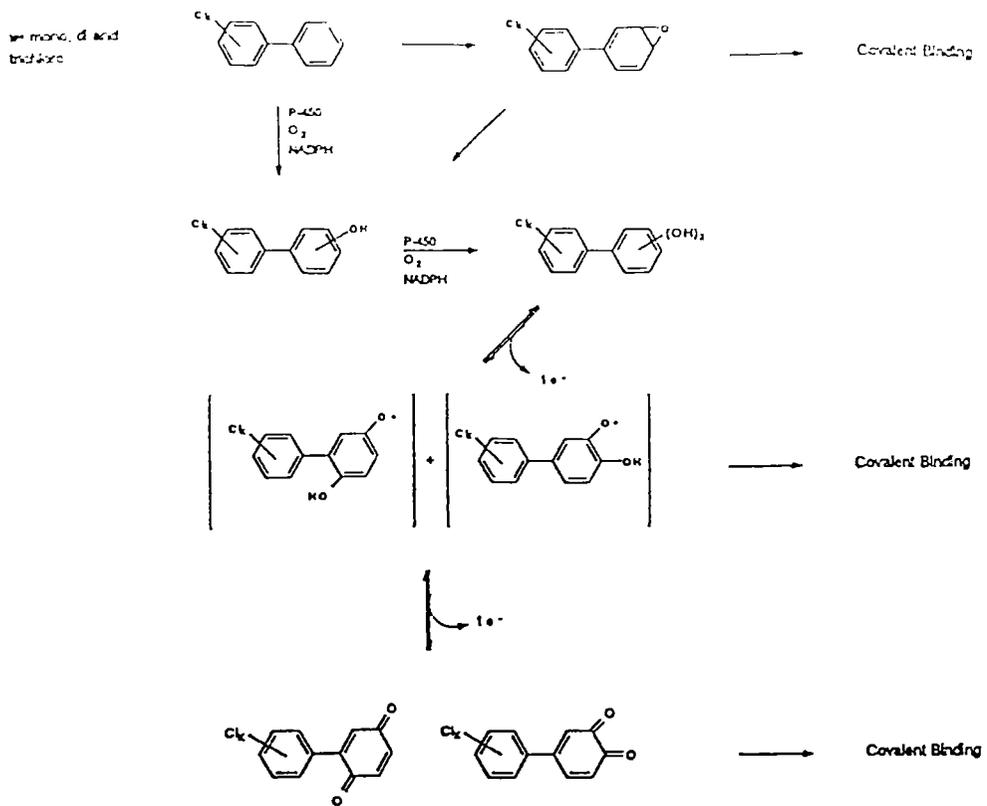


Figure 14 : Activation des PCB faiblement chlorés *via* des intermédiaires semi-quinoniques et des quinones (selon Oakley *et al.*, 1996).

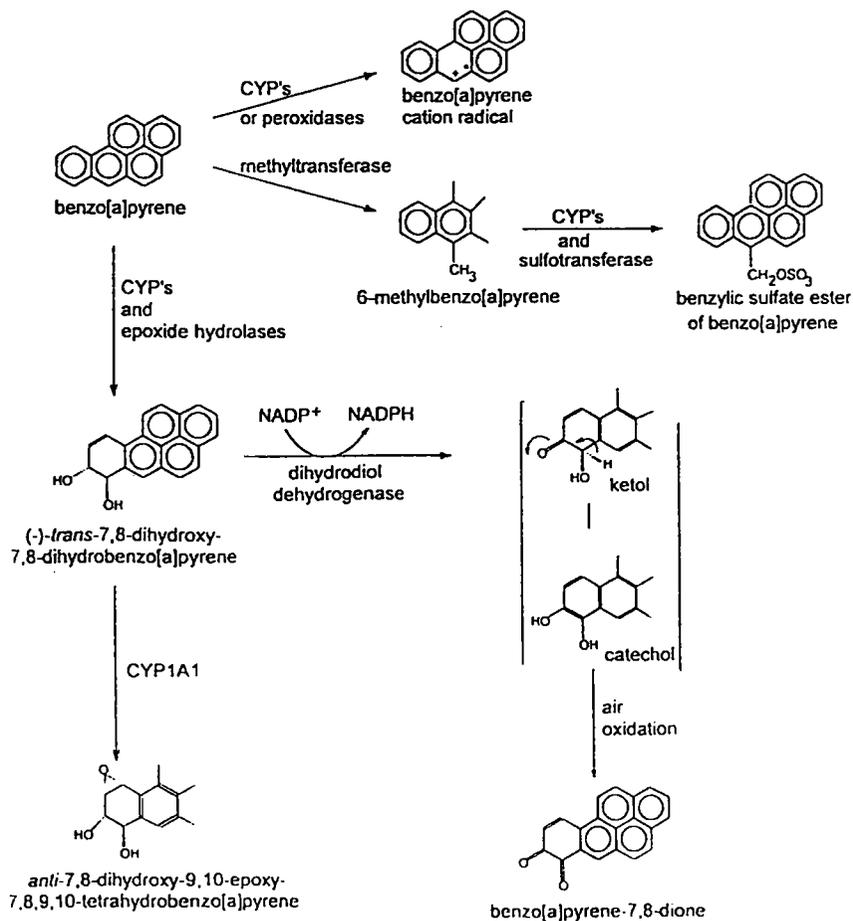


Figure 15 : Activation métabolique du B(a)P et réaction catalysée par la dihydrodiol déshydrogénase (selon Flowers-Geary *et al.*, 1996).

boissons alcoolisées... Seule l'activité *N*-déméthylase du CYP2E1 peut métaboliser le NMDA en un puissant mutagène et/ou carcinogène (Tu & Yang, 1983) ; l'alcool, inducteur du CYP2E1 peut indirectement générer davantage de métabolites carcinogènes (Tsutsumi *et al.*, 1993).

L'induction du cytochrome P-450 4A1 a été corrélée au développement de carcinomes chez des rongeurs traités par des inducteurs de la prolifération peroxysomale. En fait, le cytochrome P-450 procéderait non pas par activation de xénobiotiques en métabolites génotoxiques, mais par augmentation des activités peroxysomales (peroxydation des acides gras) ce qui conduit à la formation accrue de peroxyde d'hydrogène pouvant altérer l'ADN ou initier la peroxydation lipidique.

Les inducteurs type PB sont promoteurs de tumeurs hépatiques, mais ce ne serait pas toujours lié à leur capacité d'induction ; l'induction du CYP2B1 par des PCB a été corrélée à la promotion de tumeurs hépatiques (Lubet *et al.*, 1989).

Les cytochromes P-450 1A1 et 1A2 génèrent des molécules électrophiles très réactives, capables d'attaquer des groupements nucléophiles (-NH, -OH, -SH) présents sur les acides nucléiques (adduits à l'ADN) ou les protéines (adduits à l'hème) : les amines aromatiques hétérocycliques, par exemple les dérivés du tryptophane issus d'une pyrolyse, ont un pouvoir carcinogène reconnu, lié à la formation de métabolites réactifs par les CYP1A2 (Hashimoto & Degawa, 1995). Certains HAP et certains PCB sont connus pour leur génotoxicité et leur carcinogénicité.

II.1.4.3. Activation métabolique des PCB

Les congénères fortement chlorés sont assez résistants au métabolisme, mais les congénères peu substitués sont souvent hydroxylés par les cytochromes P-450 1A et 2B. Les métabolites des PCB sont des mono- ou polychlorobiphényles monohydroxylés, formés par l'isomérisation d'un oxyde d'arène intermédiaire ou par l'insertion directe du groupe hydroxyle. L'époxyde peut soit former des adduits aux macromolécules (Dubois *et al.*, 1995 ; McLean *et al.*, 1996a), soit être conjugué au glutathion sous l'action d'une glutathion *S*-transférase, soit être à nouveau hydroxylé par une époxyde hydrolase pour donner naissance à un dihydrodiol.

Les PCB conjugués au glutathion peuvent subir un clivage de la liaison C-S au niveau intestinal et, après méthylation du thiol, être réabsorbés et subir une *S*-oxydation pour donner un métabolite méthylsulfoné. Ces métabolites se répartissent dans tout l'organisme avec une préférence pour le rein et le poumon, où ils se lient à des protéines ressemblant à des utéroglobines. La signification toxicologique de ces interactions n'est pas connue (revue par Safe, 1994).

Les dihydrodiols peuvent donner naissance à des intermédiaires semi-quinoniques puis des catéchols, des quinones et des hydroquinones (figure 14 ; revue par Oakley *et al.*, 1996 ;

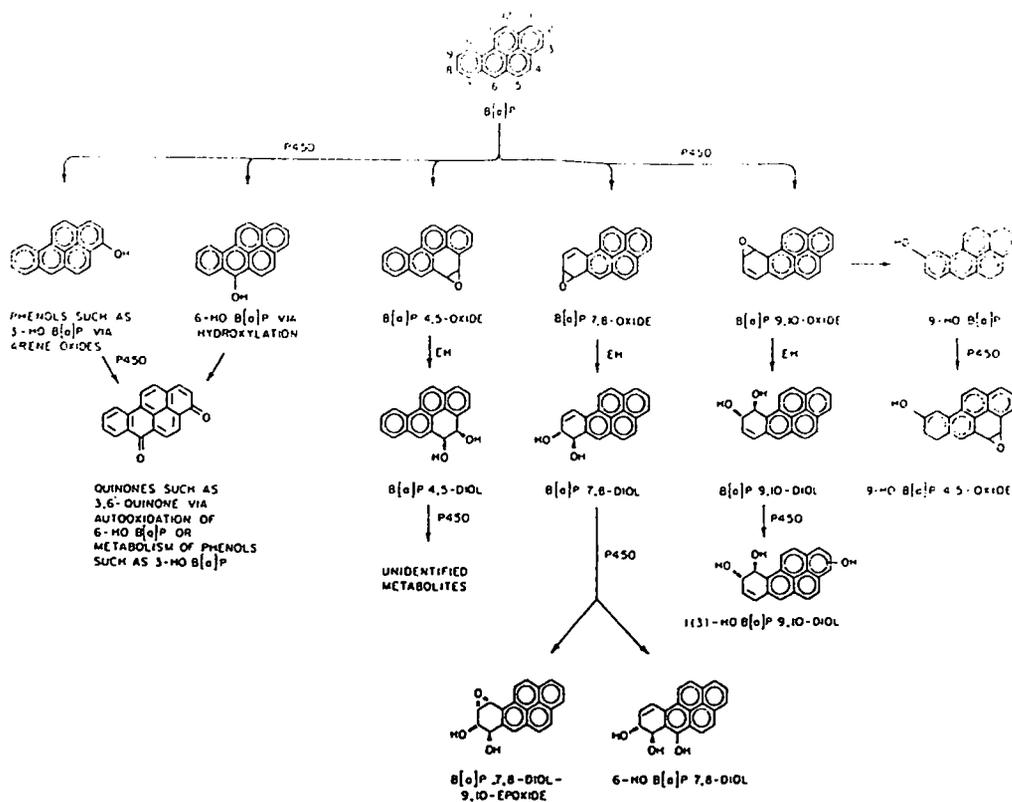


Figure 16 : Métabolisme du B(a)P par le cytochrome P-450 et l'époxyde hydrolase microsomaux. La stéréochimie est arbitraire (selon Levin et al., 1982).

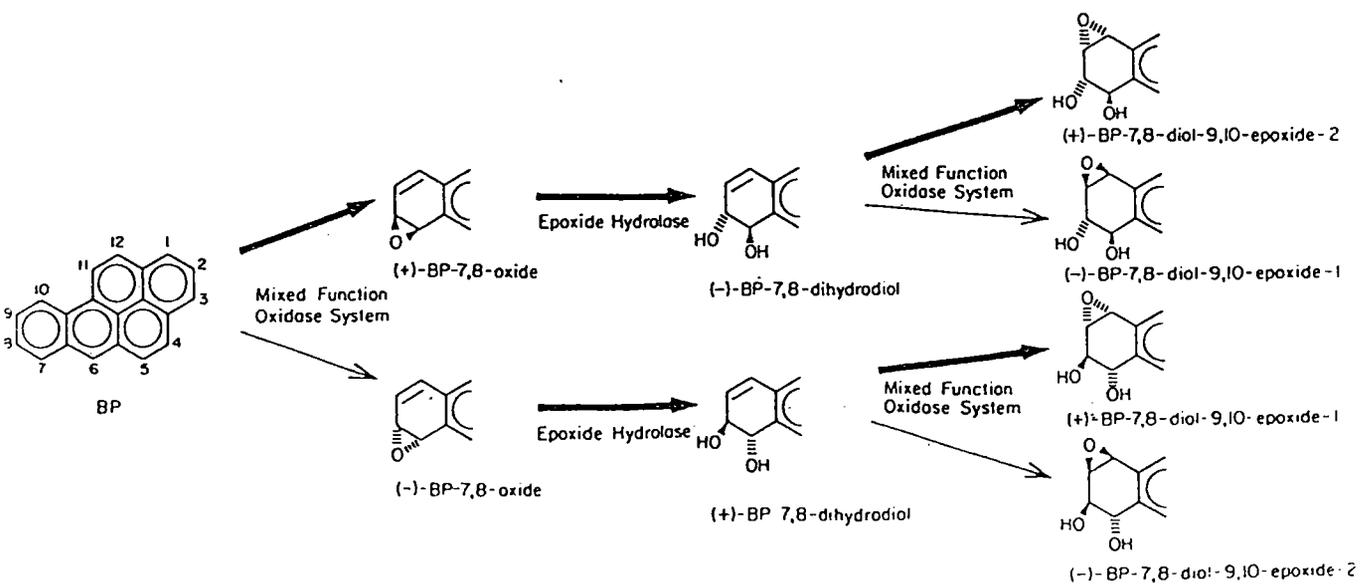


Figure 17 : Métabolisme stéréosélectif du B(a)P en un métabolite ultime carcinogène par les microsomes de foie de rat. Les flèches épaisses indiquent les voies majeures du métabolisme. La stéréochimie absolue de tous les métabolites est indiquée (selon Levin *et al.*, 1982).

McLean *et al.*, 1996b). Les semi-quinones, les catéchols et les quinones sont des entités électrophiles capables de se lier de façon covalente à des centres nucléophiles comme les protéines (par exemple, la transthyretine, protéine majeure du transport de la thyroxine) et les acides nucléiques et de créer un stress oxydant (Amaro *et al.*, 1996 ; Oakley *et al.*, 1996). Les catéchols et les quinones ont la particularité d'être mutagènes dans les cellules de mammifères V79, sans que le test d'Ames soit positif (avec ou sans S9).

II.1.4.4. Activation métabolique des HAP

Nous n'aborderons ici que le mécanisme d'activation du B(a)P qui peut suivre plusieurs voies (figure 15 ; Flowers-Geary *et al.*, 1996) :

a) la méthylation du B(a)P en position C⁶ conduit à la formation d'un 6-méthylbenzo(a)pyrène qui peut être conjugué à un groupement sulfate. Le groupement méthylsulfate peut facilement se séparer du B(a)P pour donner naissance à un ion carbonium benzylique, extrêmement réactif avec l'ADN. Le 6-méthylbenzo(a)pyrène est reconnu comme un procarcinogène des plus puissants,

b) l'oxydation du B(a)P par un seul électron donne un radical cationique, lui aussi capable d'attaquer l'ADN,

c) enfin, le B(a)P peut être oxydé en époxyde et en phénol par les monooxygénases à cytochromes P-450. Les époxydes sont des molécules instables : le 2,3-époxyde est converti en 3-OH-B(a)P, métabolite principal du B(a)P. Les 4,5-, 7,8- et 9,10-époxydes peuvent être soit directement conjugués puis éliminés, soit convertis en phénols puis en quinones, soit transformés en diols de façon stéréospécifique par une époxyde hydrolase. Les O-quinones sont génératrices d'entités oxygénées réactives et de radicaux semi-quinoniques susceptibles d'altérer l'ADN (revue par Flowers-Geary *et al.*, 1996).

Comme les phénols, les diols peuvent être conjugués pour être éliminés, ou subir une seconde oxydation catalysée par le cytochrome P-450, qui aboutira à des diol-époxydes (figure 16) : le B(a)P-*trans*(+)-7,8-diol-9,10-époxyde est un métabolite ultime du B(a)P extrêmement réactif vis-à-vis des macromolécules biologiques. Il provient de l'oxydation stéréospécifique du 7,8-époxyde en un *trans* (-) 7,8 diol-époxyde, lui-même oxydé en un *trans*(+)7,8-diol-9,10-époxyde (figure 17). Le stéréoisomère (-) de cette molécule n'a pas d'activité carcinogène, alors que le B(a)P-*trans*(+)-7,8-diol-9,10-époxyde est particulièrement réactif vis-à-vis des macromolécules (Levin *et al.*, 1982) et provoque l'apparition de tumeurs cutanées et pulmonaires chez la souris. Comme nous le verrons plus loin, les métabolites réactifs sont aussi à l'origine d'effets immunotoxiques.

II.1.4.5. Mécanismes de cancérogenèse

La cancérogenèse dépend de plusieurs événements : l'initiation, la promotion et la progression. La prolifération anormale des cellules tumorales est due à l'expression

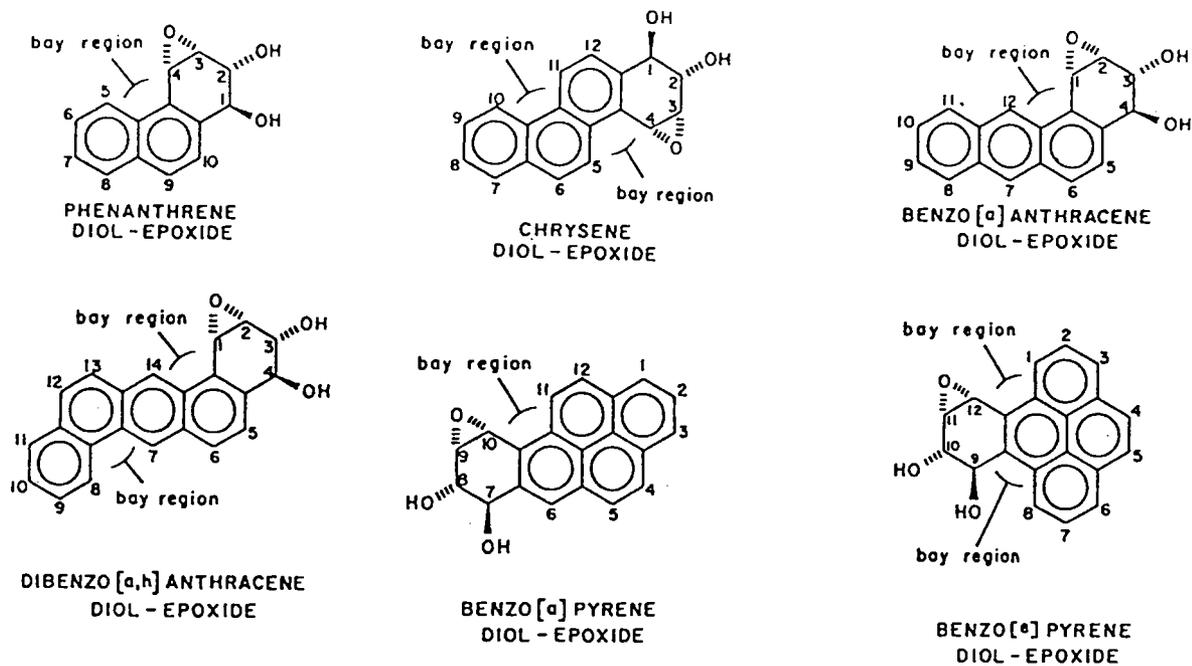


Figure 18 : Région "baie" des diol-époxydes de plusieurs HAP. La stéréochimie est arbitraire (selon Levin *et al.*, 1982).

d'oncogènes ou à l'inhibition de gènes suppresseurs. Les oncogènes sont des gènes codant pour des produits impliqués dans la transformation cellulaire. Dans une cellule normale, ces gènes ne sont pas exprimés et sont appelés proto-oncogènes. Le proto-oncogène peut être exprimé à la suite d'une altération de l'ADN (initiation). Si la lésion n'est pas réparée, les cellules initiées prolifèrent pour donner une tumeur bénigne, puis maligne, puis des métastases (progression).

Il existe deux types de mécanismes cancérigènes : la cancérogenèse génotoxique et la cancérogenèse épigénétique (Shaw & Jones, 1994). Certains composés sont carcinogènes complets (initiateur et promoteur), d'autres sont soit initiateur, soit promoteur. L'initiation génotoxique peut être mise en évidence par des tests de mutagenèse sur bactéries ou sur cellules de mammifères, mais les tests de mutagenèse ne permettent pas de prouver la carcinogénicité d'une molécule (il existe des carcinogènes non mutagènes (le benzène par exemple) et des mutagènes non carcinogènes ; revue par Yoshikawa, 1996).

II.1.4.6. Pouvoir carcinogène des HAP

Les HAP et notamment le B(a)P, sont carcinogènes chez les rongeurs : de nombreuses études ont mis en évidence leur rôle dans le développement de cancers par différentes voies d'administration (application topique, instillation intratrachéale, inhalation). Quelle que soit la voie d'administration, le poumon semble être un organe particulièrement sensible au développement de tumeurs.

Différentes études portant sur le métabolisme des HAP, leur mutagénicité et leur carcinogénicité et la relation entre leur structure et leur activité toxique, ont permis de mettre en évidence une relation entre la structure de leurs diol-époxydes et leur caractère carcinogène : les diol-époxydes portant la fonction époxyde sur un cycle benzénique saturé adjacent à une structure décrivant une "région baie" sont particulièrement carcinogènes chez les souris (figure 18 ; Levin *et al.*, 1982).

Les cancérogènes chimiques génotoxiques se fixent de manière covalente à l'ADN pour former des adduits à l'ADN, ce qui peut provoquer une mutation (transition, transversion, décalage du cadre de lecture), une alkylation, une intercalation entre les bases ou la cassure d'un brin d'ADN. Par exemple, le (+)7,8-diol-9,10-époxyde du B(a)P se fixe sur le groupement amine en position N² de la désoxyguanosine et sur le groupement amine en position N⁶ de la désoxyadénosine. Ces adduits provoquent la transversion G → T et A > T.

Le pouvoir génotoxique des HAP dépend de leur aptitude à être transformés en métabolites génotoxiques (Levin *et al.*, 1982). Il peut être évalué par différentes méthodologies nettement moins longues et moins lourdes que l'étude de leur carcinogénicité, qui nécessite des essais à long terme (jusqu'à 2 ans). Parmi les tests les plus courants, nous citerons la recherche de micronoyaux (clastogénicité), la recherche d'adduits à l'ADN et la mesure des échanges de chromatides soeurs (translocation chromosomique).... Ces

méthodologies offrent l'avantage d'être rapides et non invasives pour certaines (praticables sur des lymphocytes) mais elles ne peuvent détecter les agents induisant des cancers épigénétiques.

II.1.5. Inhibition des activités cytochrome P-450 dépendantes

La synthèse des cytochromes P-450 peut être inhibée au niveau de la transcription (cycloheximide, cytokine) ou de la traduction (inhibiteurs non spécifiques comme l'actinomycine D ou la puromycine).

L'étude de l'inhibition des activités enzymatiques cytochrome P-450 dépendantes au niveau post-traductionnel a permis de caractériser différents isozymes et de mieux connaître le fonctionnement du cycle catalytique du complexe enzymatique. Théoriquement, trois étapes du cycle peuvent faire l'objet d'une inhibition : la fixation du substrat, la fixation de l'oxygène moléculaire et le transfert de l'oxygène au substrat. Il existe trois modes d'inhibition :

- inhibition réversible : les molécules capables de se fixer sur le site catalytique sont des inhibiteurs de la transformation du substrat. La compétition peut avoir lieu au niveau a) de la fixation du substrat sur la partie protéique, b) de la fixation de l'oxygène (liaison de coordination avec le fer hémique à l'état ferreux (monoxyde de carbone) ou ferrique (cyanures) ou c) de la fixation du substrat sur la protéine et l'hème : l'inhibiteur établit une coordination avec le fer et une liaison avec un résidu de la protéine situé dans le site de fixation (pyridines, imidazoles, 7,8-benzoflavone, métyrapone...),

- inhibition par formation d'un complexe intermédiaire [cytochrome P-450—métabolite] : le cytochrome P-450 peut générer un métabolite réactif ayant une grande affinité pour le fer hémique, ce qui résulte en un complexe stable. C'est le cas des benzodioxoles (safrole, isosafrole), des synergistes d'insecticides (qui inhibent le métabolisme de l'insecticide), de certaines hydrazines et des antibiotiques macrolides,

- inhibition irréversible : les substrats suicides sont oxydés par le cytochrome P-450 en une forme réactive qui se fixe irréversiblement sur l'hème (oléfines, dihydropyridines, cyclopropylamides, tétrachlorure de carbone) ou sur la partie protéique du cytochrome P-450 (chloramphénicol, parathion, malathion).

Les inhibiteurs permettent l'étude des structures, des mécanismes et du rôle biologique des cytochromes P-450. Les substrats suicides présentent l'avantage d'agir avec une grande spécificité, ce qui n'est pas le cas des inhibiteurs réversibles. Ainsi, la 7,8-benzoflavone permet de prouver qu'une réaction est catalysée par le CYP1A1. Les domaines médical (inhibition du métabolisme d'un médicament) et phytosanitaire (inhibition du métabolisme des pesticides) sont particulièrement intéressés par l'étude des inhibiteurs spécifiques (Van Wauwe & Janssen, 1989 ; Jayyosi *et al.*, 1991).

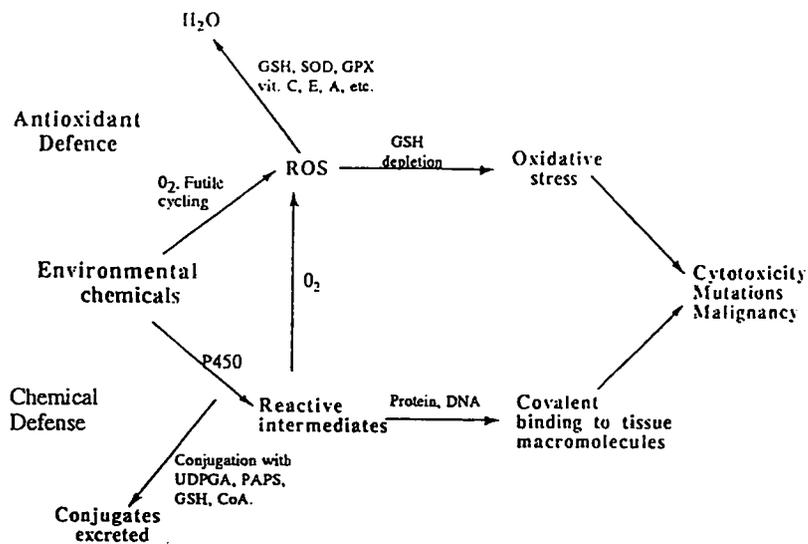
II.1.6. Les activités cytochrome P-450 extrahépatiques

Les cytochromes P-450 sont répartis dans de nombreux organes (Foster *et al.*, 1986) : tractus gastro-intestinal (Strobel *et al.*, 1993), épithélium olfactif (Ding & Coon, 1993 ; Béréziat *et al.*, 1995), rein (Funae *et al.*, 1985 ; Kim *et al.*, 1995), cerveau (Bhagwat *et al.*, 1995a et b), peau, poumon ... La répartition et le niveau d'expression des différents isozymes est variable selon les organes (revue par Murray & Burke, 1995).

La peau est un organe majeur par la surface qu'elle représente et par son rôle comme porte d'entrée des xénobiotiques. Le derme et l'épiderme sont pourvus d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques de phase I, notamment les monooxygénases à cytochromes P-450 1A et 2B et d'enzymes de phase II. Les CYP1A et 2B sont inductibles. Les CYP1A sont, comme dans le foie, à l'origine de métabolites mutagènes et/ou carcinogènes et peuvent être inhibés par des phénols issus des plantes (acide allagique) ou par des antifongiques (dérivés de l'imidazole). Ces inhibitions peuvent aussi s'accompagner de l'induction d'activités glutathion *S*-transférases (revue par Kao & Carver, 1990).

Le poumon comporte une quarantaine de types cellulaires différents, avec des capacités métaboliques différentes (revue par Kikkawa, 1992). Les cellules pulmonaires sont pourvues d'enzymes de phase I et de phase II (Minchin & Boyd, 1983 ; revue par Baron & Voigt, 1990). Les cellules les plus actives sur le plan métabolique sont les cellules bronchoalvéolaires de Clara et les pneumocytes de type II (alvéolaires) ; les cellules ciliées de l'épithélium bronchique, les cellules endothéliales et les macrophages alvéolaires sont également actifs, mais dans une moindre mesure (Forkert *et al.*, 1986 ; Keith *et al.*, 1987 ; Kudo, 1994 ; Pairon *et al.*, 1994 ; Lee & Dinsdale, 1995).

Bien que le niveau de cytochrome P-450 pulmonaire soit faible si on le compare au foie (7% de la teneur hépatique), le poumon est capable de métaboliser un grand nombre de xénobiotiques (revue par Arinç, 1993). Le CYP1A1 n'est pas exprimé de manière constitutive dans le poumon, mais il est hautement inductible par les inducteurs type 3-MC dans les cellules de Clara, les pneumocytes de type II et les cellules endothéliales veineuses (Forkert *et al.*, 1986 ; Keith *et al.*, 1987 ; Pairon *et al.*, 1994). En revanche, le cytochrome P-450 1A2 est très peu exprimé et n'est pas inductible par le 3-MC. Chez le rat adulte, le CYP2B1 est l'isozyme constitutif majoritaire dans le poumon ; il est exprimé dans les cellules de Clara et les pneumocytes de type II. L'inductibilité de cette forme par le phénobarbital est beaucoup plus faible que dans le foie. Le cytochrome P-450 2B2 n'est exprimé ni chez les rats non traités, ni chez les rats traités par du phénobarbital. Ces deux formes de cytochrome P-450 ne sont pas exprimées chez le fœtus. Les cytochromes P-450 2A3 et 4B1 pulmonaires sont exprimés constitutivement (ce qui n'est pas le cas dans le foie) ; le CYP 2A3 est inductible par le 3-MC mais il est inhibé par le PB (Kimura *et al.*, 1989, cité par Arinç, 1993) ; le CYP4B1 n'est pas induit par le PB.



SOD = superoxide dismutase ; GPX = glutathione peroxidase; ROS = reactive oxygen species; GSH = glutathione; UDPGA = uridine diphosphoglucuronic acid; PAPS = phosphoadenosine-phosphosulphate.

Figure 19 : Rôle des systèmes de détoxication et de défense antioxydante dans la protection contre la toxicité des produits chimiques (selon Parke et Ioannides, 1994).

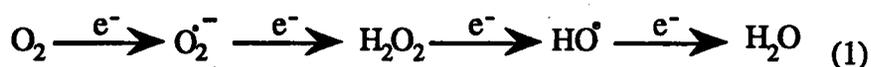
Chez l'homme, les cytochromes P-450 pulmonaires sont quantitativement moins importants que chez le rat ou le lapin (le rapport P-450 total poumon/foie est différent) mais les CYP1A1 et CYP1A2 sont exprimés de façon constitutive chez l'homme (revue par Foth, 1995).

II.2. Les systèmes de défense contre le stress oxydant

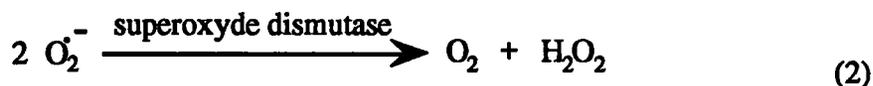
Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre les conditions pro-oxydantes et les défenses antioxydantes dans les tissus et les organes. Le stress oxydant peut donc être la conséquence de la production accrue de composés oxydants, d'une diminution des défenses, ou de l'association de ces deux situations. Comme le montre la figure 19, le système de détoxification intervient dans la production d'entités réactives.

II.2.1. Les espèces oxygénées réactives

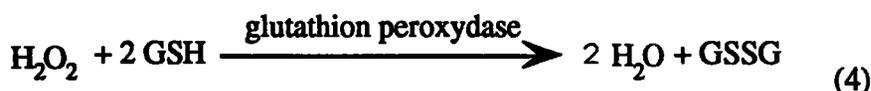
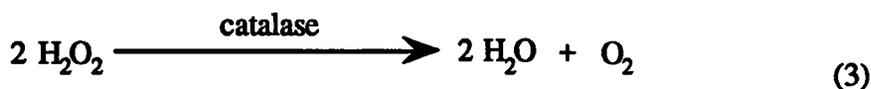
Les espèces réactives de l'oxygène sont formées dans les systèmes biologiques à partir de la réduction de l'oxygène moléculaire (O_2), selon la réaction (1).



L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) est à la fois réducteur et oxydant. Cette forme instable peut générer des formes plus réactives, comme le radical hydroperoxyde (OH^{\cdot}) ou le radical superoxyde protoné (HO_2^{\cdot}). La dismutation de l'anion superoxyde, spontanée ou catalysée par la superoxyde dismutase (2), conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).



En l'absence d'ion métallique, le peroxyde d'hydrogène n'est pas très réactif et peut être détruit par la catalase (3) ou la glutathion peroxydase (4).



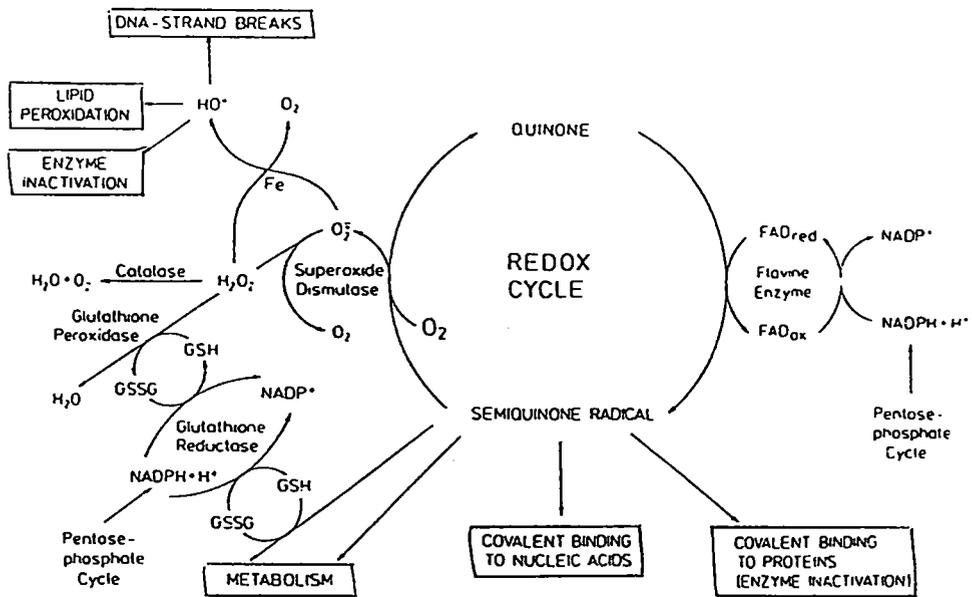
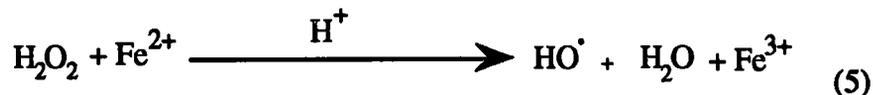


Figure 20 : Cycle rédox d'un composé quinonique par une réductase, par exemple une NADPH-cytochrome P-450 réductase (selon Kappus, 1993).

Par contre, en présence d'un donneur d'électron (Fe^{2+} par exemple), le peroxyde d'hydrogène conduit à la formation du radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$) par la réaction de Fenton (5).



Comme tout radical libre, le radical hydroxyle est une espèce moléculaire rendue très réactive par l'existence d'un électron non apparié sur une orbitale extérieure. Ces radicaux peuvent devenir toxiques pour les cellules et les tissus (inactivations enzymatiques, peroxydation lipidique, altérations du génome) ; ils interviennent aussi largement dans les états inflammatoires. Les réactions en chaîne de la peroxydation lipidique peuvent conduire à la formation de l'oxygène singulet qui, comme les radicaux libres, peut détruire les membranes cellulaires ou les lipides extracellulaires.

II.2.2. Formation des entités oxygénées réactives et des radicaux libres

La production de ces différentes espèces réactives peut être provoquée lors d'une exposition à des radiations ionisantes, d'une réaction inflammatoire (activation du métabolisme des cellules phagocytaires) ou au cours de processus métaboliques comme la respiration cellulaire, la synthèse de prostaglandines ou l'activités de certains cytochromes P-450. Des substances se comportant comme un système redox (pouvant réduire l'oxygène moléculaire par transfert d'un électron : quinones, ions bipyridiliums, composés aromatiques nitrés, catéchols, ...) sont également sources d'entités oxygénées réactives.

II.2.2.1. Intervention des cytochromes P-450

Les cytochromes P-450 sont directement ou indirectement (figure 19) générateurs d'entités oxygénées réactives et de radicaux libres (revue par Kappus, 1993 ; Bondy & Naderi, 1994).

Le mauvais couplage entre le site actif du cytochrome P-450 et son substrat peut provoquer la formation de l'anion superoxyde (le deuxième électron du cycle catalytique est récupéré par l'oxygène moléculaire), ensuite dismuté en peroxyde d'hydrogène. Ce phénomène peut se produire avec de nombreux xénobiotiques inducteurs du CYP1A, du CYP2B ou du CYP2E1.

Les cytochrome P-450 peuvent aussi générer des radicaux libres à partir de leur substrat : des molécules comportant des cycles aromatiques (benzène, HAP, PCB) peuvent être métabolisées en quinones potentiellement génératrices d'entités oxygénées réactives et de radicaux libres (semi-quinones ; figure 20), susceptibles d'attaquer les macromolécules biologiques (Flowers-Geary *et al.*, 1993, 1996) et de détruire les cytochromes P-450 (Soucek *et al.*, 1994) ; le métabolisme de l'alcool par le cytochrome P-450 2E1 conduit à la formation du radical ($\text{RC}\cdot\text{HOH}$) et d'entités oxygénées (Poli, 1993 ; Ingelman-Sundberg *et al.*, 1993) ;

le clivage homolytique du tétrachlorure de carbone par les cytochromes P-450 conduit à la formation du radical trichlorométhyle ($\text{CCl}_3\bullet$) ou de son dérivé peroxydé, le radical trichlorométhylperoxyde ($\text{CCl}_3\text{-OO}\bullet$), tous deux susceptibles d'initier la peroxydation lipidique ; la réduction du paraquat par la NADPH-cytochrome P-450 réductase donne un cation radicalaire stable (bipyridilium) capable de réagir avec l'oxygène pour former un anion superoxyde (Tomita & Okuyama, 1994) ; le métabolisme des peroxydes par les cytochromes P-450 génère des radicaux lipoperoxydiques, responsables de l'initiation de la peroxydation des lipides ; les inducteurs de la prolifération des peroxysomes (TCE, clofibrate...) augmentent la consommation d'oxygène, l'oxydation du NADPH et la peroxydation lipidique. Le stress oxydant causé par ces derniers composés peut être lié à leur biotransformation (formation de radicaux), l'inhibition d'enzymes antiradicalaires, la destruction des cellules hépatiques (avec, à forte dose, un processus inflammatoire) et l'induction de la prolifération des peroxysomes (Atkinson *et al.*, 1993).

Les HAP, les TCDDs et certains pesticides (lindane, endrine...) provoquent la formation d'espèces oxygénées réactives dans les macrophages, les mitochondries ou les microsomes hépatiques. L'induction de la production d'entités oxygénées réactives par la TCDD est en partie dépendante du récepteur *Ah* (Alsharif *et al.*, 1994a).

II.2.2.2. Autres sources

Une accumulation de fer consécutive à la destruction de l'hème peut favoriser la formation de radicaux et entités réactives (réaction de Fenton).

La déplétion en molécules piègeuses de radicaux ou réduisant les entités oxygénées (par exemple, déplétion en glutathion par le paracétamol) ou l'inhibition d'activités enzymatiques antioxydantes (par exemple, inhibition des activités SOD et catalase hépatiques par les inducteurs de CYP1A ; Stohs, 1990 ; Mäntylä & Ahotupa, 1993 ou inhibition de la Se-GSH-Px par le fer ; Madra *et al.*, 1996) sont responsables de l'augmentation du stress oxydant.

De nombreux polluants atmosphériques tels que les NOx, l'ozone ou la fumée de cigarettes sont responsables de lésions des cellules alvéolaires de type I, qui servent de barrière entre la voie aérienne (au niveau pulmonaire) et le système circulatoire (revue par Ryrfeldt *et al.*, 1993). L'inhalation de particules d'amiante et/ou de silice conduit à leur phagocytose par des macrophages alvéolaires ; la lyse de ces cellules activées entraîne la libération d'enzymes protéolytiques et de médiateurs chimiotactiques qui attirent des cellules neutrophiles, initiant le processus inflammatoire générateur d'entités oxygénées réactives. L'amiante est d'ailleurs responsable de fibroses, mésothéliomes et carcinomes pulmonaires ou bronchiques. L'inhalation de chlorure de cadmium provoque des modifications morphologiques des cellules pulmonaires associées à la peroxydation des lipides malgré l'induction des enzymes antioxydantes (Vincent *et al.*, 1989).

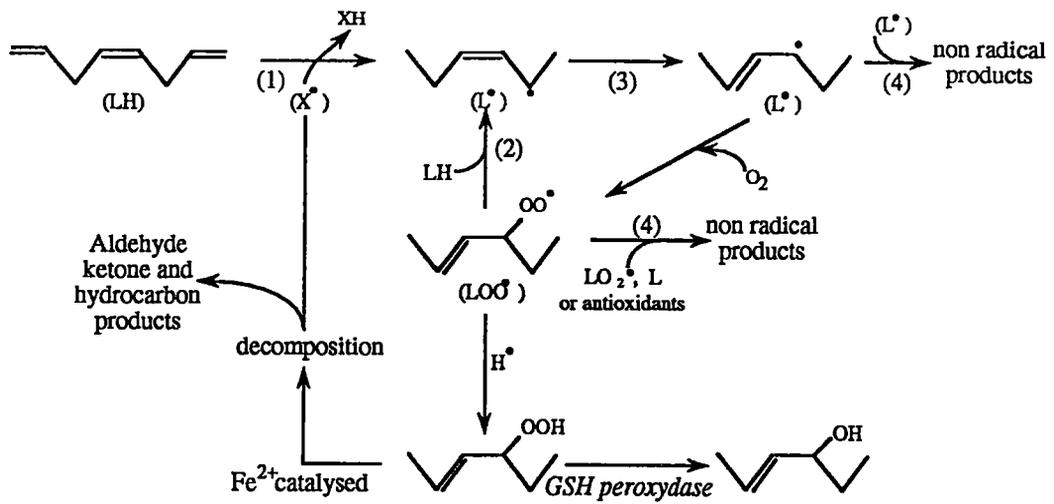


Figure 21 : La peroxydation lipidique et les différentes étapes d'une réaction en chaîne.

- (1) : étape d'initiation X• : radical libre
 (2) : étape de propagation
 (3) : résonance
 (4) : étape de terminaison

II.2.3. Effets toxiques

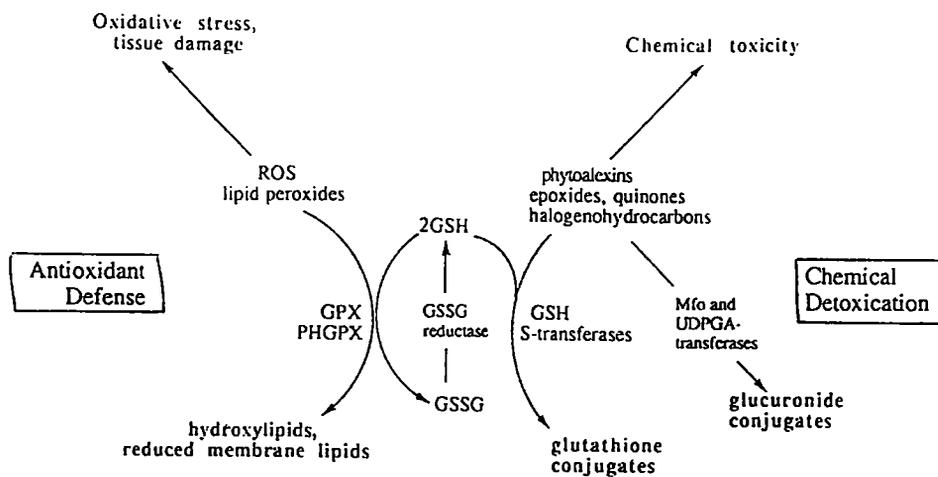
Les composés radicalaires ont la particularité d'initier des réactions en chaîne qui comportent trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison (figure 21). Les lipides insaturés sont de bonnes cibles pour ce type de réactions : la peroxydation lipidique perturbant la fluidité et la perméabilité des membranes conduit à leur désorganisation (Stohs, 1990 ; Bagchi & Stohs, 1993) ; l'augmentation du calcium intracellulaire qui en résulte conduit notamment à l'activation des systèmes calcium-dépendants et à la mort et la destruction cellulaire (Orrenius *et al.*, 1989) ; la désorganisation de la membrane du réticulum endoplasmique, composée de 30 à 40% de phospholipides, perturbe la coopération entre la NADPH-cytochrome P-450-réductase et le cytochrome P-450 (Gut *et al.*, 1985). La peroxydation des lipides membranaires peut aussi conduire à la destruction spécifique de l'hème de certains cytochromes P-450 (Levin *et al.*, 1973 ; Mori *et al.*, 1991) et à la libération de fer dans le milieu cellulaire. La peroxydation lipidique peut également jouer le rôle de catalyseur dans le métabolisme des HAP (oxydation des dihydrodiols en dihydrodiolépoxydes, métabolites ultimes mutagènes et potentiellement carcinogènes ; Dix & Marnett, 1984).

Les radicaux et les entités oxygénées sont capables d'attaquer les protéines et les acides nucléiques pour former des adduits ou oxyder des bases. Les adduits aux protéines conduisent à l'inactivation et la dégradation d'enzymes. L'altération de l'ADN provoque des mutations (qui sont fixées si la réparation n'a pas lieu ou est inefficace) qui peuvent être à l'origine du développement de tumeurs (phase d'initiation). La toxicité des entités oxygénées réactives fait intégralement partie de la toxicité induite par la TCDD (cytotoxicité liée aux altérations des lipides, des protéines et de l'ADN, inactivation des enzymes antioxydantes, augmentation de la protéolyse due à la perte de régulation du calcium et à l'activation des protéases, mutagenèse et activité promotrice de tumeur ; Stohs, 1990 ; Alsharif *et al.*, 1994b). Le traitement par la 2,3,7,8-TCDD de cellules exprimant le CYP1A1 conduit à la formation d'adduits en position N⁸ de la guanosine (Park *et al.*, 1996). *In vitro*, le paraquat induit des aberrations chromosomiques et des échanges de chromatides soeurs sur des fibroblastes (Nicotera *et al.*, 1985). Les entités oxygénées en général, et le radical hydroxyle en particulier, facilitent la formation d'adduits à l'ADN par de grosses molécules (Randerath *et al.*, 1991).

La présence de ces éléments réactifs en trop grande quantité amène un déficit en molécules piégeuses (déficits en cofacteurs enzymatiques, en glutathion (GSH), en vitamine C...). La consommation excessive de NADPH par le système de défense peut perturber le catabolisme de molécules endogènes (comme les stéroïdes) ou d'autres processus physiologiques importants (revue par Miller *et al.*, 1993).

Toutes ces altérations au niveau cellulaire conduisent au vieillissement des cellules (Nohl, 1993 ; Yen *et al.*, 1994). L'impact de ces réactions dépend des cibles atteintes, de

page 38
GSH



GPX = glutathione peroxidase; PHGPX = phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase.
 GSH = glutathione; GSSG = oxidized glutathione; ROS = reactive oxygen species; Mfo = mixed-function oxidation; UDPGA = uridine diphosphoglucuronic acid.

Figure 22 : Rôle du glutathion dans le système de défense antioxydante et le système de détoxication (Parke et Ioannides, 1994).

l'intensité de l'effet toxique, et des capacités des cellules à réparer ou remplacer les molécules affectées.

Malgré son intervention dans des processus toxiques, le peroxyde d'hydrogène est capable de limiter la formation de métabolites carcinogènes et la production d'entités oxygénées réactives en inhibant la transcription des gènes *CYP1A1* et *CYP1A2* (revue par Barker *et al.*, 1994).

II.2.4. Le système de défense

Le système de défense contre ces entités est composé d'activités enzymatiques et de molécules qui protègent les éléments vitaux contre les oxydants en piégeant les radicaux libres.

II.2.4.1. Composés piègeurs de radicaux libres

La solubilité des composés piègeurs de radicaux libres détermine leur champ d'action. Ainsi, les composés liposolubles (vitamine E, provitamine A, β -carotène) protégeront les acides gras de la peroxydation lipidique, et les composés hydrosolubles protégeront les protéines et l'ADN de la formation d'adduits (glutathion, vitamine C). Les chélateurs du fer permettent de lutter contre la production de radicaux hydroxyles (réaction 5). Le glutathion joue un rôle clef dans la lutte contre le stress oxydant (figure 22) : en parallèle avec son rôle dans le système de détoxification (groupement de conjugaison) le GSH peut agir comme réducteur (il est régénéré par la glutathion réductase).

II.2.4.2. Activités enzymatiques

Activité catalase

La catalase est une enzyme principalement peroxysomale qui décompose le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène (réaction 3). Surtout présente dans le foie et les érythrocytes, cette enzyme tétramérique est liée au Fe^{III} d'un hème et à une molécule de NADPH.

Activité glutathion peroxydase

Les glutathion peroxydases sont situées dans le cytosol et la matrice mitochondriale. En association avec une glutathion réductase et en présence d'un système régénérant de NADPH, elle permettent la réduction des peroxydes (figure 22). L'activité glutathion peroxydase peut être catalysée par deux enzymes :

- l'activité glutathion peroxydase séléno-dépendante (Se-GSH-Px) est capable de catalyser la réduction des hydroperoxydes organiques et de l'hydroperoxyde d'hydrogène. C'est un tétramère dont chaque unité est liée à un atome de sélénium (Stadman, 1983). Elle est inhibée par le zinc et l'anion superoxyde.

- l'activité glutathion peroxydase séléno-indépendante (GSH-Px) a pour substrats les peroxydes d'acides nucléiques et lipidiques. Cette fonction de peroxydase est assurée par les glutathion *S*-transférases.

Les glutathion peroxydases ont un rôle clef dans la lutte contre le stress oxydant car elles agissent sur de faibles concentrations de substrat (Toussaint *et al.*, 1993).

Activité superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) est une métalloprotéine qui, en association avec le NADH, dismute l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène selon la réaction (2) déjà décrite. Il existe plusieurs formes de SOD :

- la SOD cytosolique est un dimère de 16 kD par unité, chacune contenant un atome de zinc et un atome de cuivre (Cu-Zn-SOD). Elle peut être inhibée par divers métaux (ou cyanures) se liant au cuivre. Plusieurs formes de Cu-Zn-SOD coexistent dans le milieu extracellulaire.

- la SOD mitochondriale (Mn-SOD) est dimérique ou tétramérique (selon l'espèce), et comprend un atome de manganèse par unité. Cette enzyme n'est pas inhibée par les cyanures, mais elle est inductible par l'anion superoxyde et par des cytokines (chez les mammifères). Le caractère inductible de la SOD montre son importance dans la lutte antiradicalaire.

Bien que l'on considère souvent la SOD et les GSH-Px comme des enzymes cytosoliques, et la catalase comme cytosolique et peroxysomale, ces trois enzymes sont présentes (et actives) dans les peroxysomes (Dhaunsi *et al.*, 1993).

II.3. Les systèmes de défense contre la toxicité des métaux

II.3.1. Métabolisme et stockage des métaux

La pénétration des métaux dans l'organisme, leur métabolisme et leur toxicité dépendent essentiellement de leur spéciation et de la solubilité de leurs dérivés. Par exemple, l'élément mercure Hg⁰ est absorbé 10 fois moins vite et se lie moins fortement aux protéines que le mercure divalent Hg²⁺.

Le métabolisme modifie la spéciation et les organes de stockage sont sélectifs des différentes formes du métal. La formation d'un complexe [métal—molécule organique] facilite leur absorption, leur transport et leur excrétion (par exemple, élimination du complexe biliaire du plomb) : le transport est facilité par la complexation avec une métallothionéine, dont la biosynthèse est induite par le métal lui-même (notamment le cadmium).

Cependant, si ces protéines permettent une forte accumulation de métal sous une forme non toxique, le métal peut être libéré ultérieurement et exercer sa toxicité (par exemple, libération de cadmium dans les tubules rénaux).

II.3.2. Interactions avec les autres systèmes de défense

La voie d'entrée principale des métaux est pulmonaire et, comme nous l'avons vu, le tractus respiratoire est aussi la voie d'entrée de nombreux polluants métabolisés par le cytochrome P-450 1A1 en métabolites carcinogènes. Une étude réalisée *in vitro* (les métaux sont mis en présence de fractions microsomales de rats prétraités avec du 3-MC) a montré que le chlorure de cadmium, le sulfate de zinc, le sulfate de cuivre et le sélénite de sodium sont des inhibiteurs de l'activité (Asokan *et al.*, 1985). Le cadmium a un effet inhibiteur synergique avec celui des trois autres métaux. Le potentiel inhibiteur de ces métaux est lié à leur affinité pour le cytochrome P-450 (liaison au résidu cystéine, ligand du fer hémique). *In vivo*, l'inhalation simultanée de HAP et des métaux cités précédemment augmente la concentration des HAP dans la circulation sanguine, les capacités de métabolisation des HAP étant réduites dans le poumon.

Le méthyl-mercure, le plomb et le cadmium sont générateurs de radicaux libres (Bansal *et al.*, 1992) et le chlorure de cadmium peut induire les activités enzymatiques antioxydantes dans le poumon (Vincent *et al.*, 1989). Le caractère thioloprive de ces métaux provoque des déficits en glutathion et l'inhibition des enzymes dont le fonctionnement dépend d'un atome de soufre (par exemple, la cystéine du site actif des cytochromes P-450). Le plomb est un inhibiteur de la biosynthèse de l'hème et inhibe la formation des hémoprotéines, dont font partie les cytochromes P-450 (Harada *et al.*, 1990).

Les effets toxiques dus aux métaux sont le plus souvent observés dans des conditions expérimentales, avec de fortes doses de sels de métaux administrés à des animaux de laboratoire. Etant donné l'importance de l'espèce, de l'origine de la souche de l'animal (sauvage ou de laboratoire) et de la spéciation du métal, il paraît difficile d'établir une corrélation entre les effets observés dans ces conditions et les doses mesurées chez des animaux exposés naturellement, d'autant plus que les métaux sont rarement à l'état de sels dans l'environnement.

II.4. Le système immunitaire

Le système immunitaire contribue au maintien de l'intégrité physiologique de l'individu en assurant l'élimination des matériaux étrangers et des agents infectieux auxquels l'organisme est exposé. Deux processus assument cette fonction biologique : l'immunité non spécifique et l'immunité spécifique. Ces deux types d'immunité font intervenir des cellules et des molécules solubles dans les milieux biologiques.

L'immunité non spécifique (ou naturelle) est innée et ne présente aucune mémoire ou adaptation aux nouveaux pathogènes. Elle constitue une première ligne de défense, capable d'arrêter la plupart des agents pathogènes avant que ne s'établisse une véritable infection. En cas d'échec, l'immunité spécifique entre en jeu et déclenche une réaction dirigée

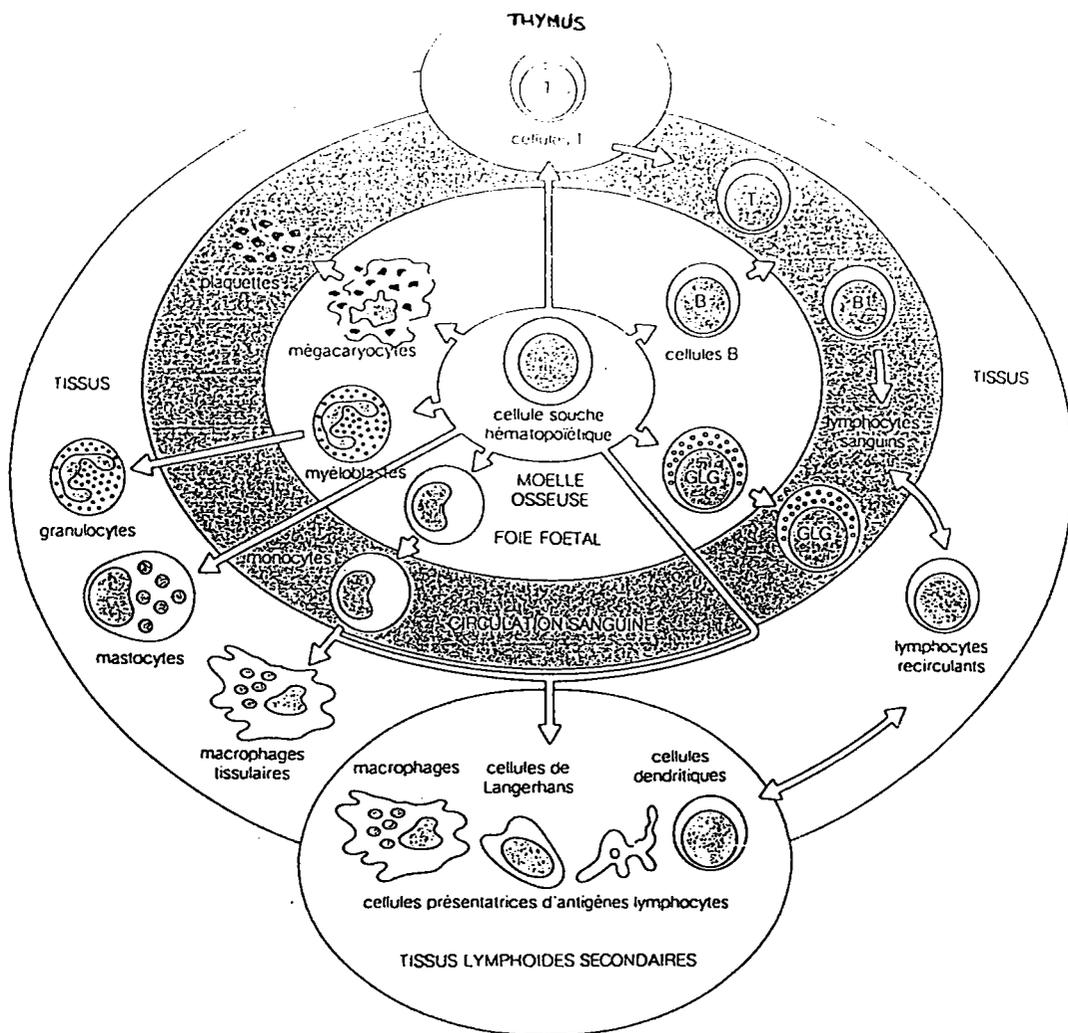


Figure 23 : Origine des cellules du système immunitaire (selon Roitt *et al.*, 1985).

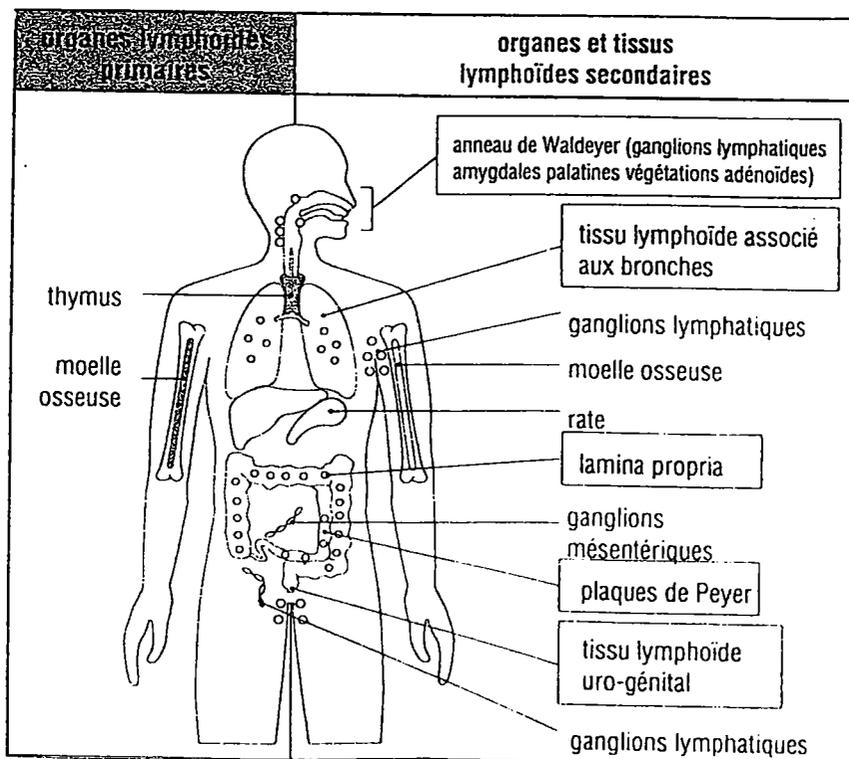


Figure 24 : Principaux organes et tissus lymphoïdes (selon Roitt *et al.*, 1994).

spécifiquement contre l'agent infectieux en cause. Lors d'un contact ultérieur avec ce même antigène, la réponse sera plus rapide grâce à la mémoire de l'immunité spécifique.

Le fonctionnement du système immunitaire étant extrêmement complexe, nous nous contenterons d'en décrire les grandes lignes, afin que soient compréhensibles les différents effets immunotoxiques que peuvent engendrer les polluants environnementaux. Cette présentation n'est pas exhaustive et ne doit en aucun cas être considérée comme un résumé de l'ensemble du système immunitaire et de son fonctionnement. Dans une deuxième partie, nous résumerons les différentes formes de toxicité pouvant être la conséquence d'une exposition à des polluants.

II.4.1. Le système immunitaire des mammifères

En règle générale, toute cellule (ou ensemble de cellules) étrangère à l'organisme est considérée comme faisant partie du "non-soi", car elle ne porte pas les récepteurs propres à l'individu. A l'inverse, les cellules fabriquées par l'organisme sont reconnues comme faisant partie du "soi". L'organisme peut également différencier une molécule endogène d'une molécule exogène.

II.4.1.1. Origine des cellules de l'immunité et organes lymphoïdes

Toutes les cellules du système immunitaire sont issues d'une cellule souche hématopoïétique⁶, située dans la moelle osseuse. Ces cellules souches pluripotentes peuvent donner naissance à deux lignées : la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde (figure 23).

Les cellules provenant de la lignée myéloïde sont réparties dans les tissus mous (polynucléaires, mastocytes, macrophages) ou dans le sang (monocytes, polynucléaires). Leur rôle est essentiellement lié à la phagocytose des éléments étrangers. Le système lymphoïde est composé de lymphocytes, de cellules accessoires (macrophages, cellules présentatrices de l'antigène) et parfois de cellules épithéliales. L'ensemble de ces cellules est réparti dans des organes encapsulés ou des tissus lymphoïdes diffus (figure 24).

La différenciation des lymphocytes a pour finalité de donner à ces cellules les moyens de reconnaître des antigènes ou d'autres molécules grâce à l'expression de récepteurs de surface. Elles acquièrent aussi la capacité de distinguer les antigènes du "soi" de ceux du "non-soi" (molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, le CMH).

Les lymphocytes B se différencient dans le foie foetal, puis la moelle osseuse. Ils ont pour marqueurs de surface des immunoglobulines (Ig). Différentes classes d'Ig peuvent être représentées sur la même cellule (IgM et/ou IgD), mais leur partie variable (spécifique de l'antigène) est obligatoirement identique sur une même cellule.

⁶ C'est de cette cellule souche que dérivent tous les éléments sanguins (érythrocytes, leucocytes, plaquettes)

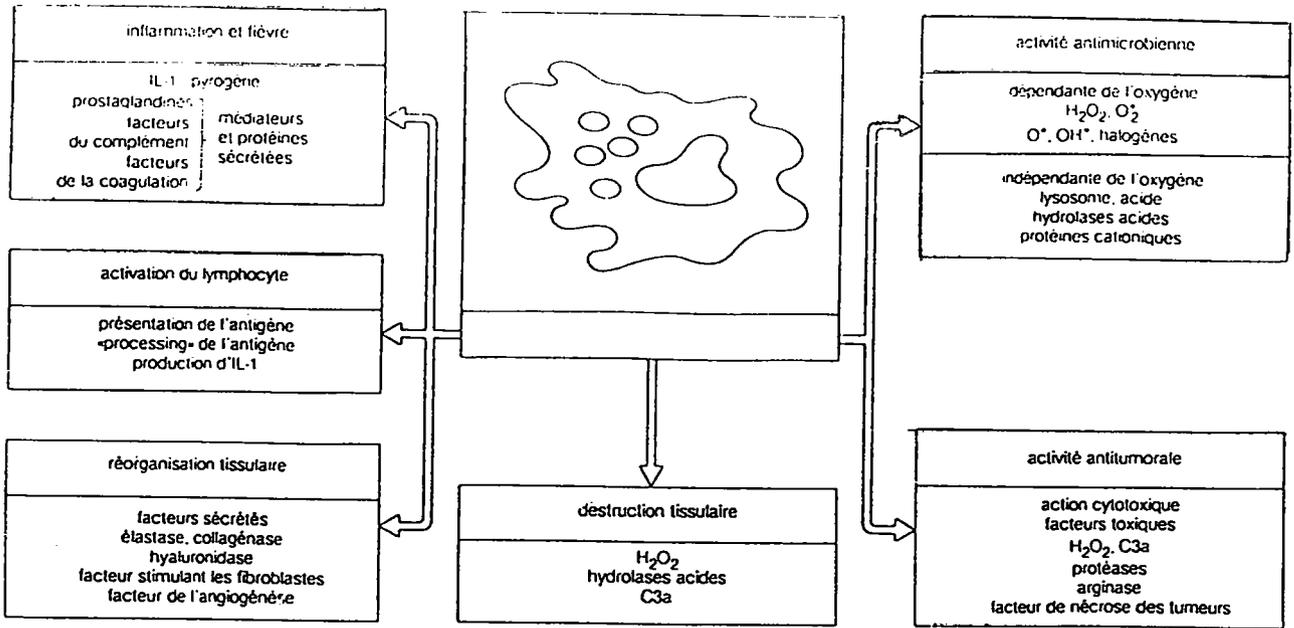


Figure 25 : Rôle central des macrophages (Roitt *et al.*, 1985). Les macrophages et leurs produits interviennent dans l'induction de l'inflammation et dans sa résorption ultérieure (gauche). Leurs fonctions effectrices antitumorales et antibactériennes (droite) peuvent aussi engendrer des dégâts tissulaires (centre), comme par exemple dans l'hypersensibilité retardée.

La différenciation des lymphocytes T se produit dans le thymus et consiste à sélectionner des cellules spécifiques des ensembles [molécules du CMH-peptides antigéniques]. Les lymphocytes T matures portent des récepteurs leur permettant de reconnaître les antigènes du CMH de classe I et II (respectivement CD8 et CD4). Les lymphocytes T sont porteurs de nombreux autres récepteurs membranaires, que nous ne détaillerons pas ici.

Les lymphocytes T et B n'atteignent le stade terminal de leur différenciation que s'ils entrent en contact avec un antigène (au niveau des organes et tissus lymphoïdes secondaires) qui stimule la formation d'un clone spécifique.

II.4.1.2. L'immunité non spécifique

Les acteurs de l'immunité naturelle sont variés : les défenses externes peuvent être physiques (peau) ou biochimiques (lysozymes, mucus, acidité...), les défenses internes sont cellulaires (cellules phagocytaires) ou moléculaires (cytokines, système du complément).

Lorsque le revêtement épithélial est franchi, l'antigène (micro-organisme par exemple) se trouve en présence de cellules phagocytaires (circulantes ou tissulaires) qui captent les particules étrangères, les ingèrent et les détruisent : c'est la phagocytose. Ces cellules agissent sans spécificité, mais sont primordiales dans la coopération avec les cellules de l'immunité spécifique (rôle dans la présentation de l'antigène ; figure 25).

Les particules phagocytées sont englobées dans un phagosome qui peut fusionner avec le lysosome, vacuole contenant des composants bactéricides et des enzymes. La destruction des micro-organismes peut se faire par deux grands mécanismes : a) un système moléculaire indépendant de l'oxygène (acidification de la vacuole et lyse enzymatique de la membrane), ou b) un système dépendant de l'oxygène (explosion respiratoire et formation d'entités oxygénées réactives).

Certaines cellules phagocytaires (les cellules présentant l'antigène, CPA) opèrent des changements structuraux et/ou conformationnels de l'antigène, générant des peptides qui sont alors exprimés à leur surface en association avec des protéines de classe II du CMH. Leur rôle est primordial dans l'activation des lymphocytes T, qui ne reconnaissent que des épitopes⁷ composés de quelques acides aminés.

Les cellules tueuses NK sont en majorité des grands lymphocytes granulaires qui, activés par des cytokines et/ou des interférons lysent les cellules cancéreuses ou infectées par un virus, reconnues par leurs altérations membranaires. La lyse des cellules cibles est facilitée par le système du complément (opsonisation et attraction des phagocytes).

Les cytokines sont des glycoprotéines généralement produites en réponse à une agression ou une stimulation cellulaire ; elles agissent comme médiateur cellulaire au sein du système immunitaire et entre les composants de ce système et d'autres organes. Produites par

⁷ Un épitope (ou déterminant antigénique) est un site de l'antigène sur lequel peut se fixer un anticorps

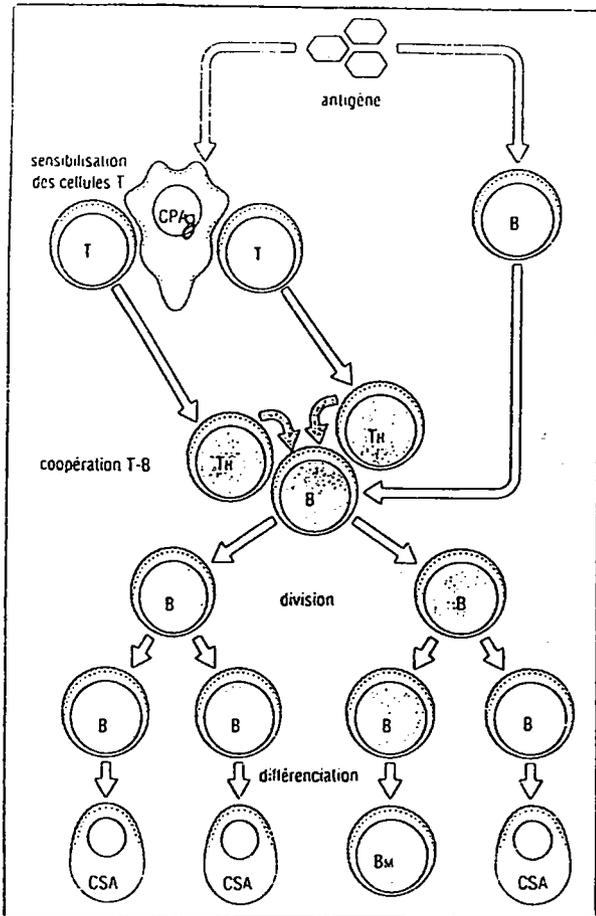


Figure 26 : Coopération cellulaire dans la réponse anticorps (Roitt *et al.*, 1994). L'antigène est présenté aux cellules T vierges par des CPAg telles que des cellules dendritiques. Les cellules B peuvent aussi capter l'antigène et le présenter aux cellules T. Elles reçoivent des cellules T des signaux de division et de différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps (CSA) et en cellules mémoire (BM).

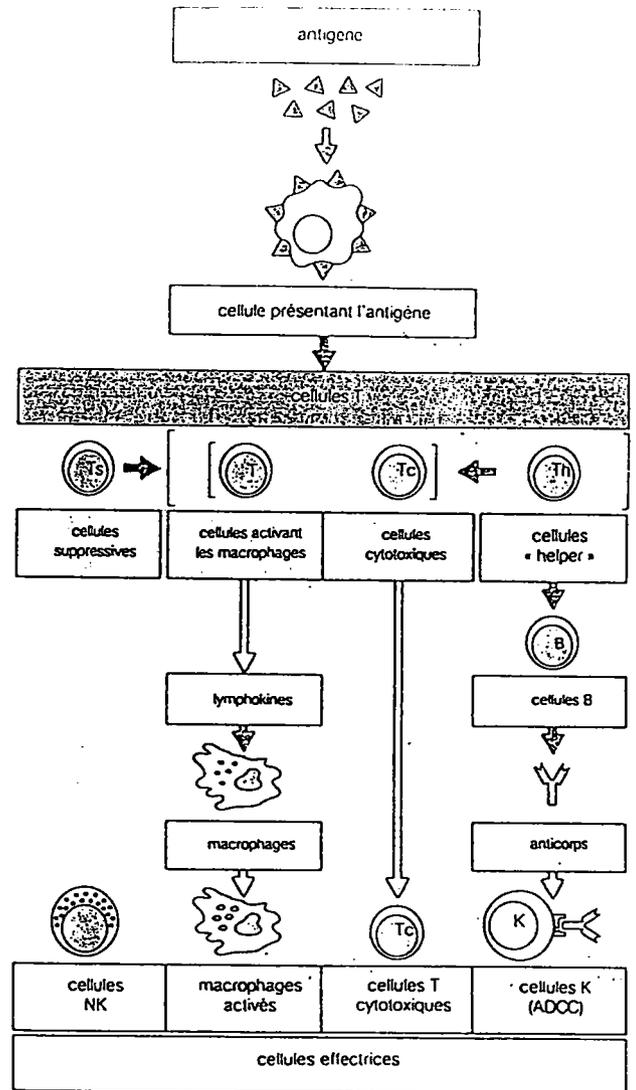


Figure 27 : Les voies de l'immunité à médiation cellulaire (selon Roitt *et al.*, 1994). Les réponses immunes à médiation cellulaire suivent la présentation de l'antigène et l'activation des cellules T, contrôlée par les lymphocytes suppresseurs et helper. Certaines cellules élaborent des lymphokines et activent les fonctions phagocytaires et bactéricides des macrophages. Les cellules T cytotoxiques sont activées par l'antigène avec l'aide des cellules helper, lesquelles coopèrent aussi avec les cellules B pour la production d'anticorps. Ces derniers peuvent armer des cellules qui expriment des récepteurs Fc (par exemple, les cellules NK). Les cellules NK agissent sans spécificité connue.

des leucocytes (macrophages, lymphocytes) et agissant préférentiellement sur des leucocytes, elles seront plus spécifiquement appelées interleukines (IL). Les cytokines contrôlent un grand nombre de processus biologiques tels que la croissance cellulaire ou l'inflammation et jouent un rôle régulateur important, puisqu'elles interviennent lors de la sélection des mécanismes effecteurs à l'occasion du premier contact avec le pathogène

II.4.1.3. L'immunité spécifique

Les lymphocytes T et B sont les cellules clefs de l'immunité spécifique. L'intervention des cellules T nécessite une coopération cellulaire avec des cellules leur présentant l'antigène en association avec les molécules de classe II du CMH (figure 26), alors que les cellules B peuvent reconnaître l'antigène sans nécessité de coopération cellulaire. Les lymphocytes T et B peuvent interagir par contacts cellulaires ou par le biais de cytokines.

Certains lymphocytes (cellules mémoires à vie longue) sont capables de garder en mémoire tout contact avec un antigène, ce qui permet une réponse plus rapide et plus efficace lors d'un contact ultérieur avec le même antigène.

L'immunité à médiation cellulaire

Le lymphocyte activé prolifère et forme un clone spécifique de l'antigène, ce qui améliorera la rapidité et l'efficacité de la réponse lors d'un contact ultérieur. Il peut se former des clones de cellules effectrices (à fonctions "helper" ou cytotoxique) ou de cellules mémoires (figure 27). Les cytokines jouent un rôle très important dans l'activation mutuelle des deux types de cellules. Le contrôle de l'activation des cellules T est assuré par les lymphocytes "suppresseurs" (Ts) et "helper" (Th). Les lymphocytes Th jouent plusieurs rôles, qu'ils assurent par des contacts cellulaires ou par la médiation de cytokines.

In vitro, des activateurs polyclonaux (lectines, esters de phorbol, anticorps, virus, protéines...) peuvent également conduire à la multiplication des lymphocytes.

L'immunité à médiation humorale

Le contact de l'antigène et les interactions moléculaires entre les cellules (lymphokines) vont activer la prolifération d'un clone de lymphocytes B, dont les cellules vont se différencier en plasmocytes, cellules hautement sécrétrices d'anticorps spécifiques de l'antigène activateur (figure 26). Les anticorps libérés rendront le système de lyse plus efficace (meilleure opsonisation de l'antigène).

Les immunoglobulines (ou anticorps) sont des glycoprotéines présentes dans le sérum ou les fluides interstitiels, ou ancrées à la surface membranaire des lymphocytes B. Il existe cinq classes d'immunoglobulines (IgM, IgG, IgA, IgD, IgE) déterminées par la nature de la chaîne lourde. Toutes les Ig sont construites selon le même modèle : deux chaînes lourdes (H) identiques et deux chaînes légères (L) identiques, composées de domaines variables (V) et

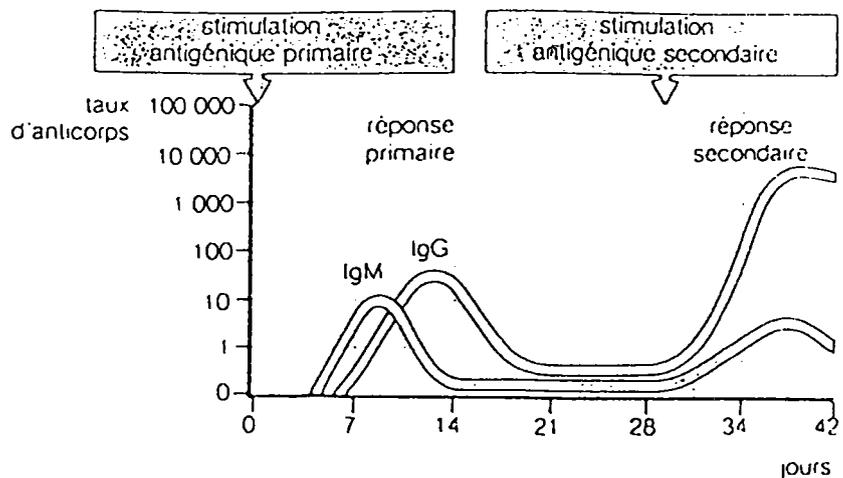


Figure 28 : Les réponses anticorps primaire et secondaire (Roitt *et al.*, 1994).

Dans une réponse primaire, l'apparition des IgG est précédée de celle des IgM. Au cours d'une réponse immunitaire typique, les anticorps qui apparaissent à la suite d'une stimulation antigénique secondaire a) augmentent plus rapidement en concentration et persistent plus longtemps, b) atteignent des taux plus élevés et c) sont constitués essentiellement d'IgG.

constants (C) sont liées entre elles par des ponts disulfures intracaténaux. La partie variable de l'Ig est spécifique de l'antigène.

La réponse anticorps

Lors d'une première stimulation antigénique (premier contact entre l'antigène et l'organisme), on observe une phase de latence sans anticorps détectables. Puis le titre en anticorps augmente de façon exponentielle pour atteindre un plateau et redescendre (catabolisme naturel des anticorps, fixation sur l'antigène et élimination de la circulation). Au deuxième contact (réponse secondaire), la phase de latence est plus courte, le taux maximum d'anticorps est plus élevé (d'un facteur 100) et l'affinité pour l'antigène est meilleure.

Lors de la réponse primaire, les premiers anticorps synthétisés sont des IgM, suivis par des IgG, qui présentent une meilleure affinité que les IgM. Dans le cadre d'une réponse secondaire, les IgM apparaissent les premiers, mais ils sont rapidement remplacés par les IgG (figure 28). Les IgM sont donc plutôt marqueurs d'une réponse primaire récente, voire d'un début de réponse secondaire alors que les IgG qui gardent un taux élevé pendant une période relativement longue sont marqueurs d'une réponse primaire ou secondaire "efficace" (ils permettent de vérifier l'existence d'une immunisation vis-à-vis d'un antigène particulier).

La réponse anticorps varie selon la nature de l'antigène : les antigènes T-dépendants⁸ provoquent une réponse plus intense que les Ag T-indépendants lors d'un premier contact ; lors d'une réponse secondaire, les Ag T-indépendants n'induisent que la production d'IgM, alors que les Ag T-dépendants induisent la production d'IgM puis d'IgG.

II.4.1.4. Régulation de la réponse immunitaire

L'ensemble de la réponse immunitaire est soumis à plusieurs systèmes de contrôle, qui peuvent être cellulaires, humoraux ou génétiques. La plupart des acteurs de la stimulation ou de la réponse immunitaire sont impliqués dans les mécanismes de régulation : les anticorps, les cytokines sécrétées par les lymphocytes Th et la tolérance des antigènes du "soi" limitent les réactions immunitaires. Le système nerveux, qui contrôle la production d'hormones, agit sur les lymphocytes portant des récepteurs à ces hormones (par exemple, immunodépression due à un stress, Pruett *et al.*, 1993). Génétiquement, il existe des profils de sensibilité à des infections particulières : la résistance à certaines bactéries peut être transmise de façon héréditaire. Les gènes concernés peuvent être, ou ne pas être, situés dans le complexe majeur d'histocompatibilité.

⁸ Nécessitant l'intervention des lymphocytes T pour activer la synthèse d'anticorps spécifiques.

II.4.2. Le système immunitaire en action

Immunité antibactérienne et antivirale

Toutes les bactéries n'ont pas le même mécanisme pathogène : elles peuvent exercer une action toxique seule, une invasion seule, ou associer les deux. La première barrière est physique (peau, muqueuses...) puis entrent en jeu les effecteurs de l'immunité naturelle. Au delà, la réponse spécifique est sollicitée et les macrophages sont activés pour leur effet bactéricide.

En cas d'infection virale, les interférons sont susceptibles d'éviter l'infection des cellules hôtes nécessaire à la multiplication des "parasites" que sont les virus (on entend par parasite un élément dépendant de la machinerie cellulaire d'un hôte pour sa propre multiplication). En cas d'échec, les lymphocytes T ont un rôle antiviral majeur en provoquant la synthèse d'anticorps et l'activation de cellules cytotoxiques (lymphocytes T cytotoxiques (Tc), cellules NK, cellules K). Les réponses antivirales peuvent être néfastes à l'hôte par formation de complexes immuns, mort des cellules infectées (nécroses) et déclenchement de réactions auto-immunes.

Immunité antiparasitaire

Les macrophages, les polynucléaires et les plaquettes participent à la défense de l'hôte contre les helminthes et les protozoaires ; les lymphocytes, les macrophages et les cytokines sont des effecteurs importants. Les infections par des helminthes sont caractérisées par une hyperéosinophilie et la synthèse d'IgE. La plupart des parasites sont capables d'induire une immunosuppression comme mécanisme d'échappement (surcharge antigénique par exemple).

Réactions d'hypersensibilité (HS)

Ce sont des réponses immunitaires inappropriées ou exagérées à l'origine de lésions tissulaires. Il existe quatre types d'hypersensibilité qui peuvent être dues à des anticorps ou à des cellules.

Le type I, ou HS immédiate, est liée à une réponse IgE contre des antigènes sans toxicité propre. Les mastocytes sensibilisés par les IgE libèrent des médiateurs qui déclenchent une réaction aiguë pathologique (allergie).

Le type II, caractérisé par une cytotoxicité dépendante des anticorps, s'observe lorsqu'un anticorps se lie à un antigène cellulaire pour induire phagocytose, cytotoxicité de type K ou lyse cellulaire par activation du complément.

L'hypersensibilité de type III ou à complexes immuns, est consécutive à l'accumulation de complexes immuns qui n'ont pas pu être éliminés par le système réticulo-histiocytaire.

Enfin, l'hypersensibilité de type IV, ou HS retardée ou HS cellulaire, est provoquée par la non-destruction des antigènes phagocytés. Les lymphocytes T produisent des lymphokines

qui entraînent une réaction inflammatoire. Les HS de type IV sont rencontrées dans les rejets de greffe, les allergies de contact....

Les maladies auto-immunes

Le hasard des recombinaisons génétiques étant à l'origine de la variété des récepteurs des lymphocytes T et B, le système immunitaire doit apprendre à reconnaître les antigènes du "soi" au cours du développement (différenciation lymphocytaire).

Dans les cas de maladies auto-immunes (MAI), des anticorps ou des lymphocytes T autoréactifs sont produits en grand nombre. L'origine peut être génétique (prédisposition héréditaire à certaines MAI) ou pathogène : les réactions auto-immunes peuvent être elles-mêmes responsables de lésions caractéristiques de la maladie, mais la maladie peut aussi provenir d'une autre cause, et les lésions tissulaires entraînent alors l'apparition d'autoanticorps. Troisième cas : un même facteur provoque à la fois lésions et manifestations auto-immunes. La présentation d'un antigène exogène peut stimuler une cellule T naïve (qui n'a pas encore rencontré d'antigène) qui peut alors reconnaître cet antigène avec une forte affinité ou, par une réaction croisée, reconnaître un antigène du soi qui, masqué, n'était pas devenu immunogène⁹.

Les déficits immunitaires

Les déficits immunitaires primitifs sont dus à des défauts intrinsèques du système immunitaire et sont pour la plupart d'origine génétique. Les déficits immunitaires secondaires sont causés par des facteurs extrinsèques tels que les médicaments, l'irradiation, la malnutrition ou l'infection. Les immunodéficiences peuvent porter à tous les niveaux du système immunitaire, qu'il s'agisse des facteurs humoraux ou cellulaires, de la réponse spécifique ou non spécifique.

Immunité de greffe

Les antigènes d'histocompatibilité sont exprimés sur les tissus d'organismes génétiquement différents et déterminent la compatibilité tissulaire. Codés par des gènes d'histocompatibilité, ils sont responsables d'un rejet plus ou moins rapide, les réactions les plus vigoureuses étant induites par les alloantigènes codés par les gènes du CMH. L'hôte réagit contre la greffe, mais le greffon peut aussi réagir contre l'hôte ("graft versus host" : GVH). Dans les deux cas, les cellules T ont un rôle primordial : les T helper (et leurs cytokines) sont nécessaires et suffisants pour provoquer un rejet.

⁹ Pouvant induire une réponse immunitaire

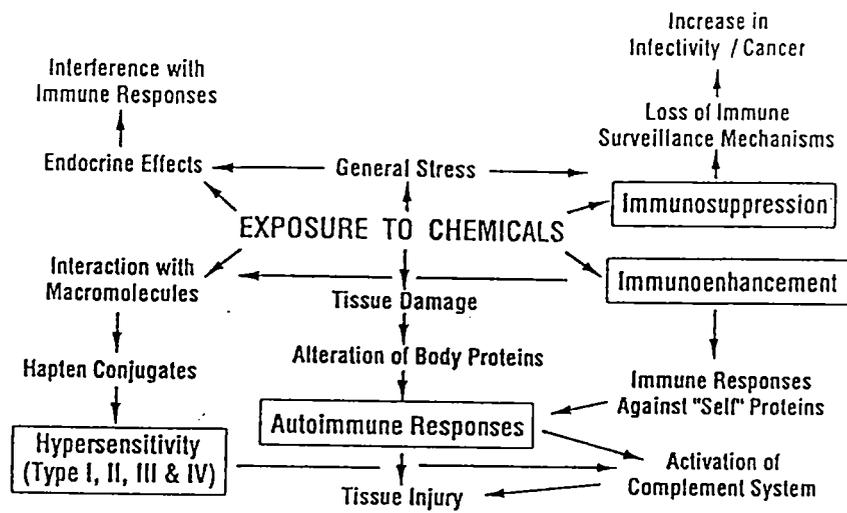


Figure 29 : Modèle décrivant les conséquences immunologiques défavorables de l'exposition à un produit toxique (selon Zelikoff *et al.*, 1994).

Immunité antitumorale

La lutte antitumorale est essentiellement cytotoxique (cellules NK). Elle est favorisée par l'intervention des interférons.

II.4.3. Le système immunitaire : cible de produits toxiques

Comme nous l'avons vu, l'efficacité du système immunitaire est due à une énorme capacité de prolifération cellulaire et à des interactions intercellulaires directes ou par le biais de molécules solubles. Mais le système immunitaire est aussi une cible pour les agents toxiques : les cas d'immunosuppression par des polluants chimiques ne sont pas rares en conditions expérimentales et démontrent la vulnérabilité de ce système de défense (revue par Bhatia & Kaur, 1993).

La toxicité du système immunitaire, ou immunotoxicité, est définie comme une réponse défavorable du système à un xénobiotique se traduisant par une immunosuppression (altération de la résistance de l'hôte aux maladies infectieuses...), des maladies auto-immunes ou des états d'hypersensibilité (allergies ; figure 29). L'immunotoxicologie est l'étude de ces effets défavorables. La cible du produit immunotoxique n'est pas obligatoirement une cellule ou une molécule spécifique du système immunitaire : par exemple, le stress chimique provoque une augmentation des teneurs en glucocorticoïdes qui provoque des immunosuppressions (Pruett *et al.*, 1993) et des interactions directes entre le toxique et le cerveau peuvent conduire à des phénomènes d'immunosuppression (Fuchs & Sanders, 1994). Etant donné l'ampleur du sujet, nous ne mettrons l'accent que sur les immunosuppressions.

II.4.3.1. Intérêt en toxicologie de l'environnement

Le système immunitaire est un "organe cible" particulièrement sensible pour deux raisons : a) les propriétés générales des xénobiotiques (caractère toxique lié à leur réactivité avec des macromolécules) et b) l'extrême complexité du système en termes de constituants et de mécanismes (coopérations cellulaires, molécules solubles, amplification, différenciation, prolifération, régulation dépendante du système neuroendocrinien...). Les xénobiotiques immunotoxiques augmentent la sensibilité des individus aux agents infectieux et au développement de cellules tumorales. Ainsi, même à des doses très inférieures à celles entraînant des effets toxiques observables cliniquement ou biochimiquement, certains polluants provoquent une dépression du système immunitaire, dont l'intensité peut être variable suivant les paramètres étudiés : une étude comparative des effets provoqués par plusieurs isomères des heptachlorodibenzofurannes sur la synthèse d'anticorps spécifiques et l'induction d'activités monooxygénases (EROD, AHH) chez des souris montre que la DE₅₀ est 10 à 36 fois plus faible pour les paramètres immunologiques (Dickerson *et al.*, 1990) ; avec certains HAP (3-MC et 1,2,5,6-dibenz(a)anthracène), la DE₅₀ est 9 à 18 fois plus faible pour

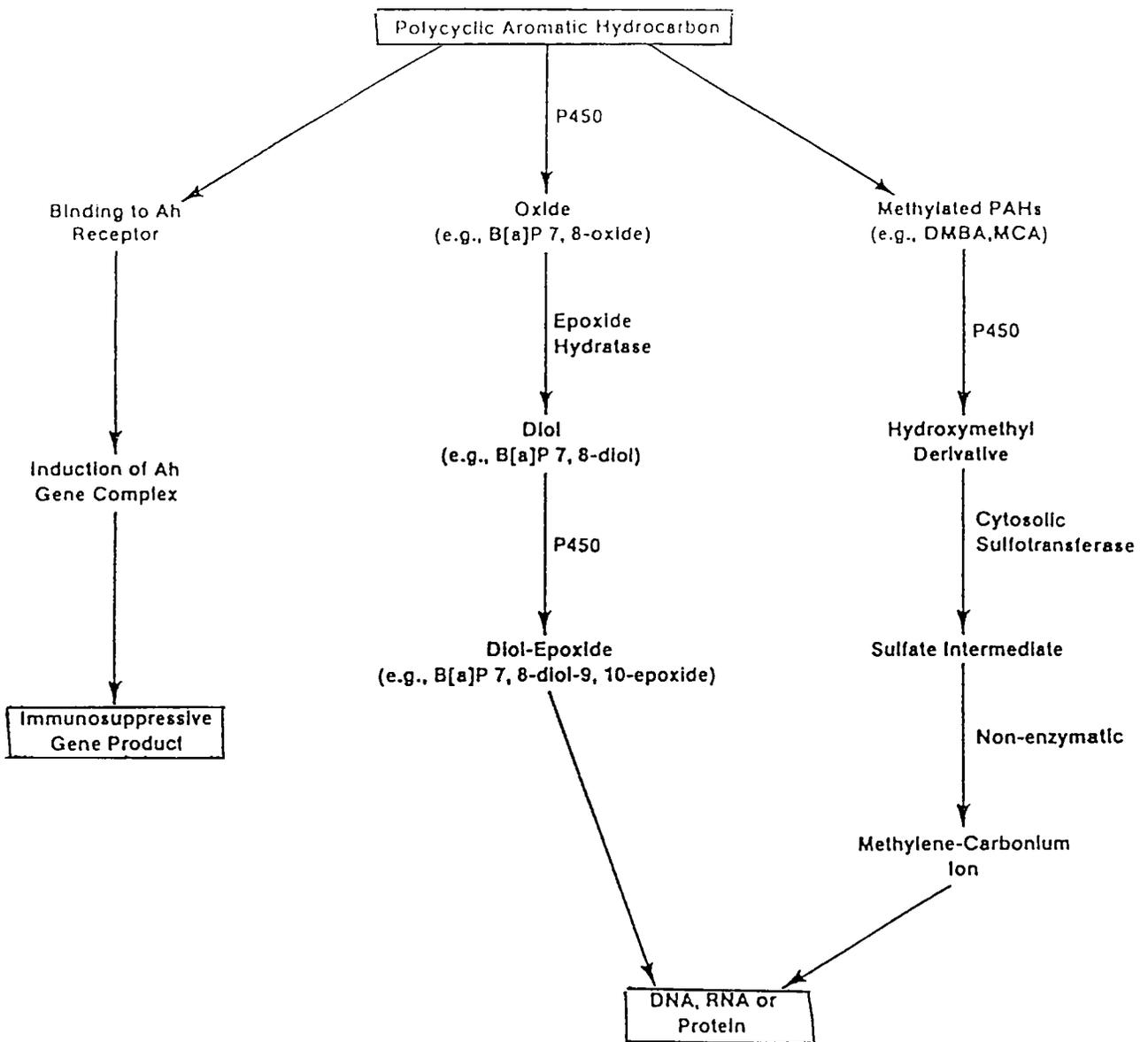


Figure 30 : Mécanismes possibles de l'immunosuppression induite par les HAP (selon Ward *et al.*, 1985).

la suppression des cellules sécrétrices d'anticorps (PFC) que pour l'induction de l'activité EROD (Dickerson *et al.*, 1994).

La plupart des études expérimentales ont été effectuées sur rongeurs (souris essentiellement), mais plusieurs cas de contamination humaine accidentelle ont montré que l'homme réagit d'une façon semblable (revues par Luster *et al.*, 1988 ; Vos *et al.*, 1989 ; Dean *et al.*, 1990). La sensibilité du système cible et les répercussions potentielles de son dysfonctionnement font donc de l'immunotoxicologie un domaine particulièrement intéressant en toxicologie environnementale (Kimber, 1991).

Les mécanismes par lesquels les xénobiotiques sont immunotoxiques sont assez bien connus. Nous distinguerons ici trois catégories de polluants environnementaux : les HAP, les HAPH et les métaux. A notre connaissance, les effets immunotoxiques chez les mammifères n'ont été observés que dans des conditions expérimentales, mais le développement de maladies liées à une immunodépression a été mis en évidence chez des poissons vivant dans une zone polluée (revue par Vos *et al.*, 1989) et des rats musqués vivant dans une zone contaminée par des HAP présentent davantage d'infections parasitaires que les rats musqués vivant dans une zone non contaminée (Halbroock *et al.*, 1993).

II.4.3.2. Immunotoxicité des HAP et des HAPH

Mécanismes

Les HAP et les HAPH sont ubiquistes dans l'environnement et ont un mécanisme de toxicité commun : la plupart des molécules de ce type ont une conformation plane qui permet à ces composés d'être reconnus par le récepteur *Ah*. Les effets toxiques des HAP et des HAPH étant liés à leur métabolisation par les monooxygénases à cytochrome P-450, il faut s'attendre à ce que toutes les cellules pourvues de ce système de détoxification puissent être la cible de ces toxiques (figure 30). Or, beaucoup de cellules autres que les hépatocytes possèdent ce système et notamment les cellules du système immunitaire (lymphocytes, monocytes, macrophages, cellules de l'épithélium thymique ; Lorr *et al.*, 1992 ; De Heer *et al.*, 1994 ; D'Souza *et al.*, 1994 ; Germolec *et al.*, 1995).

Plusieurs auteurs ont mis en évidence le rôle central de l'activation métabolique dans le développement de propriétés carcinogènes et immunotoxiques des métabolites : certaines molécules sont carcinogènes et immunotoxiques (B(a)P), alors que d'autres molécules de même formule mais de configuration différente (B(e)P ; faible affinité pour le récepteur *Ah*) ne sont ni carcinogènes, ni immunotoxiques (revue par Ward *et al.*, 1985 ; Hardin *et al.*, 1992 ; Luster *et al.*, 1992a).

La liaison entre le récepteur *Ah* et les hydrocarbures aromatiques chlorés, responsable de l'induction des gènes CYP1A, dépend du degré de chloration et de la position des atomes de chlore. La relation qui existe entre l'immunotoxicité et l'activation des CYP1A est bien établie : une étude comparant l'activation de ces enzymes de métabolisation et la réponse

humorale de souris exposées à différents isomères d'heptachlorodibenzofurannes, montre que les molécules tétrasubstituées en positions 2,3,7,8 sont plus "efficaces" que celles ayant seulement 3 substitutions latérales (Dickerson *et al.*, 1990). Cette conformation est celle qui a la meilleure affinité pour le récepteur Ah et l'immunosuppression est dépendante de cette étape. Un PCB de forte affinité pour le récepteur Ah est immunotoxique chez les souris portant l'allèle Ah^b, alors que dans les souris Ah^d, il perd son immunotoxicité (Silkworth *et al.*, 1984 ; Kerkvliet *et al.*, 1990 ; Bandiera *et al.*, 1982, cité par Tryphonas, 1994). Certains HAP peuvent également perturber le fonctionnement du système immunitaire par des mécanismes épigénétiques en altérant la fonction de cellules tumoricides, ce qui facilite le développement de cellules transformées (métastases ; Baldwin 1973, cité par Ward, 1985). Chez certaines espèces de souris, les PCB augmentent le niveau de glucocorticoïdes, qui ont un effet immunosuppresseur (revue par Pruett *et al.*, 1993).

Effets immunotoxiques

La réponse humorale est la fonction du système immunitaire la plus sensible aux HAPH chez les rongeurs et les primates (revue par Tryphonas, 1994). La technique la plus employée pour mettre cette inhibition en évidence est la quantification des cellules productrices d'anticorps (Plaque Forming Cell : PFC) dirigés contre des globules rouges de mouton (Sheep Red Blood Cells : SRBC).

La 2,3,7,8-TCDD, congénère le plus toxique des dioxines, est particulièrement active dans les cellules épithéliales du thymus riches en récepteur Ah (rat et souris), dont elle provoque l'atrophie et une déplétion lymphocytaire (De Heer *et al.*, 1994) ; la répartition des sous-populations lymphocytaires est modifiée (Kerkvliet & Brauner, 1990) à très faibles doses (dose unique de 10 ng/kg ou exposition long terme à 0,3 ng/kg ; Esser, 1994). L'action de la 2,3,7,8-TCDD sur la réponse humorale varie selon l'espèce utilisée : elle inhibe la production d'anticorps anti-SRBC chez la souris (DE₅₀ : 0,7 µg/kg), mais pas chez le rat, même à une dose de 30 µg/kg (Hanson & Smialowicz, 1994 ; Smialowicz *et al.*, 1994). Le thymus et la rate peuvent être atrophiés, mais ces effets sont variables suivant les espèces utilisées. La prolifération *in vitro* de certaines sous-populations de lymphocytes T est altérée. L'activité macrophagique est réduite, la résistance aux virus est diminuée, et la sensibilité aux endotoxines bactériennes est augmentée.

Les dibenzofurannes chlorés provoquent le même type de perturbations avec une intensité variable (selon la position et le nombre de substitutions ; Dickerson *et al.*, 1990). Le traitement combiné de souris par de la 2,3,7,8-TCDD (1 µg/kg) et des inducteurs de CYP1A (β-naphtoflavone, 3-MC) conduit à l'additivité des effets immunotoxiques des deux composés (PFC et prolifération *in vitro* par mitogènes) ; la coadministration de 2,3,7,8-TCDD et de phénobarbital (inducteur de CYP2B) ne modifie pas les effets observés avec la TCDD seule. Avec une dose unique de 1 µg/kg, la 2,3,7,8-TCDD n'inhibe pas l'activité NK (Vecchi *et al.*, 1986).

Les PCB causent de sévères suppressions de la réponse humorale (revue par Tryphonas, 1994). Les congénères coplanaires sont les plus toxiques (Davis & Safe, 1990) et leur immunotoxicité augmente avec leur degré de chloration. Cependant, certains congénères ont des propriétés immunotoxiques, bien qu'ils ne soient pas des ligands du récepteur *Ah*. Ce mécanisme pourrait être lié à la production des entités réactives lors du métabolisme des PCB en formes quinoniques. La plupart des congénères ont des effets immunotoxiques additifs avec ceux de la 2,3,7,8-TCDD (3,7 nmol/kg), mais les congénères #108 et #159 (congénères mono-*ortho*-substitués, avec un seul chlore en position *para*) ont des effets antagonistes de la TCDD, bien qu'ils diminuent le nombre de PFC (Davis & Safe, 1990). L'Aroclor 1254® provoque une perte d'activité NK (Smialowicz *et al.*, 1989). Des études menées sur des primates ont montré que leur système immunitaire est sensible aux PCB, même à de faibles concentrations.

Les HAP sont eux aussi immunotoxiques après leur métabolisation par les monooxygénases à cytochrome P-450. Le B(a)P, bien connu pour sa carcinogénicité, exerce une action immunotoxique en inhibant la lymphopoïèse des lymphocytes B (Hardin *et al.*, 1992), ce qui entraîne une suppression de la réponse anticorps. D'autres HAP, comme le 3-MC ou le diméthylbenz(a)anthracène sont également inhibiteurs de la réponse anticorps, mais ils diminuent aussi les réactions de rejet de greffe et/ou les fonctions de cytotoxicité NK (revues par Ward *et al.*, 1985 ; Luster *et al.*, 1987).

Les hydrocarbures aromatiques simples, comme le benzène, ont un pouvoir immunotoxique (sur les cellules mitotiques de la moelle osseuse et les lymphocytes) mais leur métabolisation étant très rapide (70 % d'une dose unique de 880 mg/kg disparaissent en 8 heures chez la souris), les effets disparaissent rapidement. Cet état de fait doit être pris en compte si des biomarqueurs immunologiques (ou biochimiques) sont utilisés pour la mise en évidence d'une exposition à du benzène par exemple (McMurry *et al.*, 1991).

II.4.3.3. Immunotoxicité des métaux lourds

Les métaux lourds, notamment le plomb, le mercure et le cadmium, sont toxiques pour le système immunitaire : ils peuvent être immunosuppresseurs ou immunostimulateurs, selon la dose, la voie, la durée d'exposition et l'espèce de l'individu exposé (revues par Luster *et al.* 1987 et Zelikoff *et al.*, 1994).

Le *plomb* (sous forme de sels ou de composés organiques) est un immunosuppresseur agissant sur les réponses humorales et cellulaires, diminuant la résistance de l'hôte contre les agents infectieux et le développement de tumeurs. Le plomb inhibe la fonction de présentation de l'antigène par les macrophages, ce qui empêche l'activation des lymphocytes T et la libération de leur cytokines. Il semblerait que cette inhibition soit liée à une modification des molécules du CMH de classe II, indispensables pour qu'il existe une coopération physique entre les deux types de cellules (revue par Exon *et al.*, 1987).

Le cadmium a une action cytotoxique sur les cellules spléniques, et inhibitrice de la réponse humorale primaire (Krzystiniak *et al.*, 1987). Ce métal inhibe la réponse cytotoxique NK chez l'homme (Cifone *et al.*, 1991). Dans l'environnement, l'exposition à des mélanges de plomb et de cadmium est courante et il a été montré expérimentalement que ces deux métaux agissent en synergie pour inhiber la production des macrophages de la moelle osseuse.

Le mercure a les mêmes effets et serait en plus à l'origine de réactions auto-immunes (Lawrence, 1985 cité par Zelikoff, 1994). Le plomb et le mercure sont capables d'augmenter la réponse humorale (production d'anticorps) ou de diminuer l'immunité à médiation cellulaire. Le chlorure de mercure diminue la prolifération des cellules T *in vitro* (Dieter *et al.*, 1983) et l'activité NK ; le méthyl mercure inhibe l'activité NK mais l'action de ce produit sur la prolifération des lymphocytes est sujet à controverse (Nakatsuru *et al.* 1985 ; Ilbäck, 1991).

Le nickel inhibe l'activité des cellules NK (Smialowicz *et al.*, 1987) et peut être, comme le chrome, responsable d'allergies de contact ; le mercure, l'or et le lithium peuvent provoquer des maladies auto-immunes.

II.4.4. Stratégies et méthodes d'études en immunotoxicologie

II.4.4.1. Stratégies de détection d'effets immunotoxiques

Le *National Toxicology Program* (NTP) a développé et validé une stratégie en deux étapes appliquée à l'étude immunotoxicologique de molécules chimiques chez la souris (tableau 8 ; Luster *et al.*, 1988 ; Luster *et al.*, 1992a). Les tests retenus dans la batterie sont des tests qui se sont montrés efficaces dans la mise en évidence de déficiences immunitaires primaires ou secondaires, chez des animaux de laboratoire ou des humains. La validation de ces tests de tri tient compte de leur sensibilité et de leur efficacité à détecter des altérations immunologiques subtiles, susceptibles de donner lieu à des pathologies d'immunodéficience secondaire.

La première étape regroupe un nombre limité de tests fonctionnels simples qui explorent toutes les voies de l'immunité : immunité à médiations cellulaire et humorale, immunopathologie et immunité non spécifique. Ces tests fournissent peu d'informations sur le mécanisme de l'action immunotoxique, mais permettent de déceler toute altération provoquée par un produit chimique et d'orienter le choix des modèles d'infection dans la deuxième étape (Luster *et al.*, 1988).

La deuxième étape est effectuée si des altérations fonctionnelles ont été mises en évidence lors des tests de la première étape, avec des doses n'entraînant pas d'effet toxique apparent (diminution du poids corporel par exemple). Les investigations concernent la CMI, l'HMI, l'immunité non spécifique et la résistance de l'hôte à diverses infections et au développement de tumeurs ; elles fournissent des informations sur le mécanisme immunotoxique et aident à caractériser la nature de l'effet.

Tableau 8 : Batterie de tests pour la détection d'altérations immunitaires consécutives à l'exposition de rongeurs^a à des produits chimiques industriels ou à des médicaments (d'après Luster *et al.*, 1988 et 1992a).

Paramètre	Procédure
Première étape	
<i>Immunopathologie</i>	Hématologie : numération et formule sanguine Pesée : corps, rate, thymus, rein, foie Cellularité : rate, moelle osseuse Histologie des organes lymphoïdes
<i>Immunité à médiation humorale</i>	Numération des cellules formant plages (PFC) à IgM anti antigène T-dépendant (SRBC) Blastogenèse des lymphocytes B induite par le lipopolysaccharide (LPS)
<i>Immunité à médiation cellulaire</i>	Blastogenèse des lymphocytes T : - lectines : PHA, ConA - leucocytes allogéniques (MLR)
<i>Immunité non spécifique</i>	Activité des cellules NK
Deuxième étape	
<i>Immunopathologie</i>	Quantification des lymphocytes T et B spléniques (marqueurs de surface)
<i>Immunité à médiation humorale</i>	Numération des PFC à IgG anti-SRBC ^b
<i>Immunité à médiation cellulaire</i>	Cytolyse par des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) Réponse d'hypersensibilité retardée (DHR)
<i>Immunité non spécifique</i>	Fonction macrophagique, quantification des cellules péritonéales résidentes, activité phagocytaire ^c
<i>Modèles de résistance de l'hôte^d</i>	Cellules tumorales syngéniques Sarcome PYB6 (incidence de tumeur) Mélanome B16F10 (quantité de nodules pulmonaires) Modèles bactériens <i>Listeria monocytogenes</i> (morbidity) <i>Streptococcus</i> (morbidity) Modèle viral Influenza (morbidity) Modèle parasitaire <i>Plasmodium yoelii</i> (parasitémie)

^a Cette batterie de tests a été développée sur des souris B6C3F1

^b Ce test n'est pas toujours effectué

^c Test retiré de la batterie en 1992

^d Seuls un ou deux modèles sont testés pour chaque produit chimique

La baisse de la résistance de l'hôte aux infections implique de nombreux mécanismes cellulaires et subcellulaires : communication entre cellules, altération de l'expression de molécules constitutives, apparition de néoantigènes, modulation du signal de transduction et/ou altération de facteurs de transcription. La réponse cellulaire dépend principalement des macrophages et des lymphocytes T helper (Th1), producteurs d'IL2. Si la production de ces cellules est bloquée, la réponse sera très fortement ralentie, puisque la coopération

macrophage-lymphocyte sera très faible. Il n'est pas utile d'utiliser tous les modèles de résistance de l'hôte à l'infection : généralement, deux modèles sont choisis en fonction des informations fournies par les tests fonctionnels de la première étape. Par exemple, si les produits testés provoquent une altération de la fonction des lymphocytes T, le modèle bactérien *Listeria monocytogenes* (bactérie intracellulaire) ou le modèle tumoral PYB6 sera choisi ; si le produit a des effets lorsqu'il est administré par voie pulmonaire, les modèles Influenza (viral) ou B16F10 (développement de tumeurs pulmonaires) seront préconisés.

En Europe, un système semblable a été mis en place par le NIPHEP (National Institute of Public Health and Environmental Protection, Pays-Bas). Les tests sélectionnés et leur répartition dans les deux étapes ne sont pas rigoureusement identiques au modèle préconisé par le NTP mais le principe d'une méthodologie en deux étapes est conservé (Vos *et al.*, 1989 ; Vos & Van Loveren, 1994).

II.4.4.2. Tests recommandés par le NTP

Etape de tri

Les investigations immunopathologiques faisant partie de la première étape de tri sont des paramètres généraux des organes lymphoïdes et du système sanguin qui permettent de déceler une anomalie cellulaire (déplétion par exemple). L'histologie du thymus, de la rate et des ganglions lymphoïdes, le poids de la rate et du thymus, la numération et la formule sanguine et la cellularité de la rate et de la moelle osseuse sont des tests qui peuvent être incorporés en histopathologie de routine. L'histopathologie des organes lymphoïdes, en association avec une modification du poids de la rate et/ou du thymus, ou de la cellularité de la rate, permet de détecter un effet immunomodulateur (Schuurman *et al.*, 1994). Une étude approfondie permet de déterminer les divisions structurales de la rate, et d'évaluer la répartition des cellules T et B (colorations spécifiques, marquage immunologique, cytométrie de flux).

La capacité de réponse humorale peut être étudiée par deux types de tests : la mesure de la réponse anticorps et la capacité des lymphocytes B à proliférer *in vitro* : la réponse anticorps primaire aux globules rouges de mouton est très sensible à de nombreux produits chimiques et la technique des PFC est couramment utilisée. La réponse à cet antigène T-dépendant nécessite une coopération entre macrophages, lymphocytes T et lymphocytes B. Ce test peut donc détecter les altérations fonctionnelles à tous les niveaux (activation, différenciation, prolifération...).

La prolifération des lymphocytes B est une des étapes clés du développement d'une réponse immunitaire humorale qui peut être suivie *in vitro* par l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN de lymphocytes B stimulés par du LPS (lipopolysaccharide bactérien). Cependant, les résultats de ce test ne sont pas toujours corrélés à la réponse anticorps, car la mitogenèse au LPS n'explore qu'une partie de la maturation cellulaire (les étapes plus

précoces ou plus tardives de la différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps ne sont pas prises en compte).

Deux tests sont préconisés pour mettre en évidence une modification de l'immunité à médiation cellulaire dans l'étape de tri : la prolifération des cellules T sous l'action d'une lectine mitogène, la concanavaline A (ConA) et/ou la phytohémagglutinine (PHA). Le principe de la mesure est le même que pour les lymphoproliférations au LPS (incorporation de [³H] thymidine) ; la sensibilité de détection dépend de la concentration du mitogène, qui devra donc toujours être optimale.

La réponse lymphocytaire mixte (MLR : "Mixed Lymphocyte Response") qui est un test particulièrement sensible aux immunosuppressions chimiques. Il consiste à mesurer la prolifération des lymphocytes spléniques lors d'un contact avec des cellules allogéniques (d'un individu de même espèce), par incorporation de thymidine tritiée. Il est préférable d'effectuer des réactions unidirectionnelles, en inactivant la prolifération des cellules stimulatrices (mitomycine C). Sur le plan clinique, la MLR correspond aux réactions de rejet de greffe. Ces deux tests de prolifération *in vitro* ne sont pas très sensibles, mais ils ont l'avantage de se pratiquer dans des conditions semblables à celles du test de prolifération des lymphocytes B, et ne représentent pas une surcharge de travail importante par rapport à ce test.

L'immunité non spécifique peut être explorée en mesurant l'activité des cellules NK qui ont une activité cytotoxique naturelle contre les cellules tumorales (inhibition de la croissance et de la dissémination métastatique) et certains agents infectieux. Leur activité NK est évaluée en mesurant la quantité de ⁵¹Cr relarguée par des cellules cibles (lymphome murin YAC-1, par exemple). L'activité des cellules NK est indépendante des voies de l'immunité spécifique et ces cellules sont les cibles spécifiques d'un certain nombre de produits chimiques (Luster *et al.*, 1987).

Etape de compréhension et d'évaluation de la résistance de l'hôte

La quantification des sous-populations spléniques de lymphocytes T et B renseigne sur la spécificité du mode d'action du produit testé au niveau d'une modulation fonctionnelle ou d'une déplétion cellulaire. Les marqueurs Lyt2, L3T4 (souris), CD4 et CD8 peuvent être recherchés ; le rapport CD4:CD8 est un paramètre souvent utilisé.

La capacité de réponse humorale secondaire peut être évaluée par un test de plages de lyse à IgG, mais ce test n'est pas réalisé systématiquement. Les tests portant sur l'immunité cellulaire renseignent sur la fonction cellulaire effectrice atteinte. L'interaction de lymphocytes T avec des cellules tumorales ou allogéniques induit la synthèse d'IL2 et de ses récepteurs, ce qui provoque le développement de lymphocytes Tc. La genèse des lymphocytes Tc est mesurée *in vitro* à l'aide d'une lignée de cellules tumorales cibles. La réponse à médiation cellulaire peut être estimée *in vivo*, grâce la réaction d'hypersensibilité retardée

Plaque Forming Cells	73 (45)	P < .0001											
NK Cell Activity	94 (34)	69 (36)	P = .0014										
T Cell Mitogens	85 (40)	79 (34)	67 (46)	P = .0003									
MLR	82 (34)	74 (31)	73 (37)	56 (39)	P = .0458								
DHR	89 (27)	84 (19)	82 (28)	74 (23)	57 (30)	P = .0348							
CTL	100 (8)	78 (9)	71 (7)	75 (8)	67 (9)	P = .2380							
Surface Markers	91 (23)	90 (21)	92 (24)	87 (23)	93 (14)	100 (5)	83 (24)	P = .0017					
Leukocyte Counts	86 (28)	71 (24)	62 (29)	59 (27)	67 (18)	67 (6)	80 (20)	43 (30)	P = .4490				
Thymus/BW Ratio	92 (38)	81 (31)	83 (36)	77 (30)	75 (24)	71 (7)	90 (21)	72 (29)	68 (40)	P = .0009			
Spleen/BW Ratio	85 (39)	75 (32)	76 (37)	65 (31)	71 (24)	75 (8)	86 (22)	62 (29)	73 (40)	61 (41)	P = .0395		
Spleen Cellularity	80 (35)	72 (29)	72 (32)	63 (30)	67 (21)	71 (7)	76 (21)	60 (25)	75 (32)	63 (32)	56 (36)	P = .0694	
LPS Response	81 (37)	73 (30)	69 (39)	65 (31)	58 (24)	83 (6)	90 (20)	56 (27)	74 (34)	71 (35)	63 (27)	50 (40)	P = 0.2260

Figure 31 : Concordance des tests immunologiques individuels ou appariés pour établir la prédiction d'effets immunologiques. Les valeurs représentent le pourcentage de concordance (somme des valeurs de spécificité (-/-) et de sensibilité (+/+)). Les valeurs de la concordance des tests individuels sont situées sur la diagonale, les valeurs correspondant aux combinaisons de tests sont situées sous la diagonale. Le nombre de produits chimiques testés est indiqué entre parenthèses. Les valeurs de *p* ne sont données que pour les concordances individuelles (selon Luster *et al.*, 1992a).

	Plaque Forming Cells	NK Cell Activity	T Cell Mitogens	Mixed Leukocyte Response	Delayed Hypersensitivity	CTL	Surface Markers	Leukocyte Counts	Thymus/BW Ratio	Spleen/BW Ratio	Spleen Cellularity	LPS Response
Plaque Forming Cells	73 (41)											
NK Cell Activity	77 (31)	73 (33)										
T Cell Mitogens	78 (36)	77 (31)	71 (41)									
Mixed Leukocyte Response	70 (30)	71 (28)	75 (32)	68 (34)								
Delayed Hypersensitivity	73 (26)	79 (19)	81 (26)	81 (29)	82 (28)							
CTL	100 (5)	83 (16)	75 (4)	80 (50)	—	67 (6)						
Surface Markers	80 (20)	78 (18)	81 (21)	75 (20)	79 (14)	100 (2)	71 (21)					
Leukocyte Counts	72 (25)	67 (21)	65 (26)	67 (24)	83 (18)	67 (3)	65 (17)	56 (27)				
Thymus/BW Ratio	71 (35)	79 (28)	73 (33)	85 (27)	79 (24)	75 (4)	78 (18)	81 (26)	76 (37)			
Spleen/BW Ratio	75 (36)	79 (29)	76 (34)	79 (28)	75 (24)	80 (5)	74 (19)	69 (26)	76 (37)	74 (38)		
Spleen Cellularity	71 (31)	69 (26)	74 (27)	72 (25)	79 (19)	75 (4)	61 (18)	64 (22)	76 (29)	76 (29)	71 (31)	
LPS Response	62 (34)	63 (27)	64 (36)	68 (28)	67 (24)	100 (3)	76 (17)	67 (24)	74 (31)	66 (32)	58 (24)	54 (37)

Figure 32 : Concordance des tests immunologiques individuels ou appariés pour établir la prédiction de modifications de la résistance de l'hôte. Les valeurs représentant le pourcentage de concordance (somme des valeurs de spécificité) des test individuels sont situées sur la diagonale, les valeurs correspondant aux combinaisons de tests sont situées sous la diagonale. Le nombre de produits chimiques testés est indiqué entre parenthèses (selon Luster *et al.*, 1994b).

("Delayed Hypersensitivity Response" : DHR) à la KLH¹⁰, qui dépend de toutes les étapes de la CMI : reconnaissance et digestion de l'antigène, blastogénèse et prolifération, migration des cellules T mémoires sur le site de l'inflammation, production et libération de médiateurs inflammatoires et de lymphokines. Ce test est plus sensible chez l'homme que chez la souris.

La numération et la capacité fonctionnelle des macrophages péritonéaux résidents (immunité non spécifique) sont assez peu sensibles et ont été supprimés de la batterie de tests de deuxième étape en 1992.

La diminution de la résistance de l'hôte à des agents infectieux ou à des cellules tumorales permet d'évaluer *in vivo* les effets immunotoxiques réels du produit testé. L'agent infectieux ou les cellules tumorales sont administrés une première fois aux souris à des doses faible (DL₁₀₋₃₀ ou DT₁₀₋₃₀¹¹ respectivement). Une seconde administration à doses plus élevées (DL₆₀₋₈₀ ou DT₆₀₋₈₀) permet de définir si le traitement des animaux avait permis leur immunisation vis-à-vis de l'agent pathogène. Les modèles utilisés sont bactériens, tumoraux, parasitaires ou viraux (tableau 8).

Sensibilité et performance des tests

Une cinquantaine de produits ont été testés suivant ces protocoles et les données obtenues ont été traitées dans le but de déterminer quels sont les tests les plus sensibles et donnant la meilleure concordance¹² (Luster *et al.*, 1993 ; Luster *et al.*, 1994a). Si l'on considère les tests individuellement, seulement deux tests sont prédictifs d'effets immunotoxiques¹³ : la réponse anticorps primaire aux globules rouges de mouton et les sous-populations lymphocytaires (respectivement, 78 et 83% de concordance ; la combinaison de deux tests améliore la concordance. L'association des tests PFC et CTL permet d'obtenir une prédiction des effets immunotoxiques de 100% ; les tests associés à la quantification des PFC, à la DHR ou aux marqueurs de surface donnent les meilleurs degrés de concordance (figure 31 ; Luster *et al.*, 1992a). Les auteurs ont également établi que 81% des composés immunotoxiques testés sont carcinogènes ($p = 0,019$).

Une altération importante d'un seul composant du système immunitaire ou l'accumulation d'altérations de moindre importance sur plusieurs composants peut conduire à la baisse de résistance de l'hôte : la concordance des tests avec la résistance de l'hôte aux infections a également été évaluée : quelques tests peuvent prédire une susceptibilité accrue aux infections avec une concordance supérieure à 70% (PFC, DHR, marqueurs de surface, cellularité de la rate...), alors que d'autres sont d'assez mauvais indicateurs (réponse au LPS, numération des lymphocytes ; figure 32 ; Luster *et al.*, 1992b). La combinaison des différents

¹⁰Keyhole from Limpet Hemocyanin (Ag T-dépendant)

¹¹ Dose tumorigène

¹² Combinaison de la spécificité et de la sensibilité de chaque test (sensibilité : le test est positif et il y a un effet immunotoxique (+/+); spécificité : le test est négatif et il n'y a pas d'effet immunotoxique (-/-)).

¹³ Une réponse immunotoxique positive est définie par Luster *et al.* (1992b) comme une relation dose-réponse (les deux plus fortes doses doivent provoquer des modifications significatives, $p < 0,05$) dans au moins un des tests ou l'altération significative ($p < 0,05$) du résultat de au moins deux tests différents.

tests avec les PFC, les marqueurs de surface ou la DHR permet d'obtenir une concordance nettement supérieure à la combinaison d'autres test, à l'exception de la combinaison cellules NK-CTL (83%).

En conclusion :

- il existe une bonne corrélation entre les effets immunotoxiques et l'altération de la résistance de l'hôte : la résistance n'est jamais altérée sans qu'un test immunotoxique soit positif, mais il est possible que des effets immunotoxiques soient observés sans que la résistance de l'hôte soit altérée,

- aucun test individuel ne suffit à prédire une altération de la résistance, mais de nombreux tests sont de bons indicateurs et leur combinaison améliore fortement leur aptitude de prédiction,

- si l'on considère que la population humaine est constamment soumise à un certain nombre d'infections, il est probable qu'une altération de la fonction immunitaire par un produit immunotoxique affecte la capacité de résistance des individus à ces infections. Cela a été démontré expérimentalement, mais une démonstration clinique s'avère difficile,

- la majorité des relations entre les fonctions immunitaires et la résistance de l'hôte sont corrélées de façon linéaire (avec de faibles doses de cyclophosphamide ; Luster *et al.*, 1994b).

Application au rat

Pendant de nombreuses années, l'espèce de choix en immunotoxicologie a été la souris. Aujourd'hui, le rat est considéré comme un modèle d'autant plus intéressant qu'il est utilisé pour les études toxicologiques de routine et de nombreux produits spécifiques du rat (cytokines, anticorps) sont maintenant disponibles sur le marché. La plupart des tests validés sur les souris ont donc été adaptés sur les rats par les laboratoires américains et européens (Exon *et al.*, 1990 ; Lang *et al.*, 1993 ; Vos & Van Loveren, 1994 ; Yang *et al.*, 1994).

McMurry *et al.* (1991, 1995) ont montré que différents biomarqueurs d'immunotoxicité étaient applicables à des rats sauvages (*Sigmodon hispidus*) piégés *in situ* ou élevés en laboratoire et préconisent leur emploi dans la surveillance de l'environnement.

Application à l'homme

L'évaluation de l'immunotoxicité est relativement aisée chez les animaux, mais il est difficile d'extrapoler ces résultats à l'homme. L'évaluation des effets immunotoxiques chez l'homme est délicate, du fait que les techniques invasives et les infections provoquées ne peuvent être employées. Vos & Van Loveren (1995) ont développé une batterie de tests réalisables chez l'homme, basée sur des paramètres non invasifs (dosage d'Ig sériques, numération et formule sanguine, sous-populations lymphocytaires, réaction d'hypersensibilité de contact, mesure de marqueurs de l'inflammation, dosage d'autoanticorps...). Les résultats obtenus sur l'homme et l'animal peuvent se compléter (la similarité ou la différence de

certains résultats peuvent renseigner sur d'éventuels effets sur la résistance de l'hôte, par exemple). Le développement de techniques non invasives pourrait profiter à certaines espèces de mammifères particulièrement précieuses.

III. SURVEILLANCE BIOLOGIQUE DE L'ENVIRONNEMENT : ANIMAUX SENTINELLES, BIOMARQUEURS ET BIOESSAIS

L'étude de la pollution environnementale est compliquée du fait a) des interactions qui existent entre le milieu et le polluant et b) de la multiplicité des pollutions. Il est rarement possible de faire l'analyse de tous les polluants présents dans le sol, l'eau, les sédiments ou l'atmosphère mais la connaissance du niveau de contamination des écosystèmes est nécessaire, bien qu'il ne suffise pas à évaluer l'impact d'un polluant sur l'environnement. En effet, rien ne prouve que les teneurs en polluants détectées dans le milieu soient suffisantes pour provoquer un dysfonctionnement biologique décelable. D'autre part, la toxicité du ou des polluants présents dépend de leur biodisponibilité et des interactions antagonistes ou synergiques qui existent entre eux. De plus, les aspects physiologiques, génétiques et comportementaux des individus doivent être pris en considération pour évaluer l'impact d'une pollution en situation réelle (McBee & Bickham, 1990).

La surveillance biologique de l'environnement par des indicateurs biologiques animaux est destinée à compléter les informations obtenues par des techniques analytiques. Elle est basée sur l'usage de deux outils : les indicateurs biologiques de bioaccumulation et les indicateurs biologiques d'effets. Par des critères différents, ces organismes informent sur les milieux dans lesquels ils vivent (O'Brien *et al.*, 1993) :

- la capacité des espèces bioaccumulatrices à pouvoir concentrer des polluants présents à de très faibles concentrations dans le milieu permet de suivre le niveau de pollution de leur environnement. Dans le milieu aquatique, certains mollusques (moules), invertébrés et poissons sont utilisés à cette fin. En milieu terrestre les invertébrés sont les plus utilisés, mais les oiseaux ou les mammifères peuvent également concentrer certains polluants dans leurs phanères (métaux lourds dans le plumage, les bois de Cervidés, les dents ou les os) ou d'autres tissus.

- les indicateurs d'effet biologique peuvent être séparés en deux catégories : les indicateurs d'effets écologiques et les indicateurs d'effets toxiques. Un indicateur écologique est une population ou un ensemble de populations qui, par ses caractéristiques qualitatives et/ou quantitatives, témoigne de l'état d'un écosystème et qui, par des variations de ses caractéristiques, permet de détecter d'éventuelles modifications de ce système. De tels indicateurs permettent la mise en évidence de l'impact d'une pollution sur les différentes populations formant la biocénose (taille, structure, répartition des populations). Les indicateurs toxicologiques font appel à différentes méthodes d'investigations, telles que

biologie, biochimie, physiologie, cytologie.... Ils sont liés à des biomarqueurs d'exposition ou d'effets toxiques au niveau de l'individu et peuvent être utilisés comme systèmes d'alarme précoces d'une contamination dont les effets peuvent encore être réversibles (systèmes d'animaux sentinelles). La mise en évidence de tels effets n'est qu'une présomption d'effets défavorables, mais l'impact sur les populations sera ressenti si les effets se propagent dans les niveaux supérieurs.

III.1. Les systèmes d'animaux sentinelles

III.1.1. Définitions

Un système d'animaux sentinelles est défini comme "un dispositif destiné à collecter, systématiquement et régulièrement, des données sur des animaux exposés à la pollution environnementale, ces données étant ensuite analysées pour identifier les dangers potentiels pour la santé de l'homme et de l'environnement" (National Research Council, 1991). Les notions de prévision (d'une maladie, d'un désordre physiologique, voire d'une mortalité) et de signal d'alarme complètent cette définition (McBee & Bickham, 1990 ; Rothwell *et al.*, 1991).

Un système d'animaux sentinelles au sens strict concerne des données obtenues sur une population vivant dans des conditions naturelles sur le site pollué. Cependant, des variantes expérimentales portant sur le traitement des animaux collectés peuvent être envisagées : prélèvements ou mesures de paramètres non invasifs et relâchement des animaux, ou sacrifice dans un délai plus ou moins long après la capture. Ce type d'étude est donc davantage de nature épidémiologique qu'expérimentale, mais il est possible de se placer entre ces deux extrêmes en jouant sur le caractère plus ou moins "sauvage" de l'espèce animale ou plus ou moins "pur" du produit (Rivière, 1993). Ainsi, l'exposition d'animaux engagés *in situ* peut être pratiquée dans le milieu terrestre (encagement de campagnols, Maly, 1984 ; Dickerson *et al.*, 1994) même si cette méthode est surtout pratiquée en milieu aquatique. Les animaux peuvent être exposés à des échantillons provenant du site pollué : ajout d'effluents à l'eau de l'aquarium (poisson, daphnies), ingestion de petites quantités de matériaux bruts par des rats (sol, cendres, lixiviats ou extraits organiques), mélange des matériaux bruts à la litière (ver de terre, rats) ; on parlera alors de bioessai.

III.1.2. Critères de sélection d'une espèce appropriée

Les animaux sentinelles peuvent appartenir à plusieurs groupes zoologiques : invertébrés terrestres ou aquatiques, oiseaux, poissons, animaux domestiques et petits mammifères ont déjà été utilisés à cette fin. Sur le plan évolutif, les mammifères sont les plus proches de l'homme et sont de bons candidats à la surveillance des écosystèmes terrestres. Une bonne espèce sentinelle doit remplir plusieurs conditions (National Research Council, 1991) :

- présence de l'espèce dans la zone polluée,
- possibilité de capture facile : les campagnes de capture doivent être brèves, mais les effectifs doivent être suffisants pour permettre une exploitation statistique des résultats,
- densité de population suffisante pour permettre des prélèvements ne perturbant pas la structure des populations,
- aire de dispersion connue : pour les zones polluées de faible importance, il est préférable d'utiliser des animaux ayant une dispersion réduite,
- la taille des individus doit permettre les examens biologiques et biochimiques nécessaires, notamment lorsque ceux-ci sont effectués sur des organes,
- les voies d'exposition déterminées par l'habitat et la position dans la chaîne trophique doivent être connues,
- possibilité de disposer d'animaux témoins. Les animaux témoins sont un élément fondamental du dispositif ; ils ne doivent pas être exposés à une pollution, ou tout au moins présenter un niveau de contamination suffisamment bas pour être considéré comme négligeable. L'utilisation d'animaux de la même espèce, maintenus dans des conditions semi-naturelles au laboratoire peut être envisagée, mais la semi-captivité peut influencer des variables physiologiques.

III.1.3. Avantages et limites des dispositifs d'animaux sentinelles

Les études basées sur des systèmes d'animaux sentinelles complètent les résultats analytiques, les essais d'écotoxicité classiques, les études épidémiologiques humaines ou les études éco-épidémiologiques (Kendall *et al.*, 1990). Par rapport aux tests classiques de toxicité, ces études présentent l'avantage d'être pratiquées dans des conditions réalistes en termes de mode d'exposition et de dose, ce qui leur permet de renseigner sur les voies d'exposition pour les différentes espèces, dont l'homme. Les animaux sentinelles sont de bons systèmes d'alarme d'une perturbation de leur environnement. Ils permettent aussi d'évaluer l'efficacité d'une mesure de dépollution, de suivre l'évolution de la pollution et d'établir des corrélations entre les effets toxiques observés et des variables physiologiques ou des variables temporelles à court terme (variations diurnes, saisonnières...) ; un suivi à long terme pourra élucider les tendances et les évolutions de la réponse au cours du temps (Ma et Harris, 1985 ; National Research Council, 1991). La comparaison de plusieurs modèles *in situ* basés sur l'étude de sites pollués et non pollués permet d'établir des niveaux de base correspondant aux deux types de sites (McBee & Bickham, 1990).

La courte espérance de vie de certains animaux comparée à celle de l'homme (les petits mammifères notamment) permet de considérer les effets toxiques sur le cycle de vie complet ou sur plusieurs générations (effets sur la reproduction, carcinogénèse). Les exigences éthiques moins strictes pour l'animal que pour l'homme permettent de mener des études plus approfondies que dans les études épidémiologiques humaines, ce qui enrichit les

informations en cas d'extrapolation à l'homme. Enfin, le fait de travailler sur des populations non sélectionnées permet de prendre en compte toutes les variations individuelles d'une population sauvage (âge, sexe, terrain...). Cette variabilité complique les interprétations, mais permet de pratiquer des estimations beaucoup plus proches de la réalité.

III.1.4. Quelques exemples

L'animal sentinelle le plus connu est certainement le canari : cet oiseau plus sensible que l'homme au monoxyde de carbone était utilisé par les mineurs pour détecter la présence anormale de ce gaz dans les galeries. En Angleterre, au XIX^{ème} siècle, la mort d'animaux de bétail a été associée à une émission intense de fumées industrielles, qui ont ensuite provoqué une augmentation de la morbidité et de la mortalité des populations humaines (National Research Council, 1991). Ainsi, l'exposition d'animaux dans le même environnement que l'homme permet d'obtenir des informations sur l'identification du danger et l'évaluation du risque : les animaux sont, comme les hommes, exposés aux contaminants de l'air, du sol, de l'eau, de la nourriture et peuvent souffrir d'intoxications chroniques ou aiguës. Dans certaines circonstances, les systèmes d'animaux sentinelles procurent des résultats plus rapidement, à moindre prix et dans des conditions plus réalistes que les expérimentations en laboratoire.

Deux types d'informations peuvent être recherchés sur les animaux sentinelles : la présence de polluants dans les tissus qui renseigne directement sur la qualité du milieu et sur la biodisponibilité des polluants et la présence de signes de toxicité qui renseignent sur le danger d'une exposition à ce milieu. Ces différents types de biomarqueurs seront développés plus loin, et nous ne citerons ici que quelques études ayant utilisé des populations animales pour surveiller l'état de leur environnement.

Le "Mussel Watch" est la plus grande opération de surveillance du milieu aquatique qui ait été mise en place. Ce programme, débuté aux États-Unis en 1973 sous la tutelle de l'EPA (Environmental Protection Agency), est toujours en place aux États-Unis (sous l'égide de la National Oceanic and Atmospheric Administration) et en Europe. Ce programme est basé sur l'étude des bivalves (moules ou huîtres) vivant sur les côtes américaines et européennes. Ces animaux, capables de bioconcentrer 100 à 100.000 fois de nombreux composés présentent entre autres avantages celui d'être sédentaires et cosmopolites. Des paramètres physiologiques et biochimiques sont suivis sur ces animaux.

Avec les espèces terrestres, les études entreprises sont de moins grande envergure que le "Mussel Watch", mais plusieurs études *in situ* ont été réalisées (essentiellement aux États-Unis) le plus souvent avec des petits mammifères (revue par McBee & Bickham, 1990). Les paramètres suivis sont variés : certaines études sont limitées à la mesure de la dose interne (Beardsley *et al.*, 1978), d'autres associent la dose interne ou d'autres paramètres entre eux (modifications physiomorphologiques, histologiques, biochimiques, génétiques, troubles de la reproduction... ; Rowley *et al.*, 1983 ; Batty *et al.*, 1990 ; McBee & Bickham, 1990 ; Owen &

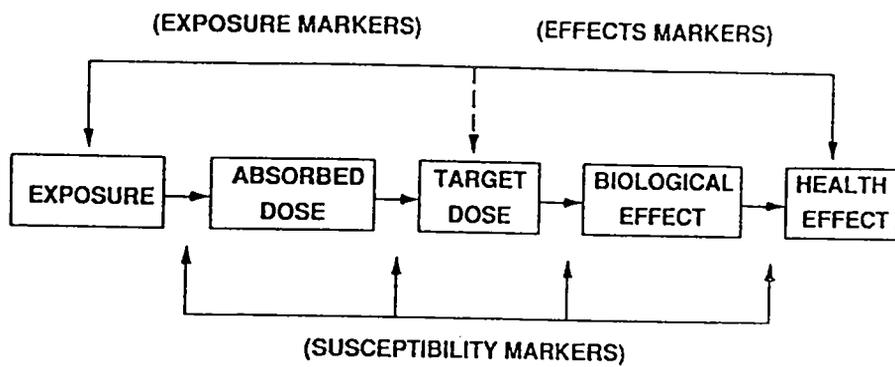


Figure 33 : Diagramme simplifié de la cascade d'événements compris entre l'exposition et les effets sur la santé, montrant les relations entre les marqueurs d'exposition, les marqueurs d'effets et les marqueurs de susceptibilité (selon Fowle et Sexton, 1992).

McBee, 1990 ; revue par Talmage & Walton, 1991). Quelques études portent uniquement sur des critères écologiques (Flickinger & Nichols, 1990).

III.1.5. Le surmulot, animal sentinelle de la pollution des sols

Les petits mammifères, les rongeurs en particulier, répondent particulièrement bien aux exigences nécessaires : ubiquistes, ayant une aire de dispersion limitée (inférieure à 3 hectares, Talmage & Walton, 1991), retrouvés à la fois en zone rurale, urbaine et suburbaine, ils ont une durée de vie assez longue et peuvent être présents en abondance. Les surmulots, qui sont les plus grosses espèces commensales de l'homme, sont omnivores ; les décharges, les égouts, les fermes (proximité d'élevages) sont leurs lieux de prédilection. Le surmulot appartient à l'espèce *Rattus norvegicus* (famille des Muridae). Il peut peser jusqu'à 600 grammes et mesurer jusqu'à 26 cm de longueur de corps et 21 cm de longueur de queue. Le surmulot a déjà été utilisé comme biomoniteur en zone urbaine, mais le principal avantage de cet animal est qu'il a fait l'objet d'un très grand nombre d'études toxicologiques expérimentales, puisque les rats de laboratoire sont une souche albinos de cette espèce. D'autre part, le fait qu'il soit considéré comme un animal nuisible limite les problèmes éthiques liés à leur sacrifice.

III.2. Les biomarqueurs

III.2.1. Définitions

Un biomarqueur est un "indicateur de toute altération morphologique, structurale ou physiologique au niveau moléculaire, cellulaire ou tissulaire d'un système biologique, induite par un xénobiotique présent dans l'environnement de l'individu exposé" (National Research Council, 1989). Il en existe trois catégories (figure 33) : les biomarqueurs d'exposition, qui indiquent la présence dans l'organisme d'un ou plusieurs polluants, les biomarqueurs d'effets qui renseignent sur les risques d'effets toxiques et les biomarqueurs de sensibilité individuelle qui indiquent l'existence d'une sensibilité différente à certains toxiques dans une partie de la population (capacité métabolique, capacité de réparation de l'ADN, mutations dans des gènes suppresseurs, ...).

De très nombreux paramètres biologiques ou biochimiques liés plus ou moins directement au mode d'action des polluants et à la genèse de pathologies peuvent servir de base pour développer et valider des biomarqueurs. Les tests usuels de biologie ou de biochimie clinique (formule sanguine, teneurs plasmatiques, activités enzymatiques...) peuvent donner des informations sur l'état de santé de l'organisme. Par exemple, un taux élevé de cholestérol sanguin est indicateur d'un risque accru de maladies cardio-vasculaires.

III.2.2. Intérêt des biomarqueurs

La pollution environnementale est soupçonnée d'être la cause d'une dégradation insidieuse de la santé. Des processus pathogènes à long terme comme le vieillissement cellulaire, le développement de cancers, l'abaissement des défenses immunitaires, les troubles de la reproduction ou du développement réduiraient l'espérance de vie d'une génération ou compromettraient les chances de la génération suivante. L'écotoxicologie se doit donc de mettre en évidence les effets de la contamination prolongée par de faibles doses de polluants dans la genèse de tels effets. Le biomarqueur est alors considéré comme un signal d'alarme, précoce et sensible du risque de développement d'effets à long terme : on comprend tout l'intérêt de tels indicateurs pour déceler des maladies chez l'homme ou des signes d'altérations organiques ou fonctionnelles chez des animaux sentinelles avant que des dommages irréversibles soient arrivés à l'individu ou à l'écosystème.

Chez l'homme, la recherche de biomarqueurs d'exposition à des produits chimiques considérés comme présentant un risque toxique élevé (benzène, trichloroéthylène, acrylamide, plomb...) ou à des classes de produits tels que PCB ou dioxines est actuellement une priorité (recommandée par l'EPA). Les méthodes utilisant des biomarqueurs humains doivent être non invasives : les biomarqueurs sont généralement des mesures d'activités enzymatiques (par exemple, mesure de l'activité cholinestérase plasmatique chez des travailleurs de l'industrie phytosanitaire et les applicateurs de pesticides), des dosages de polluants ou de leurs métabolites dans le sang, les urines, les phanères...). En terme d'effets, il s'agira de rechercher des biomarqueurs de cancer, de neurotoxicité, d'immunotoxicité, de toxicité pulmonaire et des biomarqueurs des troubles de la reproduction ou du développement (Fowle & Sexton, 1992).

Les biomarqueurs ont donc un intérêt potentiel considérable pour prédire les effets de la pollution environnementale pour l'homme et d'autres espèces animales à risque, comme les poissons ou les espèces placées au sommet des chaînes alimentaires (rapaces, oiseaux piscivores ou petits mammifères carnassiers). Les biomarqueurs pourront être recherchés dans des populations d'animaux sentinelles, avec l'avantage que les examens biochimiques et les explorations fonctionnelles peuvent être beaucoup plus poussées que chez l'homme.

III.2.3. Exemples de biomarqueurs utilisés dans l'étude de pollutions environnementales

Plusieurs espèces animales (oiseau, mammifères (bétail ou rongeurs...), vers de terre...) ont été utilisées conjointement avec divers biomarqueurs dans le but de mettre en évidence l'exposition ou les effets d'une pollution. Un certain nombre de biomarqueurs actuellement très utilisés chez les animaux n'ont pu être développés chez l'homme, car ils nécessitent des techniques invasives (prélèvement d'organes par exemples). Le tableau 9 résume les grandes classes de biomarqueurs utilisés pour la mise en évidence d'une exposition à des contaminants biodisponibles.

Tableau 9 : Marqueurs biologiques d'exposition à des polluants environnementaux (d'après Shugart *et al.*, 1989).

Polluant environnemental	Marqueur biologique	Type d'information
Métaux toxiques Cu, Hg, Ag, Zn, Cd, Pb	Intégrité de l'ADN	a
	Métalloprotéines	a, b
	Biosynthèse des porphyrines	a, b, c
	Réponse immunitaire	a
	Métabolisme des xénobiotiques	a
Composés organiques		
HAP	Adduits à l'ADN ou à l'hémoglobine	a, b, c
	Métabolisme des xénobiotiques	a, b
	Réponse immunitaire	a
	Intégrité de l'ADN	a
PCB et dioxines	Métabolisme des xénobiotiques	a
	Profil des porphyrines	a
	Réponse immunitaire	a
	Intégrité de l'ADN	a
	Adduits à l'ADN ou à l'hémoglobine	a, b

a : Signal d'un problème potentiel

b : Indicateur d'une classe ou d'un type de polluant

c : Indicateur prédictif d'un effet néfaste à long terme

Les petits mammifères sont particulièrement bien adaptés à l'étude de sites pollués par des mélanges de polluants. Collectés *in situ*, ils ont été utilisés pour l'évaluation de plusieurs types de contamination (composés organiques, métaux, radioéléments), l'exemple le plus typique étant le site de Love Canal (États-Unis) étudié par de nombreuses équipes (McBee *et al.*, 1987 ; Thompson *et al.*, 1988 ; Batty *et al.*, 1990 ; Rattner *et al.*, 1993). Le choix des biomarqueurs et des organes est guidé par le type de pollution : d'une manière générale, le rein est un organe permettant la détection d'une exposition à un grand nombre de contaminants inorganiques, mais la moelle osseuse est particulièrement intéressante pour les expositions au plomb ou au fluor.. Pour les contaminants organiques, les points finaux sont nombreux et dépendent de la classe du contaminant : dose interne, activités enzymatiques, histologie des organes cibles, génotoxicité... (revue par Talmage & Walton, 1991).

III.2.3.1. Biomarqueurs d'exposition

L'exposition d'un organisme à un polluant biodisponible peut être mise en évidence de plusieurs façons : soit par la recherche du polluant ou de ses métabolites dans l'organisme, soit par la recherche de biomarqueurs d'exposition.

Plusieurs études ont mis en évidence l'accumulation de plomb, de cadmium ou de mercure dans les organes vitaux de petits mammifères vivant dans des zones urbaines ou industrielles (Bull *et al.*, 1977 ; Way & Schroder, 1982 ; Kisseberth *et al.*, 1984 ; Ma *et al.*, 1991) ou consécutivement à des épandages de boues de STEP (Anderson *et al.*, 1982). Le dosage de composés lipophiles (PCB, dioxines, HAP) dans le tissu adipeux renseigne sur leur

bioaccumulation et sur la biomagnification qui en résulte. Le lait est une sécrétion très utilisée pour la mise en évidence d'une exposition humaine à ce type de composés. La mesure de métaux et de radioéléments dans l'organisme d'animaux sauvages est en relation avec les dépôts sur le sol et le régime alimentaire des individus (herbivores, insectivores, vers de terre, Mascanzoni *et al.*, 1990 ; Talmage & Walton, 1991 ; Van Brummelen *et al.*, 1996). La présence du plomb dans l'organisme peut aussi être mise en évidence par des indicateurs biochimiques, en raison de ses capacités d'inhibition de la biosynthèse de l'hème (Simmonds *et al.*, 1995).

La nature des polluants à rechercher n'étant pas toujours connue, la recherche de marqueurs biologiques d'exposition spécifiques d'une classe de polluants montre là son intérêt. Ces biomarqueurs présentent l'avantage de tenir compte de la sensibilité de l'individu et des interactions entre les différents polluants. L'induction des cytochromes P-450 est actuellement un des biomarqueurs d'exposition les plus fréquemment utilisés en toxicologie expérimentale ; il est sensible et spécifique de certaines classes de polluants organiques. Plusieurs activités enzymatiques permettent de suivre l'induction en utilisant des substrats modèles, spécifiques des différentes isoformes de cytochrome P-450 inductibles par les polluants environnementaux (CYP1A, CYP2B essentiellement). Par exemple, la mesure de l'activité EROD hépatique (spécifique du CYP1A1) chez les poissons préconisée par Payne (Payne, 1984 ; Payne *et al.*, 1987) pour le suivi biologique des milieux aquatiques est maintenant systématiquement utilisée dans la surveillance du milieu aquatique comme indicateur de la qualité de l'eau. Les activités enzymatiques du système de détoxification sont également applicables aux oiseaux (Sanderson *et al.*, 1994) et aux mammifères (Rattner *et al.*, 1989) mais le caractère invasif nécessaire à la mesure de ces activités explique que cet excellent biomarqueur ne soit pas couramment utilisé chez l'homme. La mesure de la durée de sommeil provoqué par un traitement au phénobarbital peut-être une façon indirecte de mesure des activités des CYP2B (Halbrook *et al.*, 1993).

L'exposition de petits mammifères à des polluants inducteurs de CYP1A (dioxines, HAP, PCB) présents dans le sol a été mise en évidence par l'induction des activités EROD et AHH hépatiques mesurées sur ces animaux capturés *in situ* (Schrenk *et al.*, 1991 ; Lubet *et al.*, 1992 ; Fouchécourt & Rivière, 1995). Une exposition à des polluants type PCB (inducteur mixte de CYP1A et CYP2B) peut être mise en évidence par la réponse de ces deux marqueurs et/ou par l'augmentation de l'activité pentoxyrésorufine *O*-dépendylase (PROD) ou de l'activité benzoxyrésorufine *O*-débenzylase (BROD), spécifiques de la forme 2B (Lubet *et al.*, 1985 et 1990 ; Simmons & McKee, 1992 ; Nerurkar *et al.*, 1993). Ces biomarqueurs sont suffisamment sensibles pour répondre à des expositions à des doses environnementales, c'est-à-dire beaucoup moins élevées que celles utilisées dans les études de toxicologie expérimentale. En complément à ces activités, certains auteurs préconisent le dosage du cytochromes P-450 total dans les microsomes hépatiques (Hänninen *et al.*, 1985) mais on

observe rarement des modifications significatives lors d'expositions environnementales (Elangbam *et al.*, 1991a et b ; Fouchécourt & Rivière, 1995).

Au niveau des activités enzymatiques, l'induction des CYP1A et/ou de l'époxyde hydrolase pourrait être considérée comme un biomarqueur d'effets, puisqu'elle est corrélée à la formation de métabolites réactifs souvent précurseurs de cancer et à des modulations de la défense immunitaire (Silkworth *et al.*, 1984 ; Kizer *et al.*, 1985 ; Vecchi *et al.*, 1986 ; Davis & Safe, 1990 ; Kerkvliet *et al.*, 1990 ; Hardin *et al.*, 1992). Seules des études expérimentales en laboratoire ont pu mettre en évidence l'action significative de polluants environnementaux tels que dioxines, paraquat, organochlorés ou métaux sur l'activité des enzymes de défense contre le stress oxydant (Nicotera *et al.*, 1985 ; Vincent *et al.*, 1989 ; Stohs, 1990 ; Bagchi & Stohs, 1993).

III.2.3.2. Biomarqueurs d'effets

L'étude des impacts d'une contamination peut se faire à plusieurs niveaux. L'étude écologique des populations n'apporte pas suffisamment d'informations pour être utilisée seule, tout au moins chez les petits mammifères (Flickinger & Nichols, 1990 ; Talmage & Walton, 1991) mais la recherche de biomarqueurs d'effets toxiques, associée ou non à une étude démographique, est souvent très intéressante.

Les variations physiomorphologiques figurent parmi les effets les moins spécifiques : la taille, le poids et l'histologie des organes de petits mammifères peuvent servir d'indicateurs (Rowley *et al.*, 1983 ; Batty *et al.*, 1990 ; Halbhook *et al.*, 1993) mais ceci est contesté par d'autres auteurs (Flickinger & Nichols, 1990 ; Rattner *et al.*, 1993) qui estiment les résultats très dépendants du mode d'échantillonnage, des variations climatiques, de l'espèce ou du type de site étudié. Elangbam *et al.* (1991a) ont mis en évidence l'intérêt de paramètres tels que l'ultrastructure, le poids et le volume du foie et les activités enzymatiques. Des troubles du comportement peuvent aussi être utilisés comme biomarqueurs, mais cela nécessite une étude de terrain assez lourde. Les effets sur la reproduction et la mortalité sont des points finaux surtout utilisés pour les populations d'oiseaux (revue par Kendall *et al.*, 1990).

L'altération de l'ADN par attaque de ses centres nucléophiles par des éléments électrophiles (issus de la métabolisation par le CYP1A1 ou espèces oxygénées réactives) peut conduire à la genèse d'effets génotoxiques au niveau de l'ADN, des gènes ou des chromosomes. Les adduits sont des altérations réversibles (c'est un biomarqueur intermédiaire d'exposition et d'effets), mais la cassure d'un brin d'ADN, les altérations géniques et chromosomiques sont irréversibles. De nombreux polluants environnementaux peuvent être à l'origine de tels effets, comme l'ont montré plusieurs équipes lors d'études *in situ* (Nayak et Petras, 1985 ; McBee *et al.*, 1987 ; McBee & Bickham, 1988 ; Thompson *et al.*, 1988 ; McBee, 1991 ; Shaw *et al.*, 1995). La recherche des adduits à l'ADN par post-marquage au ³²P, la mesure du contenu cellulaire en ADN ou les altérations chromosomiques telles que les

échanges de chromatides soeurs sont des paramètres utilisés en toxicologie environnementale, utilisables sur l'homme (sur des lymphocytes par exemple ; Schoket *et al.*, 1988 ; Perera, 1993), mais la détection d'adduits à l'ADN pulmonaire serait un biomarqueur plus sensible que les échanges de chromatides soeurs ou la recherche de micronoyaux (Whong *et al.*, 1994). Les malformations congénitales sont également des biomarqueurs de génotoxicité (Geschwind *et al.*, 1992). Une étude menée par Shaw-Allen & McBee (1993) précise que les études génotoxiques *in situ* donnent des résultats comparables aux études effectuées en laboratoire.

Expérimentalement, les HAP et les HAPH sont immunotoxiques : immunosuppression, immunoactivation, allergie, auto-immunité, altération de la résistance de l'hôte sont des effets potentiellement induits par les polluants environnementaux. Les effets immunotoxiques sont donc préconisés comme biomarqueur d'exposition ou d'effets pour les contaminations aux métaux ou aux composés organiques (HAP, PCB, TCDD, organochlorés, organophosphorés, carbamates..., Shugart *et al.*, 1989 ; Smialowicz *et al.*, 1989 ; Sullivan, 1989 ; Kimber, 1991) mais il n'y a pas encore eu, à notre connaissance, d'études immunotoxicologiques menées *in situ* en milieu terrestre. Les tests nécessitant une immunisation seraient difficiles à réaliser, d'autant plus que les polluants sont susceptibles d'être métabolisés entre le moment de la capture et la mesure d'effets immunotoxiques, mais les autres tests devraient être applicables aux animaux sauvages (McMurry *et al.*, 1991). Aussi, les résultats risquent d'être difficilement interprétables du fait de la variabilité individuelle souvent importante dans les populations sauvages.

La diversité des travaux cités montre l'étendue des méthodes qui peuvent être utilisées. Hormis le choix de l'animal, il faudra déterminer quel type de biomarqueur il convient de rechercher en fonction de la pollution à étudier et des moyens engagés.

III.3. Intérêt des bioessais dans l'étude de sites pollués : méthodologies et orientations actuelles

L'évaluation du risque d'un site pollué peut être effectuée de deux manières : soit à partir des analyses chimiques associées au résultat d'essais d'écotoxicité normalisés pour chaque contaminant identifié, soit à partir de bioessais effectués sur des lixiviats ou des extraits aqueux ou organiques du sol, ou sur le sol lui-même. Dans le meilleur des cas, l'analyse chimique sera associée à une approche écotoxicologique. Ces deux méthodologies sont complémentaires : l'analyse chimique caractérise la nature et le niveau de pollution d'un sol, les bioessais informent sur la présence de substances toxiques biodisponibles pour l'organisme testé et ils ont en commun la phase d'échantillonnage, le transport, le stockage et la préparation de l'échantillon.

L'échantillonnage doit être effectué par un personnel qualifié, dans des conditions de sécurité adaptées et selon des protocoles établis (Anonyme, 1995).

- les échantillons doivent être représentatifs de l'ensemble du site. La stratégie d'échantillonnage dépend du sol et doit être choisie au cas par cas selon la nature du site (sols excavés, sols agricoles et sites urbains contaminés) ; les stratégies seront différentes selon que la contamination sera homogène ou hétérogène en surface ou en profondeur... Le prélèvement des échantillons peut être effectué par différentes techniques (carottage, fosse),

- les échantillons ne doivent pas subir de dégradation entre le moment de leur prélèvement et la réalisation des tests ou des analyses,

- les végétaux, les animaux de grosse taille, les racines et les pierres sont éliminés avant d'effectuer un tamisage (5 mm généralement). Le délai de réalisation des bioessais varie selon le bioessai, mais ne doit pas dépasser trois mois.

III.3.1. Intérêt des bioessais dans l'évaluation du danger et du risque d'un sol pollué

Il n'est pas nécessaire de mettre en oeuvre des bioessais pour l'étude de tous les sites ou sols pollués. La DECHEMA (Deutsche Gesellschaft für Chemisches Apparatewesen, société allemande pour les appareillages chimiques, la technique chimique et la biotechnologie) les préconise dans un certain nombre de cas (Anonyme, 1995) :

- nécessité d'informations écotoxicologiques pour évaluer le risque d'un sol contaminé,
- évaluation de l'extractibilité de contaminants ayant un effet biologique, lorsque la contamination peut affecter la nappe phréatique,
- évaluation d'un sol ou d'une surface occupée faiblement contaminée, qui peut rester sans traitement,
- évaluation écotoxicologique de sols destinés à un usage agricole ou horticole,
- mise en évidence des substances biologiquement actives qui ne sont pas détectées ou caractérisées par l'analyse chimique,
- contrôle de l'efficacité d'un traitement biologique de dépollution,
- contrôle de la qualité des sols traités "on site" ou "off site" qui doivent être remis à la surface du site. Dans ce cas, l'utilisation future du site conditionne les tests à effectuer : si les critères chimiques permettent l'utilisation du site sans restriction, des essais d'écotoxicité doivent confirmer que le sol est de suffisamment bonne qualité ; si le sol traité doit être limité au niveau de ses usages (contamination résiduelle sans danger pour l'homme) les bioessais ne seront nécessaires que si la couche de sol déposée en surface dépasse une profondeur de 1 mètre (risque potentiel pour la nappe phréatique).

Le choix des bioessais est dicté par l'utilisation actuelle et future du sol et les éléments à protéger :

- les sols situés sous une zone recouverte ne nécessitent pas d'investigation écotoxicologique si le contact avec la nappe phréatique est exclu,

- les sols situés sous une zone non couverte, à usage commercial ou industriel, ne doivent pas contenir de contaminants mobilisables par voie aqueuse (bioessai basé sur des extraits aqueux du sol),

- les sols utilisés pour recouvrir les décharges étant soumis à des lixiviations ou des ruissellements, l'étude de leurs extraits doit être effectuée. Les tests qualitatifs sont suffisants (croissance des plantes, par exemple),

- pour les espaces verts, les parcs et les aires de loisirs, les extraits de sol doivent être testés. Des investigations supplémentaires concernant le rôle du sol comme habitat doivent être menées. Dans les forêts, on s'intéressera aussi à la production de biomasse et pour les aires de loisirs, la potentialité toxique pour l'homme sera évaluée.

- en plus des tests déjà cités, les sols agricoles ou horticoles doivent être fertiles. L'évaluation de l'activité biologique et des effets dangereux pour les organismes du sol est nécessaire ; en cas de contamination ou de présence de métabolites biocumulatifs, la fixation dans le sol de contaminants toxiques pour l'homme dans la biomasse devra être évaluée.

L'évaluation du risque à partir des seules analyses et données toxicologiques présente de nombreux inconvénients liés à l'analyse elle-même :

- les sites à pollutions multiples renferment plusieurs centaines, voire plusieurs milliers de composés différents,

- ces composés ne sont pas toujours identifiables (pas d'étalon),

- les limites de détection ne correspondent pas aux seuils biologiques d'effets toxiques (par exemple, non détection de composés présents à l'état de traces ayant une activité mutagène en bioessai),

- la complexité du mélange peut empêcher la détection de certaines substances,

- les extractions mobilisent la quasi-totalité des composés présents dans l'échantillon, sans tenir compte de leur biodisponibilité réelle.

L'exploitation de données toxicologiques pose aussi de nombreux problèmes :

- les données toxicologiques sont des DL_{50} , des NOEL,... obtenues à partir de produits chimiques purs dans des conditions souvent peu réalistes (une seule voie d'exposition, pas d'interactions avec d'autres paramètres...),

- ces données doivent être extrapolées pour caractériser la toxicité correspondant à la concentration de la substance mesurée dans l'échantillon, ce qui nécessite la connaissance de la relation dose-toxicité et pas seulement d'une valeur unique,

- les interactions entre polluants et la biodisponibilité des polluants pour l'organisme ne sont pas prises en compte.

Lors d'une évaluation basée sur des essais écotoxicologiques, on pallie un certain nombre des inconvénients cités : les effets toxiques observés sont provoqués par les contaminants biodisponibles présents à des doses environnementales et tiennent compte des possibles interactions. Cependant, ces avantages ne sont réels que sous certaines conditions. Ainsi, l'utilisation d'extraits de sol peut être responsable de la perte de polluants, ou au contraire, de la libération de polluants qui ne seraient pas biodisponibles sans extraction ; la filtration des échantillons (lixiviats, effluents) recommandée par les normes n'est pas techniquement nécessaire et risque d'éliminer des substances toxiques. L'évaluation du risque de sols pollués (ou de déchets) par l'utilisation de bioessais serait fortement améliorée par l'adaptation des tests existants et la mise en oeuvre de nouveaux tests pour lesquels les échantillons subirait le moins de transformations possibles afin de simuler au mieux les interactions sol-organismes qui se produisent en conditions réelles.

III.3.2. Exemples de bioessais

Les essais d'écotoxicité sont des tests *in vitro* (cultures cellulaires) ou *in vivo*, mettant en oeuvre des micro-organismes, des plantes, des algues, des invertébrés, des crustacés ou des poissons. Si l'échantillon est liquide, il est directement placé dans le milieu (eau, sol, milieu de culture) mais les bioessais en milieu liquide appliqués à un échantillon solide (déchet, sol) nécessitent l'emploi de techniques d'extraction aqueuse ou organique. Quelques équipes américaines ont réalisé avec succès des tests de génotoxicité à partir d'échantillons bruts (revue par Houk, 1992) mais tous les déchets bruts ne peuvent pas être directement utilisés dans les bioessais, soit parce qu'ils sont trop toxiques, soit parce que leur structure ne le permet pas (émulsions, huiles, boues...). En France, un programme de recherches concertées concernant l'écotoxicité des sols et des déchets a débuté en 1995 (Savanne, 1995) : l'objectif est de mettre au point des bioessais modifiant l'échantillon le moins possible (extraction, filtration...), soit en adaptant des tests déjà existants (Ames, micronoyau, ver de terre, collembolles), soit en mettant au point de nouveaux tests (phytogénotoxicité (adduits à l'ADN), phytotoxicité suivie par des biomarqueurs biochimique, toxicité des métaux chez les escargots, mesure de différents biomarqueurs d'exposition chez des rongeurs exposés aux sols...). L'intérêt est d'obtenir une évaluation globale de la biodisponibilité et de la toxicité des polluants en tenant compte des interactions entre tous les produits toxiques présents et entre ces produits et leur environnement (le sol par exemple). Des expérimentations de ce type sont courantes en ce qui concerne les effluents, mais commencent seulement à se développer pour les sols et les déchets solides (boues, cendres).

Nous ne citerons ici que quelques tests, notamment ceux qui sont préconisés par la DECHEMA pour l'évaluation de la toxicité des sols (Anonyme, 1995).

III.3.2.1. Toxicité des extraits aqueux

Ces essais sont effectués dans le but de déterminer la toxicité des fractions du sol mobilisables par la voie aqueuse. Les contaminants du sol sont rendus en plus en plus hydrophiles par diverses biotransformations ; la biodisponibilité des composés hydrosolubles est très supérieure à celle des molécules adsorbées sur ou liées au sol et ils sont potentiellement toxiques pour les plantes et la faune du sol.

A priori, tout test applicable à des fractions hydrosolubles peut être applicable à des fractions aqueuses de sol. Trois tests normalisés ont été retenus par la DEHEMA : le test bactérien d'inhibition de luminescence de *Phosphobacterium phosphoreum* parfois associé à l'inhibition de leur croissance, le test d'inhibition de croissance de l'algue *Scenedesmus subspicatus*, et le test d'immobilisation des daphnies (*Daphnia magna*).

III.3.2.2. Tests sur plantes

Les racines de plantes représentent, après les micro-organismes, la plus grande surface biologique en contact avec le sol. Les tests sur plantes permettent d'évaluer la biodisponibilité et les effets phytotoxiques des polluants présents dans le sol en mesurant le changement de biomasse de la plante. Ils ne renseignent pas sur la bioaccumulation des polluants dans les plantes, leur métabolisation ou les effets sur les herbivores et ne sont pas destinés à évaluer la fertilité d'un sol.

Le choix du sol témoin doit tenir compte des caractéristiques du sol à tester, la compacité et le volume des pores déterminant le contact entre la plante et le sol. Différentes variétés de plantes peuvent être retenues, comme le haricot (*Phaseolus aureus*), l'avoine (*Avena sativa*), le cresson (*Lepidium sativum*) ou le navet (*Brassica rapa*). Le test normalisé ISO/DIS 11269 est adapté en utilisant directement le sol à tester, sans dilution, avec un éventuel apport nutritif. Wang & Freemark (1995) ont dressé une revue assez complète des tests plantes et algues.

III.3.2.3. Tests sur espèces animales et peuplements

Ces tests sont réalisés sur des organismes normalement présents dans le sol, comme les bactéries ou les vers de terre. La microflore qui constitue 80% de la biomasse totale du sol et la faune du sol sont responsables de la dégradation des substances organiques complexes. La faune a des fonctions écologiques variées et joue un rôle important dans les chaînes trophiques.

Les tests bactériens consistent à déterminer la densité de population bactérienne présente dans le sol soit directement, soit par la mesure de l'activité respiratoire (avec un apport de glucose) ou l'activité de nitrification (apport d'ammonium). Le test de mortalité des

vers de terre *Eisenia* sp. est le plus connu des tests effectués sur la faune du sol ; il est directement utilisable avec le sol pollué (Belfroid *et al.*, 1995).

III.3.2.4. Tests de génotoxicité

Durant les 25 dernières années, plus de 200 tests à court terme ont été développés afin d'aider à l'identification d'agents responsables de troubles génotoxiques chez l'homme (revue par Houk, 1992). Ces bioessais qui utilisent des micro-organismes, des plantes, des insectes ou des cellules animales en culture, peuvent être divisés en deux grandes catégories : les bioessais sur procaryotes, détectant des agents mutagènes et des lésions primaires de l'ADN et les bioessais sur eucaryotes, à spectre plus large (mutations, altération et réparation de l'ADN, altération chromosomique et aneuploïdie). Ces bioessais présentent l'avantage d'être rapides (comparés à des études de cancérogenèse à long terme chez les rongeurs), peu coûteux, simples, sensibles et relativement réalistes étant donné l'universalité de l'ADN. Nous nous contenterons ici de citer les tests les plus couramment utilisés en toxicologie environnementale.

Le plus connu est le test d'Ames, qui consiste à mesurer le nombre de *Salmonella typhimurium* révertantes (à nouveau capables de biosynthétiser l'histidine) à la suite d'une exposition au toxique. Différentes souches mutantes ont été mises au point qui permettent de caractériser le type de mutation nécessaire pour que les bactéries réversent (décalage du cadre de lecture, substitution...). Les procaryotes n'étant pas munis des enzymes métaboliques des eucaryotes, des ajouts de fraction S9 provenant de foie de rongeur (prétraité par un inducteur) pallient ce manque et permettent de simuler les transformations métaboliques catalysées par les monooxygénases à cytochrome P-450 se produisant chez les mammifères. Des bactéries luminescentes peuvent également être utilisées (*Vibrio fischeri*, test Mutatox[®]).

Les effets clastogéniques ou aneuploïdes d'un toxique peuvent être détectés par la mise en évidence de micronoyaux, d'aberrations chromosomiques (translocations, délétions importantes ...) ou d'échange de chromatides soeurs (échange d'ADN à des loci homologues). Ces effets sont le plus souvent mis en évidence *in vitro* sur des cellules en culture ou *in vivo* sur des amphibiens ou des plantes.

Pour les tests *in vivo*, l'effluent ou l'extrait est administré à l'animal et ses tissus ou ses fluides biologiques sont récupérés. La génotoxicité du produit est mise en évidence à l'aide de biomarqueurs, comme les adduits à l'ADN, la détection de micronoyaux ou des métabolites urinaires. Ces techniques sont plus coûteuses et plus laborieuses que les bioessais *in vitro*. Sur le terrain, les effets *in vivo* peuvent être utilisés comme biomarqueurs d'exposition à des polluants génotoxiques chez l'homme ou d'autres mammifères (bovins ; Parada & Jaszczak, 1993). Harper *et al.* (1989) ont développé une combinaison de tests applicables sur un même individu exposé à des gaz par inhalation. Ces tests concernent plusieurs organes (foie, poumon, rate, moelle, testicules), le sang et l'urine, ce qui permet d'avoir une vision

d'ensemble des altérations génotoxiques dues aux polluants (test d'Ames sur les urines, aberrations chromosomiques sur les cellules de la rate, de la moelle et les lymphocytes, micronoyau sur les cellules de la moelle et les érythrocytes sanguins...).

III.3.2.5. Evaluation de l'efficacité des traitements de remédiation

Le processus de décontamination d'un sol est souvent suivi par le test Microtox et l'utilisation future du sol est déterminée en fonction des résultats des bioessais, qui doivent concorder avec les résultats analytiques. Cependant, le fait de se baser uniquement sur un test bactérien ne donne pas toujours une réponse pertinente quant à la toxicité du sol pour les mammifères. En effet, les bactéries ne sont sensibles et ne métabolisent que les HAP de petite taille (inférieure ou égale à quatre cycles benzéniques) alors que les mammifères sont essentiellement sensibles aux HAP comportant au moins cinq cycles (Roos *et al.*, 1996).

IV. CONCLUSION

Les polluants organiques majeurs sont ubiquistes et persistants dans l'environnement ; les métaux sont surtout présents dans les zones industrielles, mais leur dispersion est accrue par l'épandage de boues de STEP, le trafic routier et le transport atmosphérique. Les polluants sont suffisamment biodisponibles pour contaminer végétaux et animaux et leurs caractéristiques physico-chimiques conduisent à leur bioaccumulation dans les organismes et à leur biomagnification dans la chaîne alimentaire. L'homme, dernier maillon de la chaîne, est donc particulièrement exposé.

Plusieurs processus physiologiques liés à la métabolisation des polluants ou à leurs effets biologiques peuvent être utilisés comme biomarqueurs d'exposition (activités cytochromes P-450 dépendantes par exemple) ou comme biomarqueurs d'effets (altérations génotoxiques par exemple). La mesure de tels biomarqueurs chez des animaux sauvages permet de mettre en évidence l'existence d'une pollution de leur habitat et des bioessais basés sur ce concept peuvent être développés.

ETUDE EXPÉRIMENTALE

ETUDE *IN SITU* :
Capture de surmulots
sur le site

ETUDE EN LABORATOIRE :
Exposition de rats
à des prélèvements de sol

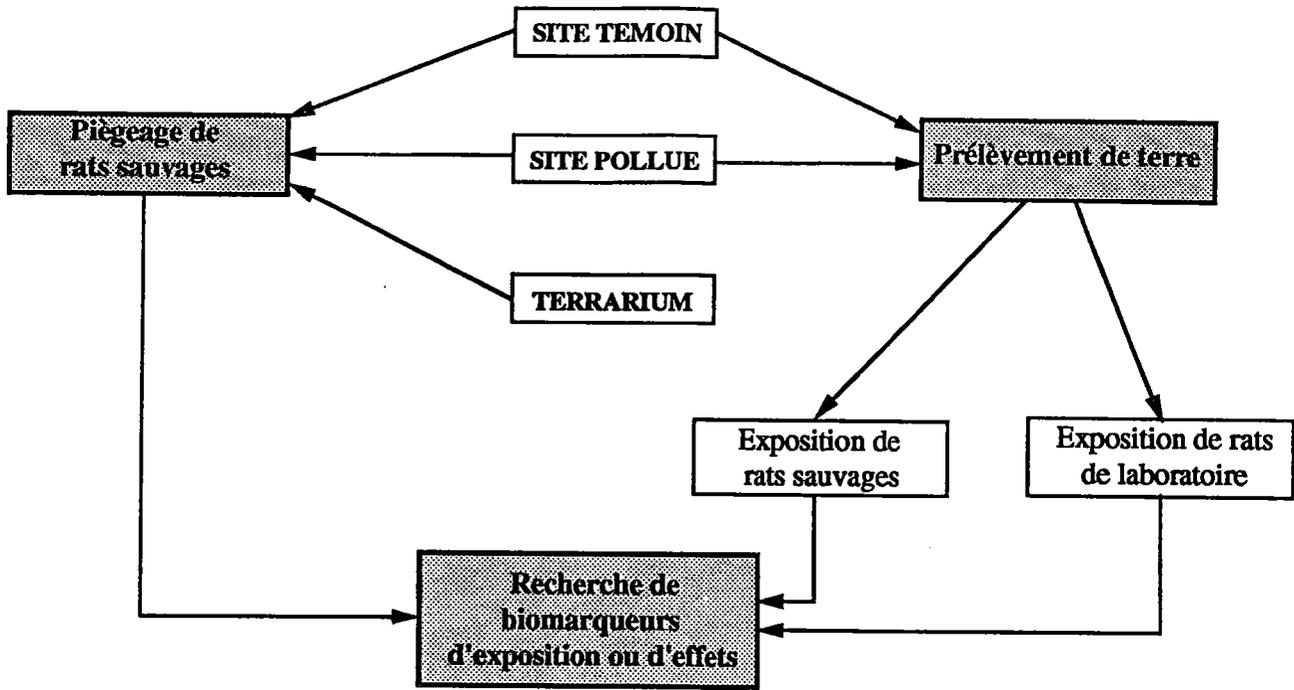


Figure 34 : Stratégie d'étude du site pollué de Replonges

INTRODUCTION

Dans un premier temps, ce travail a porté sur l'étude du site pollué de Replonges, contaminé par des HAP, des PCB et des métaux. Deux approches ont été utilisées (figure 34) :

- la capture de surmulots *in situ*
- le prélèvement d'échantillons de sol sur lesquels des surmulots et des rats de laboratoire ont été exposés.

La première approche — déjà décrite dans la littérature — présente plusieurs inconvénients, notamment l'absence de contrôle de nombreux paramètres liés à l'exposition. La deuxième approche, consiste à mettre des rats sauvages ou des rats de laboratoire en contact direct avec le sol et à les alimenter normalement. Dans ces conditions, les polluants pénètrent par la voie cutanée, la voie pulmonaire et la voie intestinale. Le protocole a été d'abord mis au point avec le sol contaminé prélevé sur le site de Replonges (Repl.III) pour établir la durée d'exposition nécessaire à une réponse optimale des activités cytochrome P-450 dépendantes dans le foie et le poumon. Cette méthodologie permet aussi de pratiquer des dilutions des sols pollués et d'établir une relation dose-réponse des biomarqueurs.

Dans un deuxième temps, d'autres échantillons de sols contaminés ont été testés. Il s'agit d'échantillons utilisés par les différents laboratoires travaillant sur le programme Ademe de recherches concertées sur l'écotoxicité des sols et des déchets. Nous avons testé six sols différents, en y exposant des rats de laboratoire dans les conditions précédentes :

- le sol S0, non contaminé,
- quatre sols artificiellement contaminés à partir du sol S0 :
 - SI, contaminé par des métaux,
 - SII, contaminé par du phénanthrène et des chlorophénols,
 - SII', contaminé par du B(a)P,
 - SII'', contaminé par du phénanthrène,
- les sols SIII et SIV prélevés sur des sites pollués essentiellement contaminés par des PCB et des métaux (SIII) ou des HAP et des métaux (SIV).

La biodisponibilité et les effets des polluants ont été mis en évidence par la mesure de différents biomarqueurs :

- les activités EROD, PROD, BROD et 4-nitrophénol hydroxylase¹⁴ sur les fractions microsomaux hépatiques et pulmonaires de tous les rats,

¹⁴ Cette activité n'a été mesurée que sur les surmulots capturés sur le site et sur quelques rats exposés au sol Repl.III

- l'activité des enzymes antioxydantes (catalase, superoxyde dismutase et glutathion peroxydases) uniquement sur les rats exposés au sol Repl.III (dans les fractions cytosoliques de foie et de poumon et les hémolysats),

- les doses internes de PCB sur les homogénats de foie et de poumon de rats exposés au sol SIII,

- les doses internes de métaux (plomb, cadmium, zinc) sur des homogénats de foie de rats exposés aux sol SI, SIII et SIV,

- la recherche d'adduits à l'ADN sur des homogénats de foie et de poumon de rats exposés aux sols Repl.III et SIV,

- enfin, nous avons essayé d'adapter notre protocole d'exposition au laboratoire pour réaliser la mesure de biomarqueurs d'immunotoxicité.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. CARACTÉRISTIQUES DU SITE ET DES SOLS ÉTUDIÉS

I.1. Le site pollué de Replonges

L'ancien dépotoir à vidanges situé au lieu-dit "Les Fougères" sur la commune de Replonges (Ain) est un site contaminé orphelin. Ce site fait partie des 669 sites pollués recensés en 1994 par le Ministère de l'Environnement. La réhabilitation de ce site est prise en charge par l'ADEME depuis le 5 juillet 1993, suite à un arrêté préfectoral. Les renseignements suivants nous ont été aimablement fournis par l'ADEME Rhône-Alpes (BURGEAP, 1993).

I.1.1. Historique

Le 19 mai 1937, un arrêté préfectoral autorise l'utilisation du site comme dépotoir à vidanges. L'exploitation est utilisée comme dépôt de déchets organiques jusqu'à une date indéterminée, antérieure à 1954. A partir de cette date, des produits hydrocarburés (vidanges de fonds de cuves, vieilles huiles minérales) et des fûts contenant des résidus de peinture et de fuel sont déversés sans autorisation dans une vaste dépression de 1.000 m² profonde de 5 à 6 mètres et formant une flaque. Ces dépôts sont effectués jusqu'en 1977 mais l'activité la plus intense se situe entre 1960 et 1970. En 1978, la dépression est remblayée comme le demandait l'administration puis le terrain n'aurait servi qu'à quelques dépôts clandestins. La pollution serait de l'ordre de 10.000 m³ de produits.

I.1.2. Géographie et géologie du site

Cet ancien dépotoir est situé dans une zone inondable de la plaine alluviale de la Saône. La géologie locale peut se résumer par la présence d'une couche d'argiles plastiques et de sables argileux d'épaisseur variable (2 à 5 m) qui reposent sur des alluvions grossières sablo-argileuses (rôle d'aquifère). Les eaux souterraines de la nappe alluviale sont utilisées pour l'alimentation en eau potable et les activités agricoles et industrielles. Situé à l'extrémité de la zone artisanale de Replonges, le site est contigu à une friche, une décharge municipale et un dépôt de ferrailles (potentiellement polluants).

I.1.3. Analyses de terrain

La recherche d'anomalies de conductivité et l'analyse d'échantillons de sol et d'eau prélevés à différentes profondeurs (sondages de 5 à 6 m, fosses de 2,6 à 4,5 m, ou piézomètres de 6 à 10



Photo 1 : Vue de la zone III du site de Replonges. La zone II est située sur la gauche.

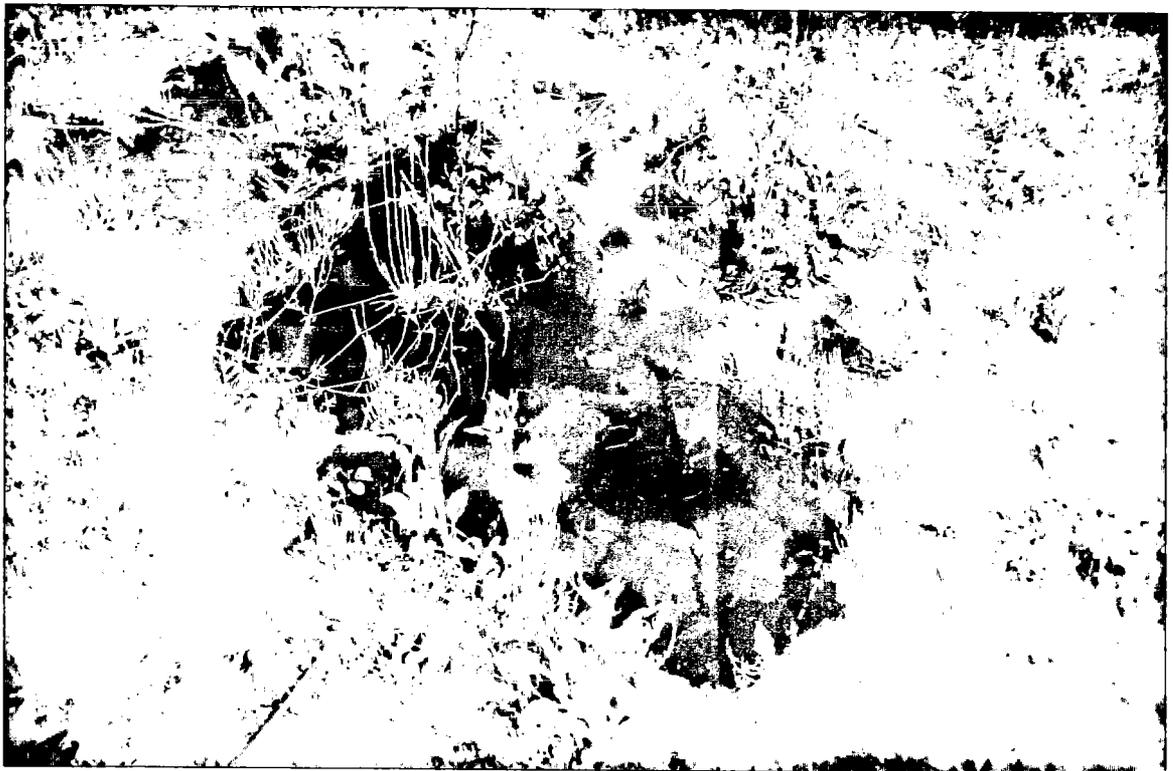


Photo 2 : Remontée d'hydrocarbures en surface dans la zone II du site de Replonges.

m) ont permis de déterminer trois zones de degrés de pollution différents. Quelques uns de ces résultats, extraits du rapport BURGEAP (1993), sont résumés ici ou présentés en Annexe II.

La pollution de ce site est complexe : d'un point de vue qualitatif, de nombreux composés organiques ont été détectés ; d'un point de vue quantitatif, trois zones de niveau de pollution différent ont été déterminées (Annexe II). La *zone I*, faiblement polluée, montre des concentrations en HAP, hydrocarbures légers et hydrocarbures lourds très inférieures au seuil C de la norme hollandaise¹⁵ ; la *zone II* dépasse le seuil C pour les hydrocarbures lourds et légers (Anomalie 10), mais les HAP ne sont présents qu'en très faible quantité (< 25 µg/kg). Par contre, la *zone III* est riche en HAP (teneurs supérieures à la norme C, anomalie de conductivité du sous-sol n°19) et accuse des teneurs en hydrocarbures lourds et légers (benzène) supérieures à la norme. Comme dans les autres zones, aucun PCB n'a été détecté (résultats des analyses de terrain en Annexe II d). Les photos 1 et 2 montrent une vue globale de la zone III et une des nombreuses remontées d'hydrocarbures que l'on observe essentiellement dans la zone II.

La pollution a peu migré en profondeur (teneurs assez faibles en équivalents huile et très faibles en HAP, à plus de 3,5 m de profondeur). La pollution de la nappe sous le site est limitée à des produits dissous (hydrocarbures légers et phénols) ; la norme C pour les hydrocarbures légers est dépassée, mais il n'y a pas eu de migration massive de polluants. Aucun indice de pollution n'a été mis en évidence dans les prélèvements d'eau effectués en périphérie du site.

I.1.4. Prélèvements d'échantillons de sol pour les bioessais

Des prélèvements ont été effectués par nos soins en juin 1994 sur le site de Replonges dans la zone III, fortement polluée ("sol Repl.III") et à proximité du site, dans une zone dite témoin ("sol témoin" de mêmes caractéristiques géologiques, exempt de pollution massive aux hydrocarbures et de traitements phytosanitaires). Pour cela, une dizaine de litres de terre ont été prélevés "manuellement" sur dix emplacements faisant partie de chaque zone, à une profondeur de 10 à 50 cm, puis les échantillons ont été triés afin d'éliminer les pierres et autres gros déchets, les mottes de terre ont été fragmentées et la terre séchée à l'air libre durant une semaine. Après tamisage (1 cm) et homogénéisation de chaque lot, les échantillons ont été congelés par aliquots, à -20°C.

I.1.5. Analyse des échantillons prélevés

Les teneurs en polluants mesurées dans les échantillons sol témoin et sol Repl.III par le Laboratoire Départemental d'Analyses de la Drôme (Valence) sont présentées dans le tableau 10 en parallèle avec les valeurs du seuil C de la norme hollandaise et les teneurs mesurées sur un échantillon prélevé dans la zone III, à 3 m de profondeur (anomalie 19).

¹⁵ Seuil au delà duquel des mesures de décontamination doivent être prises

Tableau 10 : Récapitulatif des analyses en polluants de trois échantillons de sol prélevés à Replonges (Témoin et Repl.III en surface ; anomalie 19 à 3 m de profondeur)

Echantillons	Sol Témoin	Sol Repl.III	Seuil de détection	Seuil C (norme NL)	Anomalie 19 (zone II)
Hydrocarbures aromatiques	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
Benzène	< 30	2 400 <i>c</i>	30	1 000	1 001 <i>c</i>
Toluène	< 30	750	30	130 000	530
Xylène	80	200	30	25 000	460
Ethylbenzène	< 30	200	30	50 000	270
Triméthylbenzènes	< seuil	< seuil	100		>100
Dichlorobenzènes	< seuil	< seuil	100	30 000 <i>b</i>	ND
Aliphatiques légers	< seuil	< seuil	1 000		9 350
Hydrocarbures aromatiques polycycliques	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
Acénaphthène	10	186	5		ND
Anthracène	10	723	5		162 000 <i>c</i>
Chrysène	530	22 704	5		ND
Fluoranthène	740	12 631	5		<100
Benzo(b + k)fluoranthène	400	16 794	5		ND
Pyrène	390	13 152	5		<100
Benzo(a)pyrène	< seuil	4 412	5		ND
Indéno(1,2,3,c,d)pyrène	130	5 483	5		ND
Benzo(g,h,i)perylène	50	4 853	5		ND
Naphtalène	10	300	5		57 000 <i>c</i>
Diméthylnaphtalène	ND	ND	5		85 000 <i>c</i>
Phenanthrène	50	8 611	5		ND
Perylène	< seuil	2 438	5		ND
Fluorène	30	398	5		ND
Total	2 500	88 681 <i>c</i>		< 40 000	304 000 <i>c</i>
Hydrocarbures lourds	mg/kg	mg/kg		mg/kg	mg/kg
Équivalents huiles minérales	47,9	7 959 <i>c</i>	0,500	5 000	1 850
Équivalents gas-oil	< seuil	< seuil	0,200	800	2 810 <i>c</i>
Organo halogénés volatils	< seuil	< seuil			< seuil
Polychlorobiphényles (PCB)	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	
#28 (triCB) <i>a</i>	< seuil	< seuil	0,5		ND
#52 (tétraCB) <i>a</i>	0,7	8,0	0,5		ND
#101 (pentaCB) <i>a</i>	1,3	31,0	0,5		ND
#118 (pentaCB) <i>a</i>	1,4	12,0	0,5		ND
#138 (hexaCB) <i>a</i>	1,6	45,0	0,5		ND
#153 (hexaCB) <i>a</i>	1,1	39,0	0,5		ND
#180 (heptaCB) <i>a</i>	0,6	45,0	0,5		ND
#209 (decaCB)	< seuil	4,0	0,5		ND
Total (équivalent Aroclor 1254)	62	1 450		1 000 <i>a</i>	ND
Métaux	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Zinc	72	843 <i>c</i>	0,05	720	233
Cuivre	16,5	4 830 <i>c</i>	0,05	190	28,5
Plomb	49,6	421 <i>c</i>	0,05	210	13,6

ND : non déterminé

a : somme des 7 PCB signalés par *a*

b : somme des chlorobenzènes

c : teneur supérieure à la norme C hollandaise

Cette anomalie a été choisie car elle est située en plein coeur de la zone III, où nous avons effectué nos prélèvements (Annexe IIa).

Le sol témoin est légèrement contaminé par des HAP (2,5 ppm), les autres polluants sont présents à des teneurs faibles. Le sol Repl.III est fortement contaminé par des HAP (88 ppm), des PCB (1,4 ppm), du benzène (2,4 ppm) et des métaux ; ces polluants sont présents à des teneurs supérieures à la norme C hollandaise. Les teneurs en HAP (304 ppm) mesurées dans l'échantillon "anomalie 19" sont supérieures à celles mesurées dans le sol Repl.III.

I.2. Les sols fournis par l'IRH

Dans le cadre du programme de recherches concertées de l'ADEME sur l'écotoxicité des sols et des déchets, l'Institut de Recherches Hydrologiques (IRH, Vandoeuvre-lès-Nancy) nous a fourni différentes matrices de référence ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques (présentées en Annexe III) :

- le *sol S0* : matrice non contaminée. Le sol agricole limono-argileux de la Bouzule a été prélevé dans une ferme expérimentale (ENSAIA de Nancy).

- quatre sols *S0* contaminés artificiellement : le *sol S1* contaminé par du zinc (2.000 mg/kg), du chrome (800 mg/kg), du plomb (800 mg/kg) et du cadmium (50 mg/kg), le *sol SII* contaminé par du phénanthrène (800 mg/kg), du 2,4,6-trichlorophénol (80 mg/kg) et du pentachlorophénol (80 mg/kg), le *sol SII'* contaminé par du B(a)P (250 mg/kg) et le *sol SII''* contaminé par du phénanthrène (800 mg/kg).

- le *sol pollué SIII*, prélevé par excavation sur un site industriel. Ce sol souillé par des solvants organiques et des culots de distillation de régénération de solvants est principalement contaminé par des PCB (204 mg/kg Aroclor 1254[®]) et des métaux. On note la présence d'HAP (2,65 mg/kg).

- le *sol pollué SIV*, prélevé dans d'anciennes cuves de rétention de cokeries comblées par des matériaux, est fortement contaminé par des HAP (238 mg/kg). On note la présence d'hydrocarbures aromatiques chlorés (environ 400 µg/kg), de métaux lourds et l'absence de PCB.

Les sols nous ont été envoyés par l'IRH à notre demande, quelques jours avant chaque série d'exposition. Lorsque des séries ont été dupliquées (SIV) ou tripliquées (SIII), les échantillons de sol SIV étaient donc différents.

II. ETUDE DU SITE POLLUÉ DE REPLONGES

II.1. Etude *in situ*

II.1.1. Capture de surmulots sur le site

Des surmulots mâles et femelles ont été capturés vivants dans la zone II du site contaminé de Replonges, en mars 1994, à l'aide de pièges à trappe pour capture simple, en fil d'acier, de dimensions 15 x 15 x 50 cm (Ets. Combrichon, Trévoux, France).

Plusieurs appâts ont été testés : lors d'une première approche, afin de localiser les rats et de déterminer l'appât le plus efficace, nous avons disposé simultanément des gâteaux secs et du blé à différents endroits. Les sorties de terriers, mares et lieux éventuels de passage (haies, poutres offrant une protection vis-à-vis des prédateurs) ont été privilégiés, mais nous avons aussi appâté à des endroits découverts du site. Après deux jours, il s'est avéré que tous les gâteaux avaient été consommés, alors que le blé était délaissé. Il est certain que la disparition des appâts ne pouvait être attribuée aux rats seuls, des souris et des oiseaux ayant pu également en profiter. Les pièges ont ensuite été disposés aux endroits nous semblant les plus propices (terrier et lieux de passage situés entre le site et le dépôt de ferrailles) avec des gâteaux secs pour appâts.

Les pièges ont été relevés chaque matin. Les animaux de petite taille pouvant s'échapper, nous avons recueilli 8 rats adultes (5 mâles et 3 femelles) en 15 nuits de piégeage. Les rats capturés ont été sacrifiés dès le retour au laboratoire. Les piégeages réalisés à côté du site pollué (zone de prélèvement du sol témoin) ont été sans succès.

II.1.2. Capture de surmulots élevés en semi-liberté

Des rats sauvages sont élevés depuis plusieurs années à l'Ecole Vétérinaire de Lyon, dans un terrarium extérieur couvert et entouré de grillage. Ils sont nourris d'aliments commerciaux (A04, UAR, France) et d'eau du robinet. Les animaux ont été capturés par piégeage : les pièges ont été disposés avant la tombée de la nuit entre la mangeoire et la litière occupée par les rats, de façon à forcer au maximum leur passage dans les trappes. Les pièges ont été relevés le matin et les animaux ont été immédiatement sacrifiés afin d'être dans les mêmes conditions de stress que les surmulots capturés sur le site pollué. La campagne de captures effectuée en février 1994 (4 nuits) nous a permis d'obtenir 11 rats (6 mâles et 5 femelles).

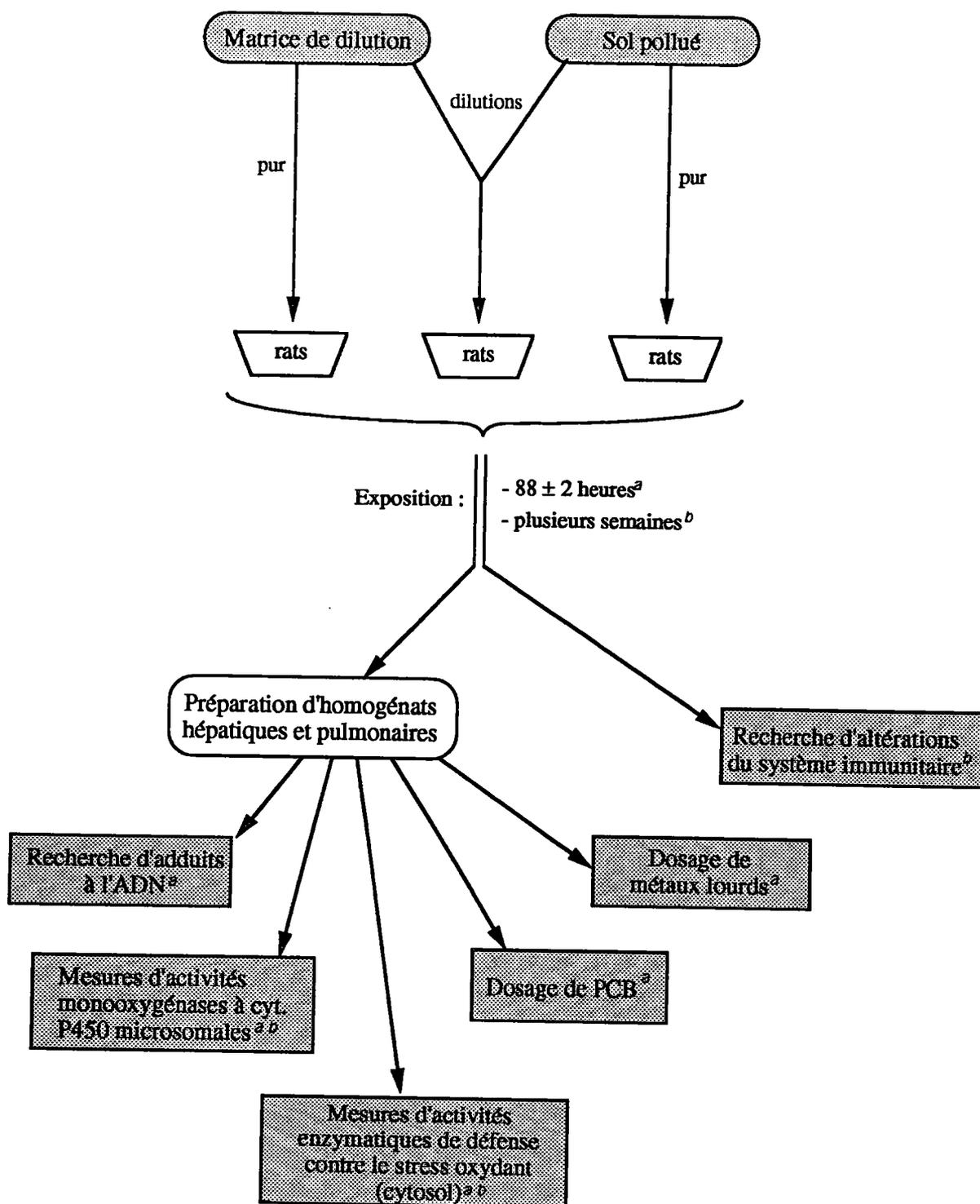


Figure 35 : Représentation schématique des protocoles d'exposition des rats à des litières de sol pollué.

II.1.3. Rats de laboratoire

Les rats de laboratoire (souche OFA, Sprague-Dawley) ont été fournis par IFFA-CREDO (L'Arbresle, France) et acclimatés au laboratoire pendant deux à trois jours avant d'être utilisés pour les bioessais.

II.2. Mise au point d'un protocole d'exposition en laboratoire

II.2.1. Elevage de surmulots au laboratoire

Des surmulots mâles et femelles ont été capturés en juin 1994, dans une friche non agricole et non polluée (dans l'enceinte de l'Ecole Vétérinaire). Les animaux, en bonne santé apparente, ont été placés en animalerie dans des cages métalliques (en gros grillage) de 50 x 35 x 30 cm, spécialement adaptées à leur élevage : une petite niche de métal communique avec la cage par un trou circulaire qui peut être fermé par une trappe. Ce système permet l'isolement des rats et facilite leur manipulation. Le fond de la cage est constitué d'une grille qui permet le passage des excréments et de l'urine récupérés dans un plateau amovible. A la suite des croisements, 22 mâles et 9 femelles de première génération ont été obtenus et utilisés pour des bioessais en février 1995 (ils étaient alors âgés de 6 à 7 mois).

II.2.2. Exposition des rats à différents types de litières

Les rats ont été exposés à différents types de litières dans des bacs en polycarbonate fermés par un couvercle en grille d'acier inoxydable. Chaque bac (29 x 42 x 17 cm) contenait 3 ou 4 rats de laboratoire mais pour des raisons de sécurité, les rats sauvages ont été exposés individuellement dans des cages en polycarbonate plus petites (22 x 42 x 16 cm). Ils ont été nourris *ad libitum* avec des aliments commerciaux (A04, UAR, France) et de l'eau du robinet. Les expositions ont été pratiquées dans une pièce climatisée ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), exclusivement réservée à cet usage, éclairée par des tubes néons (300 lux) avec une photopériode de 12 heures. La figure 35 résume les diverses études utilisant ce mode d'exposition.

II.2.2.1. Exposition à des litières non polluées

Les activités de base ont été mesurées sur des rats maintenus sur une litière de sciure, en l'absence de tout contaminant. Les rats de laboratoire SD (mâles et femelles, 180-200 g) ont été exposés à raison de quatre animaux par cage. En parallèle, les mêmes activités ont été mesurées sur les rats sauvages capturés dans le terrarium.

II.2.2.2. Exposition à des litières de sol provenant du site de

Replonges

Recherche de la durée d'exposition optimale

Des lots de quatre rats blancs SD mâles (180-200 g) ont été exposés à une litière composée de deux litres de sol témoin (prélevé à Replonges) ou de sol Repl.III pendant 1, 2, 3, 7, 14, 30 et 60 jours. La litière a été changée tous les 14 jours.

Comparaison de la réponse des rats sauvages et des rats de laboratoire

Des lots de 5, 9 et 8 rats sauvages mâles élevés au laboratoire ont été exposés individuellement durant 88 ± 2 heures, à une litière respectivement composée de 2 litres de sciure, de sol témoin ou de sol Repl.III. Le même protocole a été suivi pour les femelles (respectivement, $n = 2, 4$ et 5). Les rats sauvages ont été anesthésiés en plaçant directement leur cage dans une enceinte saturée d'éther (grand aquarium).

Recherche d'une relation dose-réponse des activités monooxygénases

L'établissement d'une relation dose-réponse nécessite de diluer un sol pollué avec un sol non pollué. Dans un premier temps, le sol témoin prélevé à Replonges a servi de matrice de dilution au sol Repl.III. Nous avons ensuite choisi d'effectuer les dilutions avec le sol artificiel ISO, qui a l'avantage d'être "standardisé" (ce qualificatif est un mal adapté du fait de la composition non contrôlée de la tourbe) :

a) Dilutions avec le sol témoin prélevé à Replonges : le sol Repl.III a été dilué au 1/2 avec le sol témoin. Des lots de quatre rats de laboratoire mâles (180-200 g) ont été exposés à deux litres de cette litière pendant 3, 7 et 14 jours. Les activités mesurées ont été comparées à celles mesurées sur des rats exposés dans les mêmes conditions aux sols témoin et Repl.III.

b) Dilutions avec le sol artificiel ISO : le sol artificiel standard ISO est composé de 10% de tourbe blonde de sphaigne, 20% de kaolin (Prolabo) et 70% de sable de Fontainebleau 150-210 μm (Prolabo). Du carbonate de calcium est ajouté à raison de 0,5% afin que le pH ne soit pas trop bas ($\text{pH } 6,0 \pm 0,5$). Ces proportions sont poids/poids. Le mélange obtenu est homogénéisé à la main ; il ne subit pas de traitement ultérieur. Le sol ISO a été utilisé comme matrice témoin non contaminée (lot témoin) et comme matrice de dilution de sol pollué.

Pour des raisons pratiques, les litières (préparées par pesée) ont été utilisées à raison de 1 kg par cage. Les dilutions des sols pollués ont été effectuées en progression géométrique de raison 2. La composition des litières de sol pollué dilué est présentée dans le tableau 11. Pour le sol Repl.III, la gamme de dilution va jusque 1/32. Les dilutions ont été directement effectuées dans le bac d'élevage : le sol contaminé a été ajouté (qsp 1 kg) au sol de dilution préalablement homogénéisé. Des lots de quatre rats de laboratoire SD mâles (200-220 g) ont été exposés durant 88 ± 2 heures (3 jours complets et une nuit) à 1 kg de litière composée de sol Repl.III pur ou dilué avec le sol ISO.

Tableau 11 : Composition des litières diluées avec le sol ISO, selon une progression géométrique de raison 2.

Dilution	sol ISO (en g)				sol contaminé (en g)
	Tourbe	Kaolin	Sable	CaCO ₃	
0	0	0	0	0	1000
1/2	50	100	350	2,5	500
1/4	75	150	525	3,75	250
1/8	87,5	175	612,5	4,37	125
1/16	94	187,5	656	4,69	62,5
1/32	97	194	678	4,85	31
1/64	98	197	689	4,92	16
1/128	99	198	694	4,96	8
ISO	100	200	700	5,0	0

II.3. Recherche d'adduits à l'ADN et d'altérations du système immunitaire chez des rats exposés au sol Repl.III au laboratoire

II.3.1. Recherche d'adduits à l'ADN

Deux lots de deux rats de laboratoire SD mâles ont été exposés durant trois jours à une litière de sol ISO ou une litière de sol Repl.III. Les animaux ont été mis à jeun la veille de leur sacrifice.

II.3.2. Recherche d'altérations du système immunitaire

Les effets immunotoxiques étant plus longs à se manifester que les modifications d'activités enzymatiques, les expositions ont été réalisées durant deux à cinq semaines. Deux séries d'exposition ont été mises en oeuvre car il n'était pas possible d'effectuer tous les tests sur un même animal. Les protocoles de mesure sont décrits plus loin.

Altération de la réponse anticorps primaire

Six lots de 3 rats mâles SD (100-120 g) par bac de polycarbonate ont été exposés durant deux semaines à une litière de sciure (3 lots témoin) ou de sol Repl.III (3 lots). Les litières ont été changées toutes les semaines. Au 15^{ème} jour, les rats ont reçu une injection intra-péritonéale de KLH et ont été réexposés sur leurs litières respectives pendant 7 jours (période durant laquelle des prélèvements de sang ont été effectués).

Altérations thymique et activité NK des splénocytes

Trois lots de quatre rats mâles (100-120 g) ont été exposés à une litière de sciure et trois lots à une litière de sol Repl.III, durant 24, 35 et 42 jours.

III. EXPOSITION DE RATS DE LABORATOIRE À DIVERS SOLS POLLUÉS

Les sols S0, SI, SII, SII', SII'', SIII et SIV fournis par l'IRH ont été testés selon le protocole d'exposition en laboratoire mis au point avec le sol Repl.III.

III.1. Mesure d'activités enzymatiques, relations dose-réponse et mesure de doses internes chez des rats exposés à différents sols

III.1.1. Exposition aux sols artificiellement contaminés

Cinq lots de quatre rats mâles SD ont été exposés à 1 kg de sol SI, SII, SII' ou SII'' pendant 88 ± 2 heures. Le sol S0 a été utilisé comme sol témoin.

III.1.2. Exposition aux sols SIII et SIV dilués avec le sol ISO

Tous les bioessais mettant en oeuvre des sols pollués non dilués ou dilués avec du sol ISO ont été réalisés avec des lots de quatre rats de laboratoire SD mâles (200-220 g) exposés dans les conditions définies précédemment. La litière non contaminée de référence était du sol ISO. Trois séries d'exposition au sol SIII ont été réalisées, la gamme de dilution la plus étendue allant jusque 1/64. Deux séries d'exposition ont été réalisées avec le sol SIV, la plus forte dilution utilisée étant le 1/128^{ème}.

III.1.3. Exposition aux sols SIII et SIV dilués avec d'autres matrices

III.1.3.1. Influence de la matière organique sur la biodisponibilité des polluants

Compte tenu des résultats obtenus après dilution du sol SIV avec du sol ISO, trois autres matrices ont été testées : sable, sable et tourbe (90:10) et sable et kaolin (80:20). Une seule dilution de sol pollué a été utilisée (au 1/2), car ces essais se bornaient à déterminer l'influence de chaque composant du sol ISO sur la biodisponibilité des polluants du sol SIV (tableau 12). Pour le sol SIII, nous avons seulement comparé une dilution avec le sol ISO et une dilution avec le sable.

Tableau 12 : Composition des litières de sol pollué dilué au 1/2 avec un ou deux composants du sol ISO.

Dilution	sol de dilution (en g)			sol contaminé (en g)
	Tourbe	Kaolin	Sable	
0	0	0	0	1 000
1/2 sable	0	0	500	500
1/2 sable + tourbe	50	0	450	500
1/2 sable + kaolin	0	100	400	500

III.1.3.2. Dilution du sol SIV avec du sable

Etant donné l'influence de certains composants du sol ISO sur la biodisponibilité des polluants présents dans le sol SIV, ce dernier a été dilué avec du sable de Fontainebleau selon une progression géométrique de raison 3, allant du sol SIV non dilué au sol dilué au 1/243^{ème} (tableau 13).

Tableau 13 : Composition des litières de sol SIV dilué avec du sable de Fontainebleau selon une progression géométrique de raison 3.

Dilution	Sable de Fontainebleau (en g)	Sol contaminé SIV (en g)
0	0	1 000
1/3	667	333
1/9	889	111
1/27	963	37
1/81	988	12
1/243	996	4

III.2. Recherche d'adduits à l'ADN chez des rats exposés au sol SIV

Des rats de laboratoire mâles SD (200-220 g) ont été exposés pendant trois jours au sol SIV dilué avec du sable de Fontainebleau, selon une progression géométrique de raison 2. Cette série (3 rats par lot) va du sol SIV non dilué au sol SIV dilué au 1/16^{ème} (lot témoin = sable). Les animaux ont été mis à jeûner la veille de leur sacrifice.

III.3. Exposition de rats aux sols SIII et SIV sans contact direct

Afin de déterminer l'importance de l'inhalation des composés volatils, nous avons exposé des rats de laboratoire SD mâles au dessus du sol ISO (lot témoin) ou des sols pollués SIII ou SIV en utilisant les cages pour rats sauvages : le sol est placé dans le plateau amovible et les rats sont dans la cage à environ 1 cm du sol dont ils sont séparés par un grillage. Les animaux ne pouvant entrer en contact avec le sol, la mise en suspension de poussières est négligeable et l'on peut considérer que seuls des composés suffisamment volatils peuvent entrer en contact avec les rats.

IV. SACRIFICE DES ANIMAUX ET PRÉPARATION DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES

IV.1. Anesthésie et sacrifice

L'usage de l'éther étant contesté pour les modifications qu'il entraîne sur certaines activités enzymatiques (Liu *et al.*, 1993a et b), nous avons testé l'effet de deux anesthésiques sur les activités des monooxygénases et des enzymes antioxydantes mesurées sur 9 rats de laboratoire SD mâles (3 lots de 3 rats) de 400 à 500 grammes, maintenus sur une litière de sciure. Un lot de rats a été sacrifié par décapitation sans anesthésie, les deux autres lots ont d'abord été anesthésiés par un court séjour dans une enceinte saturée par de l'éther ou du CO₂. Il ont ensuite été sacrifiés de la même façon que les animaux témoins.

Une brève anesthésie des rats SD mâles par de l'éther ou du CO₂ ne modifie ni la teneur en cytochrome P-450 hépatique, ni les activités monooxygénases hépatiques ou pulmonaires spécifiques des isozymes CYP1A1, CYP2B1/2 ou CYP2E1. Les activités enzymatiques de défense contre le stress oxydant ne sont pas davantage modifiées par l'anesthésie, à l'exception de l'activité GSH-Px érythrocytaire qui est significativement augmentée par l'anesthésie à l'éther. Par la suite, tous les rats ont été anesthésiés à l'éther avant d'être sacrifiés, à l'exception des animaux destinés à la recherche d'altérations du système immunitaire (anesthésiés au CO₂).

IV.2. Préparation des organes et tissus destinés à la mesure d'activités enzymatiques et au dosage de PCB ou de métaux.

Du prélèvement à la congélation, toutes les manipulations sont effectuées à +4°C, afin de minimiser la dégradation des activités enzymatiques.

IV.2.1. Matériels et réactifs

- tampon phosphate-KCl : tampon phosphate 0,05 M, pH 7,4 + 1,15 % de KCl,
- milieu de reprise des microsomes : tampon phosphate 0,1 M pH 7,4, EDTA 1mM, glycérol 20 %,
- Ultra-Turrax® ; broyeur de type Potter,
- centrifugation 9.000 g : Beckman® L8-55, rotor 70 Ti, 11.000 tr/min ; centrifugation 105.000 g : Beckman® L8-55, rotor 50 Ti, 40.000 tr/min,

IV.2.2. Le foie

Rincé à l'eau claire, il est rapidement placé dans du tampon phosphate-KCl froid. Il est pesé après avoir été rincé et égoutté, puis dilué dans trois fois son poids de tampon phosphate-KCl. Le foie est alors découpé en morceaux, puis homogénéisé à l'Ultra-Turrax®. L'homogénat à 25% obtenu est centrifugé à +4°C durant 20 min à 9.000 g. L'excédent d'homogénat peut être congelé pour le dosage ultérieur de PCB ou de métaux. Huit ml du surnageant obtenu sont centrifugés (105.000 g) pendant une heure, à +4°C. Le surnageant (cytosol) est congelé à -80°C par aliquots de 0,5 ml. Le culot de microsomes est repris dans 2 ml de milieu de reprise froid, homogénéisé et congelé à -80°C par aliquots de 0,5 ml.

IV.2.3. Le poumon

Perfusé avec du tampon phosphate-KCl, rincé, égoutté, pesé, le poumon est dilué dans sept fois son volume de ce même tampon ; il est ensuite homogénéisé au Potter (homogénat à 12,5%) puis subit les mêmes traitements que l'homogénat de foie. Une partie de l'homogénat peut également être congelée pour le dosage ultérieur de PCB. Le surnageant (cytosol) est congelé à -80°C par aliquots de 0,5 ml. Le culot de microsomes est repris par 1 ml de milieu de reprise, homogénéisé et congelé à -80°C par aliquots de 0,2 ml.

IV.2.4. Le sang

Recueilli dans des tubes citratés, il est centrifugé 10 min à 3.000 tr/min. Le plasma et la couche de leucocytes sont éliminés par aspiration à la pipette Pasteur ; le culot de globules rouges est homogénéisé, dilué au demi dans de l'eau distillée, aliquoté par 0,5 ml et congelé à -80°C.

IV.3. Traitement des organes destinés à la recherche d'adduits à l'ADN

Etant donné le faible poids du poumon (1,5 g en moyenne), les organes sont regroupés en pool, chaque pool correspondant à un lot d'exposition. Une partie de ces pools est destinée à

la recherche d'adduits, l'autre partie à la mesure des activités EROD, PROD et BROD. Dans un souci d'homogénéité, les foies sont également poolés.

IV.3.1. Matériels et réactifs

- tampon phosphate-KCl-EDTA : tampon phosphate 0,05 M pH 7,4 + KCl 1,15% + EDTA 10 mM,
- tampon phosphate-KCl-EDTA-SDS : tampon phosphate 0,05 M pH 7,4 + KCl 1,15% + EDTA 160 mM + SDS 5,6%.

IV.3.2. Le foie

Avant d'être prélevé, le foie est perfusé par la veine cave inférieure, avec 50 ml de tampon phosphate-KCl-EDTA froid, puis mis dans un bécher contenant ce tampon, dans la glace. Lorsque les foies constituant un pool sont prélevés, ils sont homogénéisés à l'Ultra-Turrax[®], avec du tampon phosphate-KCl-EDTA, à raison de 1 vol de foie pour 2 vol de tampon. Après prélèvement et congélation de ce qui est nécessaire à la préparation des microsomes (12 ml), du tampon phosphate-KCl-EDTA-SDS est ajouté à raison de 1 vol pour 3 vol d'homogénat. On obtient un homogénat de foie (à 25%) dans du tampon phosphate 0,05 M + KCl 1,15% + EDTA 50 mM + SDS 1,4%.

IV.3.3. Le poumon

Les poumons sont prélevés, perfusés avec 10 ml de tampon phosphate-KCl-EDTA, puis mis dans un bécher contenant ce tampon, dans la glace. Lorsque les poumons constituant un pool sont prélevés, ils sont homogénéisés au Potter, avec ce même tampon, à raison de 1 vol de poumon pour 5 vol de tampon. Après prélèvement et congélation de ce qui est nécessaire à la préparation des microsomes (10 ml), du tampon phosphate-KCl-EDTA-SDS est ajouté à raison de 1 vol pour 3 vol d'homogénat. On obtient un homogénat de poumon (à 12,5%) dans du tampon phosphate 0,05 M + KCl 1,15% + EDTA 50 mM + SDS 1,4%.

Les échantillons sont immédiatement congelés à -80°C, pour être ultérieurement envoyés dans de la carboglace[®] au Laboratoire de Biologie Végétale Appliquée de Strasbourg, où le Professeur Benoît Rether et son équipe effectuent les dosages d'adduits par post-marquage au γ [³²P]-ATP.

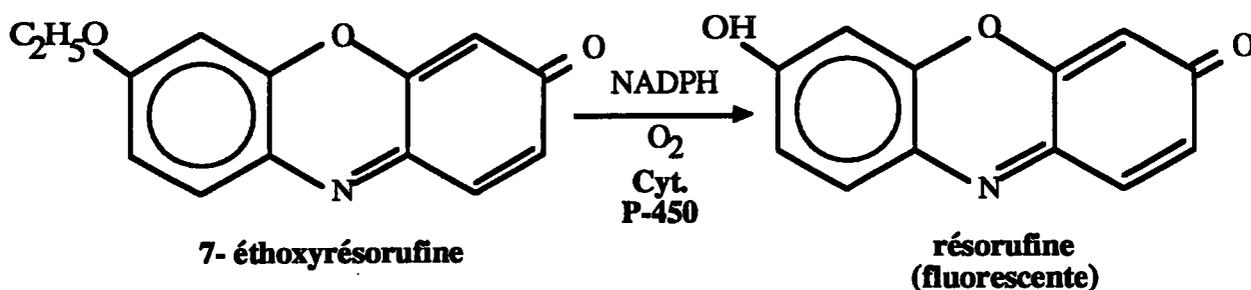
Pour des raisons pratiques, les homogénats ont été congelés à -80°C lors de la préparation des fractions nécessaires à la recherche d'adduits à l'ADN. Les proportions de foie et de poumon dans ces homogénats sont respectivement de 1/3 et 1/6. Pour les ramener à 25% et 12,5%, il suffit de rajouter 1 vol de tampon phosphate-KCl pour 3 vol d'homogénat.

V. MESURE DES BIOMARQUEURS

V.1. Activités cytochrome P-450 dépendantes

V.1.1. Activités alkoxyrésorufine O-désalkylases

La désalkylation des alkoxyrésorufines (7-éthoxy-, 7-benzoxy- et 7-pentoxy-résorufines) par les monooxygénases à cytochromes P-450 conduit à la formation de résorufine, produit fluorescent quantifié par spectrofluorimétrie (selon Rifkind & Muschick, 1983).



Matériels et réactifs

- milieu d'incubation : système régénérant de NADPH composé de glucose 6-phosphate 5 mM, NADP 0,5 mM (réactifs fournis par Boehringer-Manheim, France) dans un tampon phosphate 0,2 M pH 7,4 et glucose 6-phosphate déshydrogénase 1 unité (ajoutée extemporanément),

- substrats : en solution dans du DMSO, ils sont conservés en aliquots à -20°C. Quatre solutions sont utilisées : 7-éthoxyrésorufine (7-ER) : 0,1 mM, 7-pentoxyrésorufine (7-PR) : 0,1 et 0,125 mM et 7-benzoxyrésorufine (7-BR) : 0,1 mM,

- acétone,

- solution de référence : Rhodamine B (50 ng/ml),

- spectrofluorimètre (Jobin-Yvon SY 3 D).

Méthode de mesure

Les activités alkoxyrésorufine O-désalkylases sont mesurées sur des fractions microsomales de foie ou de poumon. La réaction est effectuée à +37°C. A 0,5 ml de milieu d'incubation sont ajoutés 10 µl de substrat et de l'eau distillée qsp 1 ml (volume final). La réaction est démarrée par l'ajout des microsomes ; elle est stoppée par l'ajout de 2 ml d'acétone, après un temps d'incubation à +37°C de quelques minutes (voir ci-dessous). Les tubes sont alors centrifugés à +4°C à 3.000 tr/min pendant 5 minutes.

La fluorescence du surnageant est déterminée au spectrofluorimètre à une longueur d'onde d'excitation de 537 nm et une émission à 583 nm. Elle est comparée à la fluorescence

d'une solution de référence (Rhodamine B) lue dans les mêmes conditions. L'activité est exprimée en pmol par mg de protéines par minute.

Conditions de linéarité

- Activité 7-éthoxyrésorufine-*O*-dééthylase (EROD) : la concentration du substrat (7-ER) est de 100 μM . Les temps d'incubation pour le foie et le poumon sont respectivement de 2 et 5 min, le volume de microsomes est de 50 μl dans les deux cas.

- Activité 7-benzoxyrésorufine *O*-débenzylase (BROD) : la concentration du substrat (7-BR) est de 100 μM , le temps d'incubation est de 5 min. Le volume de microsomes de poumon est de 20 μl contre 50 μl pour le foie.

- Activité 7-pentoxyrésorufine *O*-dépentylase (PROD) : la concentration en 7-PR est de 100 μM (foie) et 125 μM (poumon). Les temps d'incubation pour le foie et le poumon sont, respectivement de 2 et 5 min avec 50 μl de microsomes.

Lors de fortes inductions, il est parfois nécessaire de diminuer les prises d'essai. A titre indicatif, les teneurs en protéines dans les microsomes de foie et de poumon sont respectivement de l'ordre de 20 et 6 mg/ml.

V.1.2. Activité 4-nitrophénol hydroxylase

Le cytochrome P-450 2E1 métabolise le 4-nitrophénol en 4-nitrocatechol qui est mesuré par spectrophotométrie à 546 nm (Reinke & Moyer, 1985).

Le milieu d'incubation est le même que pour les activités alkoxyrésorufine *O*-désalkylases. A 1 ml de ce milieu sont ajoutés 50 μl de microsomes et de l'eau distillée qsp 2 ml de volume final. La réaction est démarrée par ajout de 20 μl de substrat (4-nitrophénol à 20 mM dans du méthoxyéthanol). Après 10 (foie) ou 20 min (poumon) d'incubation à +37°C, la réaction est arrêtée par 0,5 ml d' HClO_4 (0,6 N). Après centrifugation (5 min à 3.000 tr/min), 2 ml de surnageant sont prélevés et additionnés de 0,2 ml d'une solution de soude (10 N). L'absorbance est lue à 546 nm ($\epsilon_{\text{catechol}} = 10,28 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

La réaction est linéaire pendant au moins 15 min avec 0,4 à 1,4 mg de protéines microsomales (foie).

V.1.3. Dosage du cytochrome P-450 total

La teneur en cytochromes P-450 des fractions microsomales est déterminée selon la méthode spectrophotométrique de Matsubara *et al.* (1976). A l'état réduit et en présence de monoxyde de carbone, le cytochrome P-450 absorbe entre 400 et 500 nm, avec un pic à 450 nm. Ce dosage global ne permet pas de différencier les formes de cytochromes P-450.

Les microsomes, dilués 15 fois dans du tampon phosphate 0,05 M, pH 7,4 additionné de 1,15% de KCl, sont soumis à un bullage de CO pendant 1 min, puis la suspension est répartie dans deux cuves. Après traçage d'une ligne de base entre 400 et 500 nm, une pointe

de spatule de dithionite (réducteur) est ajoutée dans l'une des cuves. Un spectre différentiel est alors tracé entre 400 et 500 nm. La teneur en cytochrome P-450, déterminée à partir de la hauteur du pic et en prenant un coefficient d'extinction molaire de $104 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Matsubara *et al.*, 1976), est exprimée en nmol/mg de protéines microsomales.

V.2. Activités enzymatiques de défense contre le stress oxydant

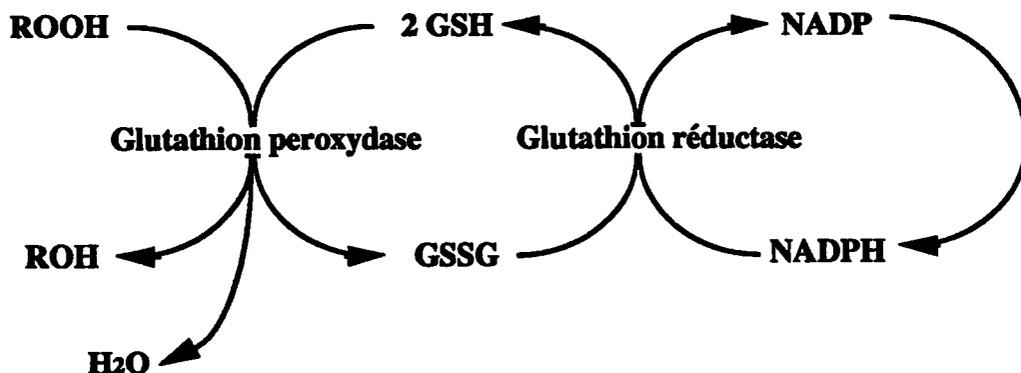
V.2.1. Catalase

La catalase permet la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène. Le peroxyde d'hydrogène absorbant à 240 nm, sa disparition permet de mesurer directement l'activité catalasique par lecture en continu au spectrophotomètre (Beers & Sizer, 1952).

Les échantillons (fractions cytosoliques de foie et de poumon, hémolysat) sont dilués dans du tampon phosphate 0,05 M, pH 7 (respectivement 8.000, 100 et 5.000 fois). Le milieu réactionnel est composé de 2 ml d'échantillon dilué et de 1 ml d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène (10 mM). L'activité catalasique est mesurée à $+25^\circ\text{C}$ par la diminution de l'absorbance à 240 nm correspondant à disparition du peroxyde d'hydrogène. La réaction est linéaire pour une prise d'essai contenant 5 μg de protéines (au moins) pour le foie, 0,2 mg de protéines pour le poumon et 60 mg d'hémoglobine (Hb) pour l'hémolysat. Les activités sont exprimées en mmoles ou μmoles d' H_2O_2 consommées par minutes par mg de protéines (fractions cytosoliques) ou par g d'Hb (hémolysats).

V.2.2. Glutathion peroxydases

La glutathion peroxydase catalyse la réduction des hydroperoxydes (ROOH) par oxydation du glutathion réduit (GSH), en présence d'un système régénérant de NADP. La réduction des hydroperoxydes provoque l'oxydation de NADPH en NADP : la disparition du NADPH, suivie à 340 nm ($\epsilon = 6,22 \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), permet de mesurer l'activité glutathion peroxydase (Paglia & Valentine, 1967).



Deux substrats sont utilisés : l'hydroperoxyde de cumène permet la mesure de l'activité glutathion peroxydase totale, alors que le peroxyde d'hydrogène assure la détermination de l'activité Se-GSH-Px seule (Lawrence & Burk, 1976).

Les échantillons (fractions cytosoliques de foie et de poumon, hémolysat) sont dilués dans de l'eau distillée, respectivement 10, 4 et 10 fois. L'hémoglobine pouvant interférer dans les dosages (Cross *et al.*, 1979), elle est éliminée par deux techniques : la glutathion peroxydase des fractions cytosoliques (5 volumes de l'échantillon dilué) est extraite par de l'éthanol (2 volumes), alors que l'hémoglobine est précipitée par du chloroforme (2 volumes) et les deux fractions sont séparées par centrifugation (10 min à 9.000 g) ; les hémolysats sont incubés 30 min à température ambiante avec un volume égal de réactif de Drabkin doublement concentré (KCN 1,6 mM, NaHCO₃ 23,8 mM, K₃Fe(CN)₆ 1,2 mM en solution aqueuse), ce qui permet de transformer toute l'hémoglobine en cyanméthémoglobine.

Le milieu réactionnel (volume final 1 ml) est constitué de tampon phosphate (0,05 M pH 7, 800 µl) additionné de 1,29 mM d'EDTA et 1,29 mM d'azoture de sodium. Ces deux additifs permettent de bloquer l'activité catalasique apportée par les échantillons, qui pourrait interférer lors de la mesure de la Se-GSH-Px. Les éléments essentiels au fonctionnement de l'enzyme sont présents dans le milieu, à savoir du glutathion réduit (0,5 mM) dont la concentration est maintenue constante par la présence de glutathion réductase (0,05 U/ml) et de NADPH (0,075 mM). Tous ces éléments sont apportés à raison de 50 µl chacun. Les concentrations indiquées correspondent à la concentration finale dans le milieu réactionnel. L'échantillon (10 à 50 µl d'extrait éthanolique) est incubé deux minutes à +37°C dans ce milieu et la réaction est démarrée par ajout de 50 µl de substrat (0,75 mM). La réaction est linéaire pour une prise d'essai contenant 20 à 70 µg de protéines (fractions hépatiques), 100 à 180 µg de protéines (fractions pulmonaires) et moins de 75 µg d'Hb pour les hémolysats.

Une unité d'activité enzymatique de glutathion peroxydase correspond à l'oxydation de 1 µmole de glutathion, soit la disparition de 0,5 µmole de NADPH par minute par milligramme de protéine ou par gramme d'Hb.

V.2.3. Superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase a pour fonction de détruire l'anion superoxyde par dismutation. Son activité a été mesurée par inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol selon la méthode de Marklund & Marklund (1974). En présence de l'anion superoxyde, le pyrogallol (1,2,3-trihydroxybenzène) s'auto-oxyde en pyrogalline ; la SOD est capable d'inhiber cette réaction (à 97,5%) en dismutant l'anion superoxyde.

Les échantillons à doser (fractions cytosoliques de foie ou de poumon, hémolysat) sont dilués dans de l'eau distillée (respectivement 10, 2 et 5 fois) puis subissent une extraction éthanolique afin d'éliminer l'Hb. Le milieu réactionnel est constitué de tampon Tris-acide cacodylique (50 mM) additionné d'acide diéthylènetriamine pentaacétique (1 mM). Il est

primordial que le pH de ce tampon soit ajusté à $8,22 \pm 0,02$ (à $+25^{\circ}\text{C}$) avec une solution concentrée d'acide cacodylique (3,62 M). A 1,9 ml de ce tampon sont ajoutés 10 μl de catalase bovine (30 μM) et un volume de pyrogallol (10 μM) à déterminer (40 à 50 μl) afin d'obtenir une variation d'absorbance maximale de 0,020 unités par minute. La mesure de l'activité des fractions testées est effectuée de la même façon, avec une prise d'essai de 50 μl . L'inhibition de l'auto-oxydation par la SOD est linéaire jusque 65 % d'inhibition selon une gamme étalon effectuée avec de la SOD bovine (60,8 U/ml). La réaction est linéaire pour une prise d'essai contenant 7 à 75 μg de protéines (fractions hépatiques), 90 à 180 μg de protéines (fractions pulmonaires) ou 0,07 à 0,25 mg d'Hb pour les hémolysats. Cela revient, en général, à ne pas dépasser un taux d'inhibition de 40%. Une unité d'activité enzymatique de SOD est définie comme la quantité d'enzyme capable d'inhiber de 50 % l'oxydation du pyrogallol dans les conditions du dosage.

V.3. Dosage des protéines et de l'hémoglobine

Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry, modifiée par Hartree (Hartree, 1972). Trois solutions sont nécessaires à ce dosage :

- solution A : tartrate de sodium et potassium 7,1 mM, Na_2CO_3 anhydre 0,95 M, NaOH 0,5 N
- solution B : tartrate de sodium et potassium 70 mM, CuSO_4 40 mM, NaOH 0,1 N
- solution C : réactif de Folin-Ciocalteu (Carlo-Erba) dilué 16 fois dans l'eau

Les fractions à doser sont diluées dans de l'eau distillée. Un ml de dilution est mélangé à 1 ml de solution A. Après 10 min à $+50^{\circ}\text{C}$ et refroidissement, on ajoute 0,1 ml de solution B. Le mélange est alors incubé 10 min à température ambiante, puis 3 ml de solution C sont ajoutés. La lecture se fait à 650 nm après incubation 10 min à $+50^{\circ}\text{C}$. L'étalonnage est effectué avec une solution d'albumine bovine sérique (0,01 - 0,1 mg/ml).

L'hémoglobine est oxydée en ferricyanure de potassium et transformée en cyanméthémoglobine sous l'action du réactif de Drabkin (Drabkin & Austin 1935). Le dosage est effectué sur des hémolysats dilués 40 fois dans l'eau distillée. Douze μl sont mélangés à 3 ml de solution de Drabkin (réactif de Drabkin (1 flacon) + 0,5 ml de solution de Brij (Sigma), eau qsp 1 litre). L'absorbance est mesurée à 540 nm après 30 min d'incubation à température ambiante à l'abri de la lumière. La droite d'étalonnage est effectuée avec un standard d'Hb (Sigma). Les teneurs en Hb sont exprimées en grammes pour 100 ml.

V.4. Recherche d'adduits à l'ADN hépatique et pulmonaire

La recherche des adduits à l'ADN a été réalisée au Laboratoire de Biologie Végétale Appliquée de Strasbourg, par M. le Professeur Benoît Rether et son équipe. Les manipulations n'ayant pas été effectuées par nos soins, nous n'entrerons pas dans les détails de la manipulation.

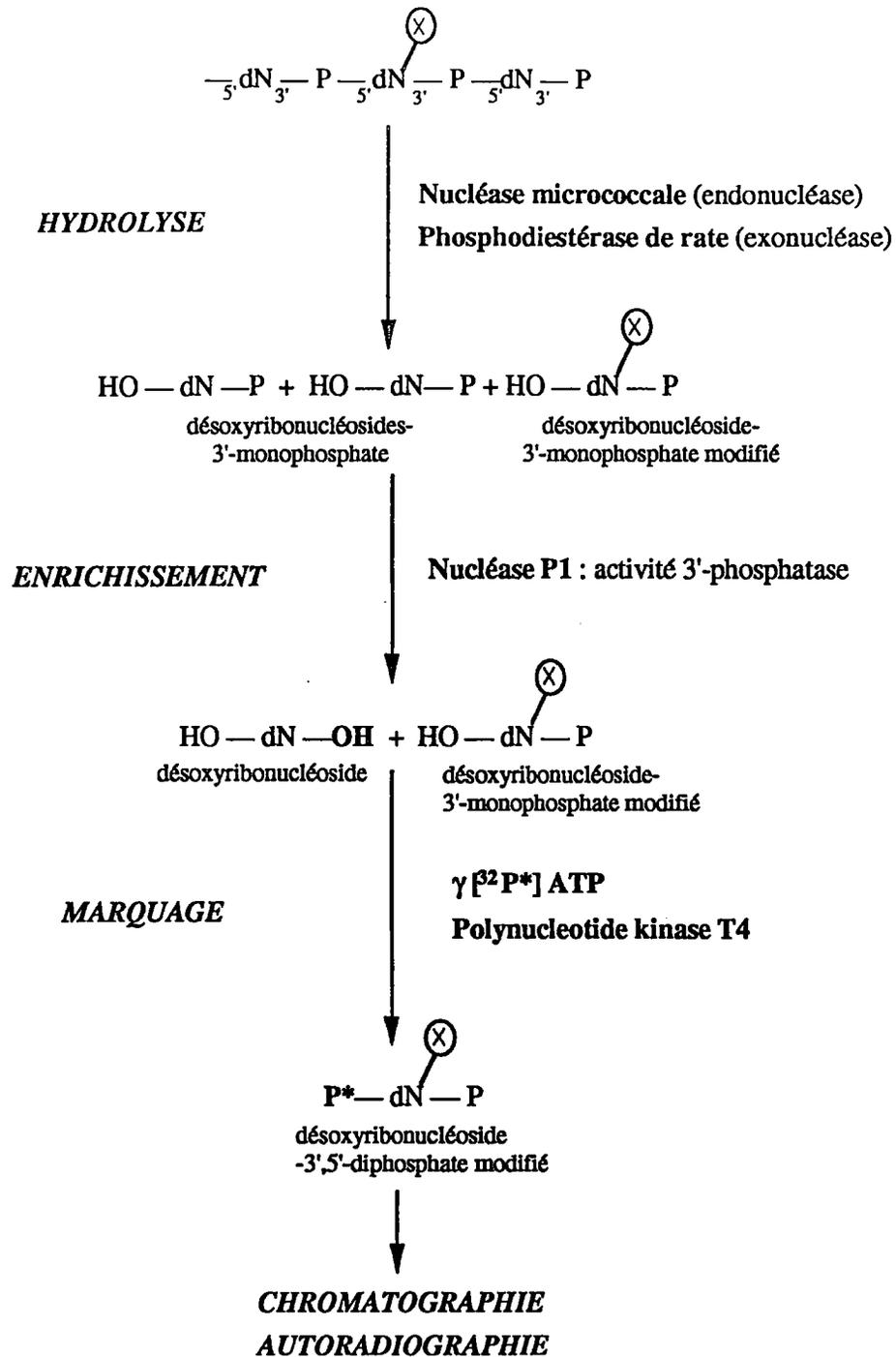


Figure 36 : Principe du postmarquage au $\gamma [^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (selon Randerath *et al.*, 1981 modifiée par Reddy & Randerath, 1986).

(X) : xénobiotique

V.4.1. Extraction et purification de l'ADN

Les échantillons sont des homogénats de foie et de poumon, dans du tampon phosphate 0,05 M + KCl 1,15% + EDTA 50 mM + SDS 1,4%. Ces homogénats contiennent respectivement 25% et 12,5% d'organe frais (poids/poids).

La méthode de post-marquage des adduits au γ [³²P]-ATP mise au point par Randerath *et al.* (1981), s'effectue *in vitro*, après extraction et purification de l'ADN des tissus à analyser. Les acides nucléiques sont extraits par passage sur une colonne de DEAE-cellulose (échangeuse d'anions). L'ARN et les protéines sont respectivement éliminés par l'action de RNAses (RNase A et RNase T1) et d'une protéase (protéinase K). L'ADN purifié, extrait par extraction phénolique, est remis en solution aqueuse et quantifié en sachant qu'une unité de DO à 260 nm correspond à 50 μ g d'ADN par ml.

V.4.2. Hydrolyse de l'ADN et enrichissement par la nucléase P1

Une quantité connue d'ADN (environ 10 μ g) est hydrolysée en désoxyribonucléosides-3'-monophosphate (dNp) par action d'une endo- et d'une exonucléase (respectivement, nucléase micrococcale et phosphodiesterase de rate). Initialement, la méthode de Randerath *et al.* (1981) préconisait alors de pratiquer le marquage, mais il est préférable de procéder à un enrichissement des nucléotides modifiés (Reddy & Randerath, 1986) : la nucléase P1 déphosphoryle les dNp non modifiés en désoxyribonucléosides, alors que les dNp modifiés (porteurs d'un adduit) ne sont pas atteints (figure 36). Cette étape permet d'améliorer la sensibilité de la méthode d'un facteur 100 à 1.000.

V.4.3. Marquage au γ [³²P]-ATP

Les adduits sont marqués par transfert d'un groupement phosphate marqué au ³²P (situé en position γ de l'ATP) sur le groupement hydroxyle en 5' des dNp modifiés, sous l'action catalytique de la polynucléotide kinase T4. Les désoxyribonucléosides obtenus après action de la nucléase P1 ne sont pas substrats de cette enzyme. Les étapes d'hydrolyse et de marquage sont représentées sur la figure 36.

Après ces différents traitements, les échantillons contiennent finalement : les enzymes utilisées, les nucléosides dérivant des nucléotides normaux et les nucléosides-3',5'-diphosphate modifiés, marqués au ³²P en position 5'. Les nucléosides-3',5'-diphosphate modifiés vont être purifiés et séparés par chromatographie échangeuse d'ions sur couche mince.

V.4.4. Séparation des adduits par chromatographie bidimensionnelle

Les adduits marqués sont séparés par 4 chromatographies successives sur plaque de polyéthylèneimine-cellulose (PEI-cellulose). Ces chromatographies sont notées D1, D2, D3 et

D4. Les désoxyribonucléosides-3',5'-diphosphate modifiés sont plus hydrophobes que les autres constituants du milieu, du fait de la fixation du xénobiotique. Une chromatographie échangeuse d'anions permet d'entraîner les éléments hydrophiles du milieu réactionnel, (tampon d'élution : sodium-phosphate), les adduits restant à l'origine de la plaque (migration D1, durée minimum 16 heures). Après migration, les dépôts sont localisés par autoradiographie et les rectangles contenant les dépôts sont découpés et appliqués sur de nouvelles plaques de PEI-cellulose. La migration D2 se fait dans un solvant de force ionique élevée (tampon lithium-formiate 4,8 M, urée 7,7 M, pH 3,5, durée 5 heures), ce qui permet de séparer un certain nombre d'adduits. Les plaques sont ensuite lavées, séchées, et le front de migration est éliminé. La troisième migration s'effectue perpendiculairement à la précédente, afin d'obtenir une chromatographie bidimensionnelle : après une prémigration (effectuée dans du tampon Na_2HPO_4 0,06 M, pH 6,4), la migration D3 s'effectue avec du tampon Na_2HPO_4 0,06 M, urée 6 M, pH 6,4 (environ 2 heures). La migration terminée, les plaques sont lavées, séchées, subissent une prémigration dans l'eau, puis une migration dans du tampon Na_2HPO_4 1,7M, pH 6,0 (D4, une nuit). Cette dernière migration s'effectue dans le même sens que la migration D3. L'existence d'une radioactivité résiduelle liée à la fixation aspécifique de ^{32}P étant inévitable, cette dernière migration permet d'éliminer la radioactivité provenant de produits non hydrophobes.

Les adduits sont révélés par exposition de films radiographiques, en présence d'un écran intensificateur, pendant 24 heures à -70°C . Le développement des films montre les taches correspondant aux différents adduits marqués au ^{32}P . Le nombre, la localisation et l'intensité de ces taches sont caractéristiques de l'échantillon. Après repérage et codification des taches, la PEI-cellulose peut être grattée de son support plastique et récupérée dans un tube Eppendorf (un tube par tache). La radioactivité résiduelle sera mesurée à partir d'une zone sans adduits par comptage Cerenkov dans un compteur à scintillation. L'activité spécifique de l'ATP permet de calculer le nombre de fmoles d'adduits par mg d'ADN : sachant que 1 fmoles d'adduits par mg d'ADN équivaut à 0,33 adduits pour 10^9 nucléotides (Nt), il est alors possible de déduire le nombre d'adduits pour 10^9 Nt. Le seuil de détection de cette méthode est de 1 adduit pour 10^9 Nt, soit moins de 1 adduit par génome pour une cellule (humaine).

V.5. Recherche d'altérations du système immunitaire

V.5.1. Réponse anticorps primaire : immunisation par la KLH

Le but de cette expérience est de mettre en évidence une modification de la réponse anticorps primaire vis-à-vis d'un antigène T-dépendant (premier contact). Une suspension de l'antigène (KLH) est injectée par voie intrapéritonéale à des rats préalablement exposés au sol pollué Repl.III ou à une litière de sciure. Après quelques jours nécessaires à la synthèse des premiers

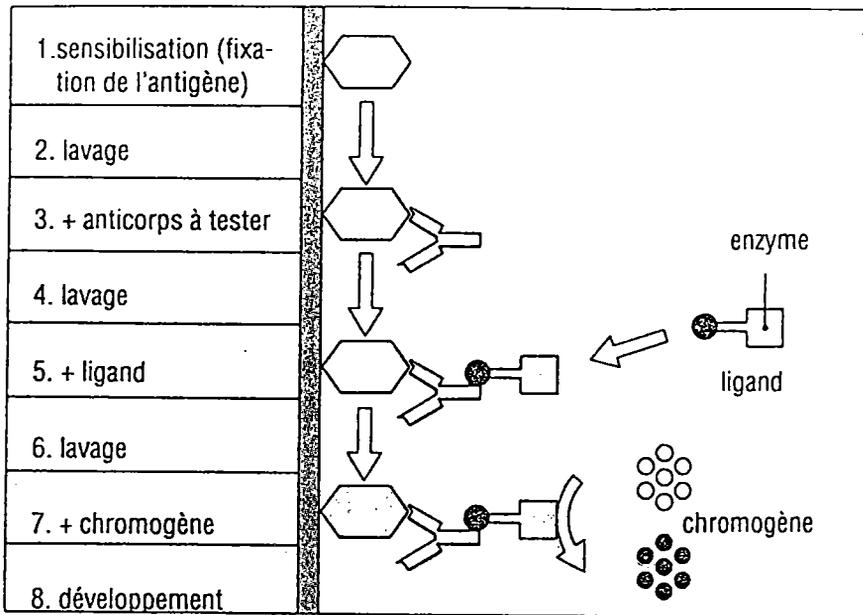


Figure 37 : Principe d'un dosage ELISA (selon Roitt *et al.*, 1994).

anticorps spécifiques (IgM) de l'antigène injecté, les IgM sont dosés sur des échantillons de sang.

V.5.1.1. Immunisation des rats

Des suspensions de KLH sont effectuées dans du PBS pH 7,4 stérile à partir de KLH soluble (Sigma) et mélangées avec un égal volume avec d'alun (Sigma). Trois doses de KLH (A : 50 µg, B : 100 µg et C : 200 µg par rat) ont été testées sur un lot témoin (T) et un lot "Repl.III" afin de déterminer quelle dose donne la meilleure réponse. Les injections i.p. se font sous un volume de 200 µl par rat.

V.5.1.2. Prélèvement du sang

Du sang a été prélevé à l'oeil sur des rats anesthésiés au CO₂ à l'aide d'une pipette Pasteur au 4^{ème}, 5^{ème} et 7^{ème} jour après l'immunisation (respectivement, J₄, J₅ et J₇). Le sérum obtenu après centrifugation du sang à 3.000 tr/min pendant 10 minutes a été congelé à -20°C.

V.5.1.3. Dosage des IgM anti-KLH

Matériels et réactifs

- tampon PBS : tampon phosphate 0,01 M pH 7,4 + NaCl 120 mM + KCl 2,7 mM,
- solution de lavage : tampon PBS + Tween 20 0,05%,
- tampon de saturation : tampon PBS + Tween 20 0,05% + sérum albumine bovine 3%,
- anticorps de chèvre anti IgM de rat, marqués à la peroxydase (Pierce 31476),
- KLH : "Keyhole from Limpet Hemocyanin" (Sigma H7017),
- système de révélation de la peroxydase (Kirkegaard & Perry Laboratories),
- H₃PO₄, 1M,
- plaques 96 puits, IMMULON III (Dynatech),
- lecteur de plaques.

Méthode de mesure

Il s'agit d'un dosage ELISA ("Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay") indirect. Le principe de ce dosage est décrit sur la figure 37. Dans une première étape, l'antigène (KLH 1 mg/ml dans du PBS, 200 µl) est fixé à la surface plastique des puits de la plaque de dosage pendant une nuit à +4°C (phase de "coating"). Après 3 lavages, 200 µl de tampon de saturation sont distribués dans tous les puits, afin d'éviter les fixations non spécifiques de l'anticorps (1 heure à température ambiante). Dans une deuxième étape (après 3 lavages), les anticorps anti-KLH (sérum de rat dilué au 1/10 ou au 1/100 dans du tampon de saturation) sont ajoutés (la dilution du sérum doit permettre d'être en excès de sites antigènes). Un contact de deux heures à +37°C permet la fixation spécifique des anticorps anti-KLH sur les

molécules de KLH attachées à la paroi. Après 3 lavages, 200 µl d'anticorps de chèvre anti-IgM de rat (dilués au 1/200 dans du PBS) marqués par la peroxydase sont ajoutés. Après une heure de fixation à +37°C et 3 lavages, l'activité enzymatique est révélée : les deux réactifs du kit de révélation sont mélangés extemporanément (volume à volume). Deux cent µl de ce mélange sont déposés dans les puits. Après 10 min d'incubation à +37°C, la réaction est arrêtée par 50 µl d'acide phosphorique 1 M. L'activité enzymatique est lue sur un lecteur de plaques ($\lambda = 450$ nm). L'absorbance est directement proportionnelle à la quantité d'anti-IgM retenus, donc à la quantité d'IgM de rat présents.

Les résultats sont exprimés en unités arbitraires, puisque nous n'avons pas pu réaliser de courbe étalon (il n'existe pas d'IgM anti-KLH commercialisés). Les puits témoins sont traités de la même façon que les autres puits, mais le sérum de rat est remplacé par du tampon.

V.5.2. Altération thymique et activité NK des splénocytes

V.5.2.1. Réponse cellulaire au niveau du thymus

Les rats ont été asphyxiés au CO₂. Leur thymus a été prélevé rapidement et immédiatement plongé dans un bain de fixateur histologique (formol 10% dans de l'eau physiologique) pendant au moins 24 heures. La rate a été prélevée dans des conditions aseptiques pour la mesure de l'activité NK.

Les thymus fixés sont inclus dans de la paraffine, coupés en fines lamelles (4 µm) et disposés sur des lames. Une coloration topographique classique (hémalum-phloxine ou éosine) permet de différencier le noyau du cytoplasme. L'ensemble de ces opérations a été effectué par Mme Cottin, au sein du service d'Histologie de l'Ecole Vétérinaire. Les coupes sont observées au microscope optique, avec un grossissement x 40. Cela permet d'avoir une vue d'ensemble de la densité cellulaire du cortex et de la médullaire thymiques.

V.5.2.2. Mesure de l'activité NK

Les rats dont le thymus a été prélevé ont également été utilisés pour la mesure de l'activité Natural Killer de leurs splénocytes. La mesure de cette activité nécessite l'utilisation d'une lignée cellulaire (YAC-1) qui doit incorporer du chrome radioactif (⁵¹Cr). Pour des raisons de réglementation et de sécurité, ces expériences ont été effectuées par mes soins dans le laboratoire du Professeur Marie Favrot, à l'hôpital Léon Bérard, Lyon. Le contact entre les cellules NK et les cellules cibles marquées provoque la lyse de ces cellules et la libération du ⁵¹Cr qu'elles contiennent. Des problèmes techniques (contamination de la lignée de cellules cibles par des mycoplasmes) nous ont empêchés de mener à bien ces manipulations. Nous ne développerons donc pas davantage la technique.

V.6. Dosage des polychlorobiphényles

Le dosage des PCB a été gracieusement effectué par M. Philippe Berny, au Laboratoire de Toxicologie Vétérinaire (Ecole Vétérinaire de Lyon).

Les dosages ont été réalisés à partir des homogénats préparés lors du broyage des organes destinés à la mesure des activités enzymatiques microsomales. Les homogénats de foie et de poumon sont, respectivement, à 25% et 12,5% dans du tampon phosphate 0,05 M, pH 7,4 + KCl 1,15%. Les PCB ont également été dosés sur le sol SIII.

V.6.1. Extraction

Un à 1,5 ml de l'échantillon est mélangé à 5 ml de mélange hexane/acétone (75/25). Après une centrifugation de 5 min à 3.000 tr/min, le surnageant est filtré sur filtre 1 PS (retenant l'eau) dans un ballon. Après évaporation, le résidu sec est repris par 5 ml du mélange hexane/acétone et extrait une seconde fois. Le résidu sec est ensuite repris par 10 ml d'hexane.

V.6.2. Purifications

Les échantillons ont subi deux purifications : une hydrolyse acide et une hydrolyse alcaline. Deux ml d' H_2SO_4 à 7% sont ajoutés aux 10 ml d'extrait, dans un tube vissé. Le tube est agité au vortex puis centrifugé au moins 10 min à 3.000 tr/min. Le surnageant (phase hexanique) est récupéré, évaporé et le résidu sec est repris dans 1 ml d'hexane (l'échantillon est concentré dix fois). Cette hydrolyse permet d'éliminer des molécules organiques (acides gras).

L'extrait obtenu après l'hydrolyse acide (1 ml) est mélangé avec 1 ml de potasse éthanolique à 2%. Le tube est immédiatement revissé et agité pendant 1/2 heure dans un bain-marie à +50°C. Après refroidissement du tube, 2 ml d'eau ultra-pure sont ajoutés. Le tube est agité vigoureusement pendant 2 min, puis centrifugé 10 minutes à 3.000 tr/min. Le surnageant (phase hexanique) est transvasé dans un autre tube vissé et cet extrait est purifié avec 1 ml d' H_2SO_4 à 7%. Le tube est agité au vortex puis centrifugé 10 minutes à 3.000 tr/min. Le surnageant transvasé dans un tube vissé est prêt pour l'analyse en chromatographie gazeuse. Ces hydrolyses détruisent les acides gras et les organochlorés, à l'exception des PCB, de la DDE, de l'hexachlorobenzène, du bêta HCB, de l'heptachlore et du lindane.

V.6.3. Chromatographie en phase gazeuse

Les analyses ont été effectuées sur un chromatographe Hewlett-Packard 5890 II GC (ECD), équipé d'un détecteur à capture d'électrons ^{63}Ni . La colonne capillaire utilisée mesure 60 m de long, pour un diamètre intérieur de 0,25 mm et une épaisseur de film de 0,25 μm (Restek RTX 5% diphenyle - 95% diméthylpolysiloxane). L'azote est utilisé comme gaz vecteur. Le four est porté à une température de 75°C pendant 2 minutes ; la température augmente de 15°C par minute jusqu'à 150°C, puis de 1,2°C par minute jusque +300°C (soit une durée

totale de 132 minutes). La température de l'injecteur et du détecteur est de +250°C et +300°C respectivement. Un à 2 µl de l'échantillon sont injectés en mode "splitless".

Les congénères les plus fortement représentés dans le foie, le poumon ou le sol SIII sont identifiés et quantifiés à l'aide de standards de référence (Ets Cluzeau, Ste Foy la Grande, France) : congénères #28, #52, #77, #101, #105, #118, #126, #128, #138, #153, #169, #180, Aroclor 1254[®] et Aroclor 1260[®]. Un extrait d'huile de foie de morue de composition certifiée est également analysé. Tous les congénères mesurés sont dans l'intervalle d'acceptabilité du BCR.

V.6.4. Expression des résultats

La concentration en PCB dans les échantillons de foie ou de poumon est exprimée en ng/g d'organe frais (ppb) ; les concentrations dans le sol SIII sont exprimées en µg/g de sol (ppm). L'expression de nos résultats en Aroclor[®] est basée sur les pics majoritaires faisant partie de chaque Aroclor[®]. La technique étant validée, une simple règle suffit à calculer les concentrations en équivalent Aroclor[®] présentes dans l'échantillon. Le calcul de la concentration en PCB en équivalent Aroclor 1254[®] est effectué indépendamment du calcul en Aroclor 1260[®]. Par conséquent, les concentrations de chaque congénère et de chaque Aroclor[®] ne sont pas additives (contrairement aux résultats fournis par l'IRH).

V.7. Dosage des métaux lourds

Le plomb, le zinc et le cadmium ont été gracieusement dosés au Laboratoire de Toxicologie Vétérinaire sur les homogénats de foie et sur les sols SIII et SIV.

Quatre ml d'homogénat de foie sont pesés dans une barquette en aluminium. L'échantillon est alors placé dans une étuve à +100°C pendant 48 heures, ce qui permet ensuite de déterminer le pourcentage d'humidité. Le prélèvement sec est écrasé avec un pilon, jusqu'à obtention d'une poudre fine. Un gramme de poudre est placé dans une capsule de porcelaine pour être minéralisé au four à +650°C (pendant 12 heures). Cinq ml d'acide nitrique concentré (exempt de plomb) sont ajoutés aux cendres. Après évaporation à sec sur une plaque chauffante, le résidu est repris par 2 ml d'eau distillée et filtré dans une fiole de 10 ml sur un filtre 42 sans cendres. La capsule est rincée avec de l'eau, le tout est refiltré et la fiole ajustée avec de l'eau.

Le plomb, le zinc et le cuivre sont dosés selon une méthode photométrique, à l'aide de kits commercialisés (respectivement 14833, 14566 et 14834, Merck). Toutes les teneurs en métaux mesurées sont dans l'intervalle d'acceptabilité du BCR. Les teneurs en plomb, zinc ou cuivre sont exprimées en µg par gramme de matière sèche.

VI. TRAITEMENTS STATISTIQUES

Chaque valeur est la moyenne de deux essais indépendants. L'homogénéité des variances a été vérifiée par le test de Hartley (n identiques) ou de Bartlett (n inégaux), à partir de variables transformées si nécessaire. Le test F de Snedecor a été effectué, afin de vérifier que l'exposition aux sols pollués avait un effet sur les lots exposés, les tests ANOVA de Dunnett (n égaux) ou de Bonferroni (n inégaux) ont été réalisés. Afin de mieux préciser le niveau de significativité de la différence entre deux lots, le test t de Student a parfois été utilisé.

Lors du regroupement de résultats obtenus par différentes séries d'expérimentation, les droites de régression ont été établies à partir des valeurs individuelles, modifiées de façon à ce que les différentes séries de mesures effectuées sur un même sol, mais menées indépendamment, puissent être traitées conjointement : la différence entre l'activité de base moyenne de chaque série et l'activité de base moyenne de toutes les séries se rapportant au même sol a été retranchée des activités individuelles de la série correspondante. Les analyses de régression ont été établies entre le logarithme du pourcentage de sol pollué dans la litière et le logarithme des activités individuelles ainsi recalculées, la transformation logarithmique permettant de rendre les variances additives. La régression a été testée avec le coefficient de régression r , à l'aide d'une table des coefficients de régression.

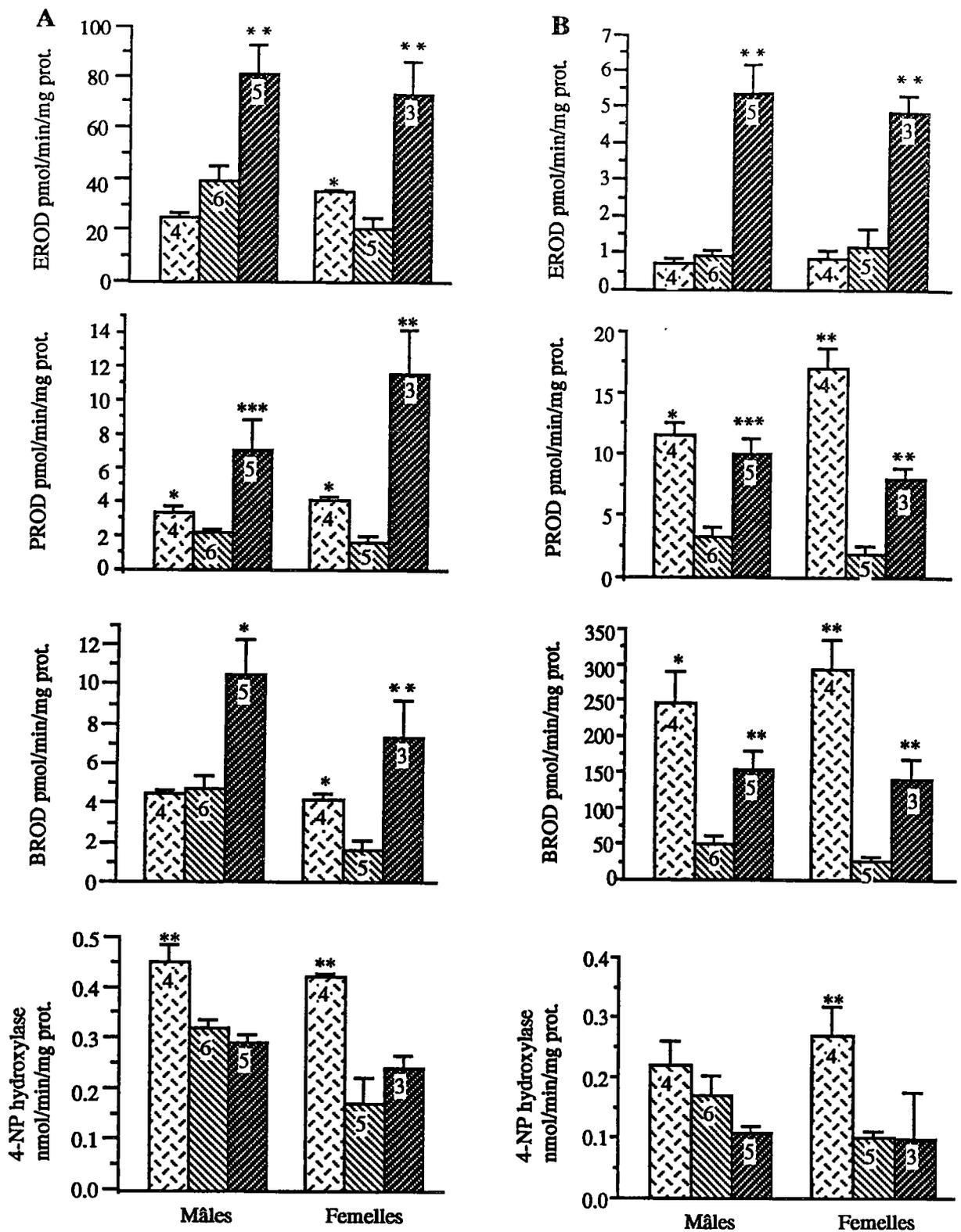


Figure 38 : Activités EROD, PROD, BROD et 4-NP hydroxylase hépatiques (A) et pulmonaires (B) mesurées chez des rats de laboratoire (□) et des rats sauvages capturés dans un terrarium (▨) ou sur le site pollué de Replonges (▩). Moyenne ± erreur type. Les astérisques *, ** et * représentent les différences significatives par rapport aux valeurs obtenues sur les rats du terrarium, avec $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$, respectivement (test *t* de Student). Les effectifs sont indiqués sur les histogrammes.**

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. MESURE DE BIOMARQUEURS ENZYMATIQUES CHEZ DES SURMULOTS CAPTURÉS SUR LE SITE DE REPLONGES

Cinq surmulots mâles et trois femelles ont été capturés dans la zone II du site pollué de Replonges. Les activités monooxygénases et les activités enzymatiques de défense contre le stress oxydant ont été mesurées chez ces animaux et comparées aux mêmes activités mesurées sur des surmulots élevés en semi-liberté capturés à la même période (figures 38 et 39). Les teneurs en cytochromes P-450 sont présentées dans le tableau 14. Les activités mesurées sur des rats de laboratoire sont présentées en parallèle.

I.1. Résultats

I.1.1. Activités monooxygénases et teneurs en cytochrome P-450

I.1.1.1. Activités monooxygénases

Les profils d'expression des activités monooxygénases dans le foie et le poumon du rat de laboratoire sont différents : l'activité EROD est plus fortement exprimée dans le foie (entre 20 et 40 pmol/min/mg prot.) que dans le poumon (de l'ordre de 1 pmol/min/mg prot.). Par contre, les activités PROD et BROD sont plus fortement exprimées dans le poumon que dans le foie. L'activité 4-NP hydroxylase hépatique est légèrement plus forte que l'activité pulmonaire.

Les activités monooxygénases hépatiques sont présentées sur la figure 38A. Les activités PROD et 4-NP hydroxylase mesurées chez les rats de laboratoire mâles sont supérieures à celles des surmulots élevés en semi-liberté. Chez les femelles, les quatre activités monooxygénases sont plus fortes chez les rats de laboratoire que chez les rats sauvages provenant du terrarium. Pour les deux sexes, les activités EROD, PROD et BROD sont significativement plus élevées chez les rats capturés sur le site pollué que chez les rats sauvages élevés en terrarium : ces activités sont respectivement induites 2, 3 et 2 fois chez les mâles et 3,5, 8 et 4,5 fois chez les femelles. On n'observe pas de différence d'activité 4-NP hydroxylase entre les deux groupes de rats sauvages, mâles ou femelles.

Pour les deux sexes, les activités EROD pulmonaires (figure 38B) mesurées chez les rats de laboratoire ou les rats sauvages capturés au terrarium ne sont pas différentes entre elles. Par contre, les activités PROD et BROD sont beaucoup plus élevées chez les rats de laboratoire mâles (respectivement 3,5 et 5 fois) et femelles (respectivement 9 et 11,6 fois). Ces activités, mesurées chez les rats provenant du site de Replonges, sont 3,5 à 5 fois supérieures à celles des rats du terrarium, mais sont plus faibles que celles des rats de laboratoire. L'activité 4-NP hydroxylase est plus élevée chez les rats de laboratoire femelles

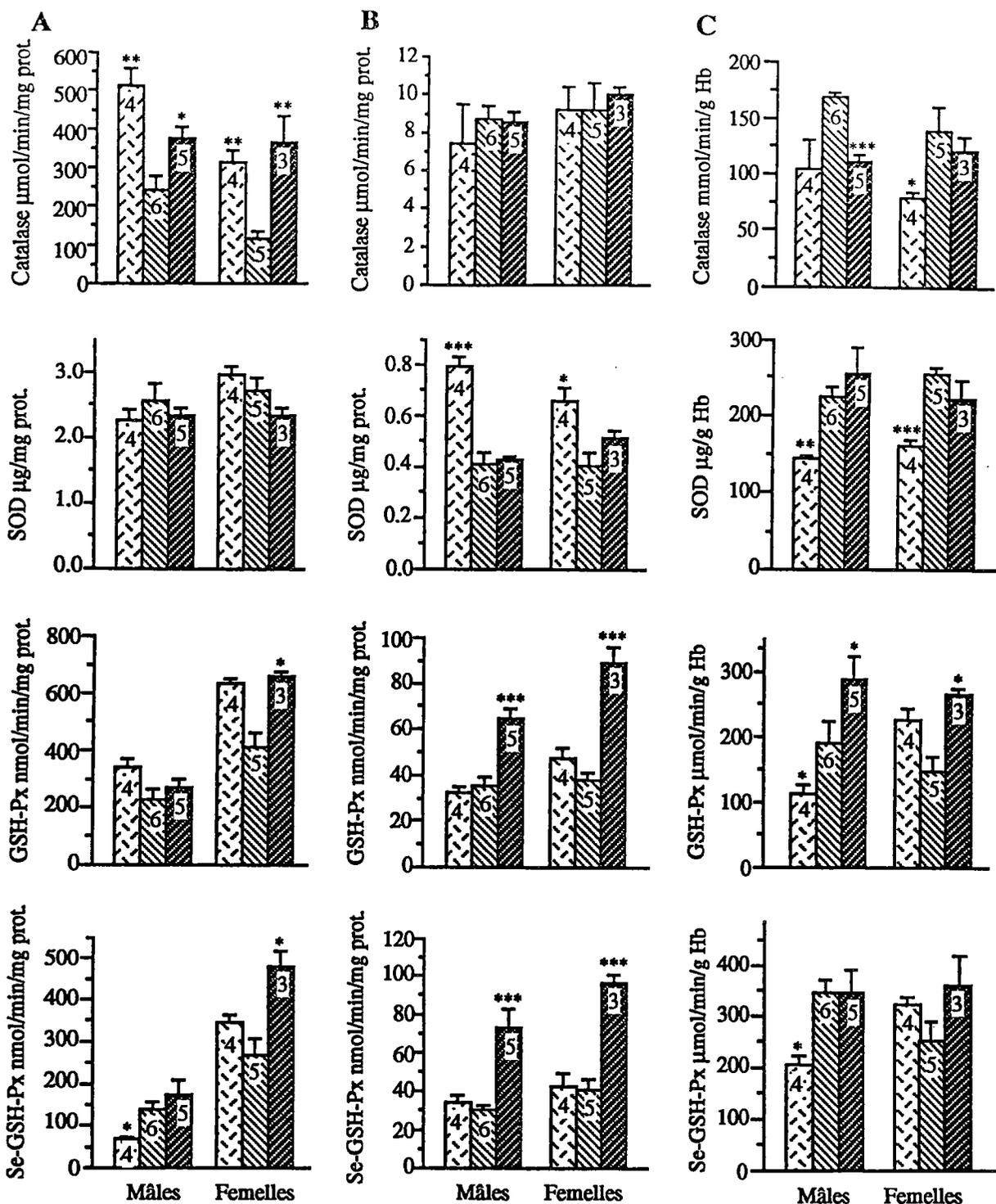


Figure 39 : Activités catalase, superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase (GSH-Px) et glutathion peroxydase séléno-dépendante (Se-GSH-Px) hépatiques (A), pulmonaires (B) et érythrocytaires (C) mesurées chez des rats de laboratoire (□) et des rats sauvages capturés dans un terrarium (▨) ou sur le site pollué de Replonges (▩). Moyenne ± erreur type. Les astérisques *, ** et *** représentent les différences significatives par rapport aux valeurs obtenues sur les rats du terrarium, avec $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$, respectivement (test de *t* de Student). Les effectifs sont indiqués sur les histogrammes.

que chez les rats du terrarium, mais aucune modification significative n'est observée chez les rats provenant du site pollué. Chez les mâles, rats de laboratoire et rats du site pollué ne présentent pas de différence d'activité 4-NP hydroxylase par rapport aux rats du terrarium.

L1.1.2. Teneurs en cytochrome P-450 total

Il n'existe pas de différences significatives entre les trois groupes de rats de sexe mâle (tableau 14) mais chez les femelles, la teneur en cytochrome P-450 hépatique des rats de laboratoire et des rats provenant du site pollué est supérieure à celle des rats du terrarium.

Tableau 14 : Teneurs en cytochrome P-450 mesurées sur les fractions microsomales hépatiques de rats de laboratoire SD et de rats sauvages capturés en terrarium ou sur le site de Replonges.

Sexe	Origine des rats	<i>n</i>	P-450
Mâles	Terrarium	6	0,72 ± 0,19
	Laboratoire	4	0,96 ± 0,13
	Site de Replonges	5	0,95 ± 0,21
Femelles	Terrarium	5	0,46 ± 0,12
	Laboratoire	4	0,75 ± 0,09 <i>a</i>
	Site de Replonges	3	0,88 ± 0,05 <i>a</i>

Moyenne ± écart type exprimée en nmol/mg de protéines.

a valeur significativement différente de celle obtenue avec le lot terrarium, test de Bonferroni, $p < 0,05$.

En résumé, les activités monooxygénases EROD, PROD et BROD hépatiques et pulmonaires sont augmentées de 2 à 3 fois chez les surmulots mâles et de 3,5 à 8 fois chez les femelles capturés sur le site, si on les compare aux activités mesurées chez des surmulots de référence élevés en semi-liberté et non exposés à des polluants. L'activité 4-NP hydroxylase n'est pas modifiée par l'exposition au sol pollué de Replonges. La teneur en cytochrome P-450 hépatique mesurée chez les mâles n'est pas différente de celle mesurée sur les surmulots de référence ; chez les femelles, la teneur en cytochrome P-450 des rats de référence est particulièrement faible, ce qui explique qu'elle soit différente des teneurs mesurées chez des rats de laboratoire ou chez les surmulots capturés sur le site.

L1.2. Activités des enzymes de défense contre le stress oxydant

Les activités de plusieurs enzymes antioxydantes sont présentées sur la figure 39. Ces activités ne présentent pas de profil caractéristique d'induction ou d'inhibition. Quelques différences significatives existent entre les rats de laboratoire et les rats sauvages du terrarium : les activités catalase hépatique (figure 39A) et superoxyde dismutase pulmonaire (figure 39B) sont plus fortes chez les rats de laboratoire des deux sexes. Les activités Se-GSH-Px hépatique (figure 39A) et érythrocytaire, les activités GSH-Px et SOD

érythrocytaires (figure 39C) sont plus faibles chez les rats de laboratoire mâles que chez les rats du terrarium. Les activités SOD et catalase érythrocytaires sont plus faibles chez les rats de laboratoire femelles que chez les rats du terrarium du même sexe. L'activité catalase hépatique mesurée chez les rats provenant du site est 1,5 et 3 fois plus élevée que chez les rats du terrarium (respectivement mâles et femelles) ; l'activité catalase érythrocytaire des mâles est plus faible d'environ 30%. L'activité GSH-Px est augmentée d'un facteur 1,1 à 2 dans tous les organes pour les deux sexes, à l'exception de l'activité hépatique des mâles qui n'est pas modifiée. L'activité Se-GSH-Px hépatique est augmentée chez les femelles et l'activité pulmonaire est augmentée chez les deux sexes (1,5 à 2,2 fois).

Les activités des enzymes antioxydantes ne suivent donc pas de profil d'induction ou d'inhibition net chez les rats capturés sur le site. Seules l'activité catalase hépatique et les activités glutathion peroxydases pulmonaires sont significativement augmentées chez les mâles et les femelles.

I.2. Discussion

Il nous a été impossible de capturer des surmulots sur un site de référence présentant des caractéristiques voisines du site pollué et nous avons dû pallier ce manque par l'utilisation de rats de laboratoire et de rats sauvages élevés en semi-liberté. Nos résultats de terrain ont montré que les activités EROD, PROD et BROD hépatiques et EROD pulmonaires sont significativement induites chez des rongeurs vivant sur le site contaminé de Replonges, mais la relation entre le niveau de contamination du sol et le degré d'induction des cytochromes P450 dans les organes des animaux exposés est difficile à établir. En effet, les relations entre la dose, la durée d'exposition, et le niveau et la durée de l'induction sont complexes et dépendent de l'espèce (Lubet *et al.*, 1991 ; Dragnev *et al.*, 1994) et du caractère multiple des pollutions susceptible de générer des interactions synergiques ou antagonistes entre les différents polluants.

Quelques interactions de ce type ont pu être caractérisées expérimentalement. Par exemple, le métabolisme de la TCDD au niveau hépatique peut être ralenti par la présence simultanée d'autres polluants organiques qui entrent en compétition au niveau métabolique ou qui augmentent la quantité de CYP1A2 qui servent de protéines de stockage à la TCDD et à certains PCB (Nessel *et al.*, 1992). Bien qu'il n'ait aucune affinité pour le récepteur Ah, le congénère hexaCB #153 a : a) un effet synergique sur l'induction de la synthèse *de novo* de ce récepteur, lorsqu'il est coadministré avec de l'Aroclor 1254[®] ou de la 2,3,7,8-TCDD (1 nmol/kg), et sur la capacité d'induction de l'activité EROD hépatique du congénère #156 (inducteur mixte), mais pas du congénère #169, inducteur de CYP1A1 et b) un effet antagoniste de l'activité promotrice du #138 (liée à son affinité pour le récepteur Ah) et de l'activité immunotoxique, tératogène et biochimique de la 2,3,7,8-TCDD (De Jongh *et al.*,

1993) . Des effets synergiques sont aussi observés entre les tétraCB #52 (2,2',5,5'-CB) et #77 (3,3',4,4'-CB) sur la promotion de lésions néoplastiques hépatiques (revue par Safe, 1994).

L'induction des activités monooxygénases hépatiques à cytochrome P-450 est généralement mesurée après administration par voie orale ou injection intrapéritonéale de solutions pures. Chez des rongeurs de laboratoire, l'administration i.p. d'une seule dose de composés tels que certains HAP, l'Aroclor 1254[®], la 2,3,7,8-TCDD ou la β -naphthoflavone multiplie l'activité EROD hépatique d'un facteur 10 à 150 (Burke *et al.*, 1985). Sur le terrain, les conditions sont très différentes, puisque l'on a affaire à des mélanges de polluants plus ou moins biodisponibles et à un mode d'exposition mal connu et très variable (ingestion, contact, inhalation...). Le taux d'induction de l'activité EROD observé lors d'études de terrain ne dépasse pas 1,5 et 8 fois. Des souris sauvages (*Reithrodontomys fulvescens*) capturées sur un site contaminé par des PCB montrent des activités deux à trois fois supérieures à celles de souris provenant d'un site non contaminé (Lubet *et al.*, 1992) alors que des campagnols (*Microtus arvalis*) provenant d'un site contaminé par des dioxines (PCDD/PCDF) ont des activités EROD augmentées de seulement 1,5 à 2,1 fois (Schrenk *et al.*, 1991). Les deux activités PROD et BROD spécifiques des isozymes CYP2B ont été moins couramment utilisées dans ce type d'étude. Elangbam *et al.* (1991b) ont mis en évidence des différences significatives des activités EROD, PROD et BROD mesurées sur des rats (*Sigmodon hispidus*) vivant sur une décharge contaminée par des produits toxiques ; selon les travaux de Dickerson *et al.* (1994), l'activité EROD hépatique des souris capturées sur un site contaminé par des HAP (57 ppm de naphthalène) est augmentée 1,5 fois, alors que l'activité PROD n'est pas significativement modifiée. Cependant, les activités EROD et PROD hépatiques de mulots (*Apodemus flavicollis*) provenant d'une zone urbaine industrielle sont supérieures à celles mesurées chez des mulots provenant d'une zone non industrielle (Bhatia *et al.*, 1994). Nos résultats sont en accord avec ces différentes études, puisque nous avons pu observer l'induction des activités EROD, PROD et BROD hépatiques (x 2 à 8) chez les surmulots capturés sur le site de Replonges.

Sur ces mêmes animaux, nous avons mis en évidence la réponse d'activités cytochrome P-450 dépendantes dans le poumon. Le niveau des activités monooxygénases que nous avons mesuré chez les rats de laboratoire est analogue aux valeurs trouvées dans la littérature et reflète l'activité constitutive de différentes formes de cytochromes P-450 pulmonaires. Nos résultats montrent que l'activité EROD pulmonaire est induite 3 à 4,5 fois chez des rats sauvages vivant sur un site contaminé par divers polluants inducteurs de cytochrome P-450. Cela confirme les résultats de Beebe *et al.* (1992) qui ont montré expérimentalement que l'activité EROD pulmonaire était plus fortement induite que l'activité hépatique chez des souris traitées par une seule dose d'Aroclor 1254[®]. Par contre, l'administration orale (dans la nourriture) de faibles doses de 2,3,7,8-TCDD (1,5 à 150 ng/kg/jour pendant 65 jours) à des souris entraîne l'augmentation des activités EROD hépatiques et pulmonaires, respectivement 87,9 et 39,5 fois (De Vito *et al.*, 1994). Les

polluants inducteurs présents dans le sol du site de Replonges sont biodisponibles dans le poumon, par exposition directe (inhalation) ou indirecte (par la voie sanguine). L'activité EROD pulmonaire est un biomarqueur d'exposition plus sensible que l'activité hépatique.

La teneur en cytochrome P-450 hépatique n'est pas modifiée chez les rats de sexe mâles et les résultats obtenus chez les femelles sont assez ambigus. Sur le terrain, il est rare que la teneur en cytochrome P-450 soit modifiée de manière significative (Elangbam *et al.*, 1991b).

Les radicaux oxygénés peuvent être produits dans l'organisme par le fonctionnement de certaines isoformes de cytochrome P-450, comme les CYP2B et CYP2E1 ; la plupart des études portent sur le rôle de l'induction du CYP2E1 par l'éthanol, la peroxydation lipidique et les pathologies du foie (Kappus, 1985). Les seules études écotoxicologiques portant sur le stress oxydant ont été effectuées dans le domaine aquatique (Babo & Vasseur, 1992). Nous avons montré ici que l'expression du CYP2E1 (mesurée par l'activité 4-NP hydroxylase) et les activités antioxydantes n'étaient pas modifiées chez les rats capturés sur le site pollué de Replonges mais il est possible que des radicaux libres soient générés par d'autres processus.

Les inconvénients présentés par l'étude de terrain (exposition non contrôlée, difficulté de capture, proximité du site...) nous ont conduits à mettre au point une nouvelle méthodologie d'exposition de rats à des sols pollués au laboratoire sans administration forcée.

Warsi/.

II. MESURE DE BIOMARQUEURS ENZYMATIQUES CHEZ DES RATS EXPOSÉS À DIFFÉRENTES LITIÈRES DE SOLS

II.1. Exposition à des sols non contaminés : activités monooxygénases

II.1.1. Résultats

Les activités alkoxyrésorufine *O*-désalkylases mesurées chez les rats exposés pendant trois jours à une litière de sciure ou de sol S0 ne sont pas différentes de celles mesurées sur une litière de sol ISO, à l'exception de l'activité PROD pulmonaire du lot sciure (tableau 15).

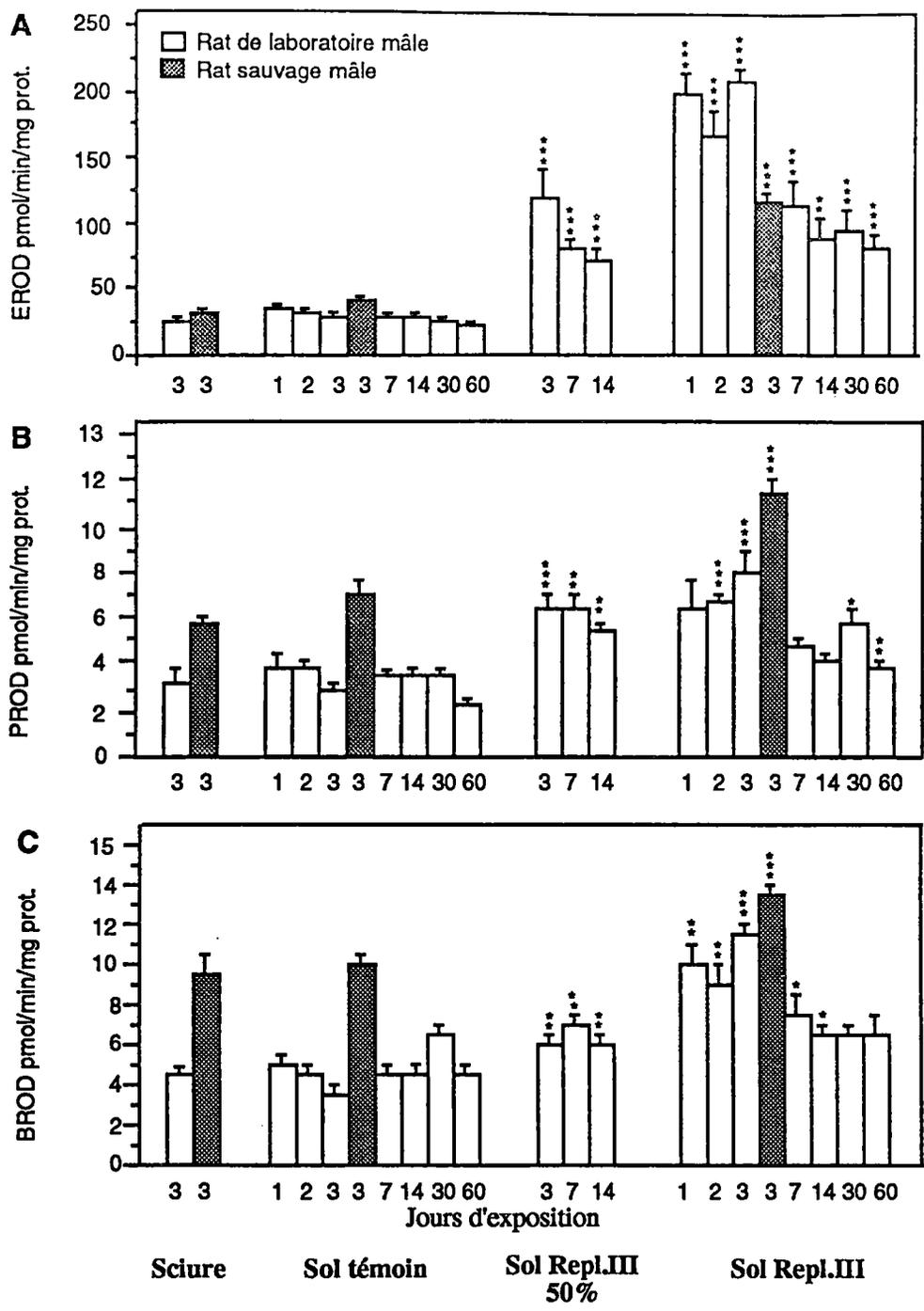


Figure 40 : Activités EROD (A), PROD (B) et BROD (C) hépatiques mesurées sur les fractions microsomales de rats de laboratoire (□) ou de rats sauvages (■) mâles en fonction de la durée de leur exposition à une litière composée de sciure ou de différents sols prélevés à Replonges. Activités moyennes ± erreur type. Les astérisques *, ** et * représentent les valeurs significativement différentes des valeurs obtenues avec le sol témoin, avec $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$, respectivement (test t de Student). Pour chaque lot de rats de laboratoire, $n = 4$; pour les rats sauvages, $n = 5$ (sciure), $n = 9$ (sol témoin) ou $n = 8$ (sol Repl.III).**

Faire
 O →

Tableau 15 : Activités EROD, PROD et BROD mesurées sur les fractions microsomales hépatiques et pulmonaires de rats SD mâles exposés durant 88 ± 2 h à des litières non contaminées.

Organe	Litière	n	EROD	PROD	BROD
Foie	ISO	4	26,6 ± 5,42	2,9 ± 0,85	4,3 ± 0,66
	Sciure	4	26,5 ± 4,33	3,4 ± 0,76	4,6 ± 0,34
	S0	4	27,8 ± 3,22	3,0 ± 0,08	4,7 ± 0,52
Poumon	ISO	4	0,66 ± 0,31	7,3 ± 1,09	155 ± 19,80
	Sciure	4	0,73 ± 0,24	11,5 ± 2,90 <i>a</i>	247 ± 89,50
	S0	4	0,39 ± 0,16	5,9 ± 1,61	117 ± 9,97

Activités moyennes exprimées en pmol/min/mg de protéines ± écart type.

a Moyenne significativement différente de la valeur obtenue sur le sol ISO, $p < 0,05$, test *t* de Student.

II.1.2. Discussion

La tourbe pouvant contenir des composés inducteurs (Kopponen *et al.*, 1993), nous avons préféré vérifier que le sol ISO n'avait pas de capacité inductrice. D'une manière générale, les sols ISO et S0 ne provoquent pas de modification significative des activités monooxygénases hépatiques et pulmonaires et pourront être utilisés comme sol témoin et/ou matrice de dilution.

II.2. Exposition au sol pollué Repl.III : activités monooxygénases et activités antioxydantes

II.2.1. Résultats

II.2.1.1. Mise au point du protocole d'exposition en laboratoire

La mise au point de ce nouveau protocole a été réalisée en utilisant les deux sols prélevés à Replonges, à savoir le sol témoin et le sol contaminé Repl.III (décrits dans le tableau 10). Des rats de laboratoire ont été exposés à une litière de sol témoin ou de sol pollué Repl.III dilué avec le sol témoin ou non dilué, pendant une durée variable (de 1 à 60 jours). Les inductions parfois exprimées en "taux d'induction" correspondent au rapport "activité moyenne mesurée sur sol pollué/activité moyenne mesurée sur litière de sol témoin".

Les activités EROD, PROD et BROD hépatiques et pulmonaires mesurées chez les rats exposés au sol témoin pendant trois jours ne sont pas différentes des activités mesurées chez des rats maintenus sur une litière de sciure, pour les mâles (figures 40 et 41) comme pour les femelles (figure 42). Ces activités ne sont pas significativement modifiées jusqu'à 60 jours d'exposition au sol témoin. Le sol témoin ne provoque pas davantage de modification des activités enzymatiques de défense contre le stress oxydant, mesurées sur les fractions

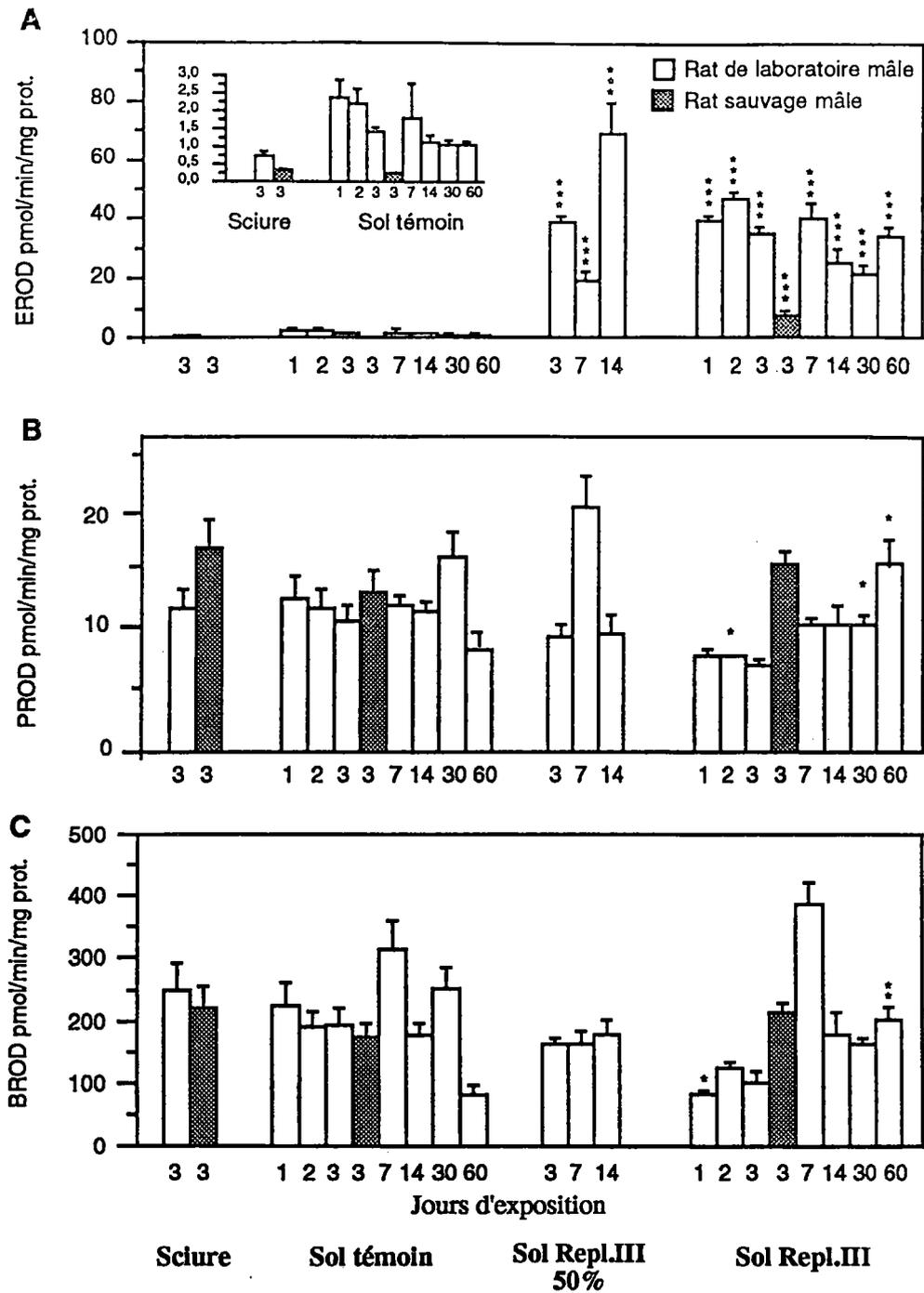


Figure 41 : Activités EROD (A), PROD (B) et BROD (C) pulmonaires mesurées sur les fractions microsomales de rats de laboratoire (□) ou de rats sauvages (▨) mâles en fonction de la durée de leur exposition à une litière composée de sciure ou de différents sols prélevés à Replonges. Activités moyennes \pm erreur type. Les astérisques *, ** et * représentent les valeurs significativement différentes des valeurs obtenues avec le sol témoin, avec $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$ respectivement (test *t* de Student). Pour chaque lot de rats de laboratoire, $n = 4$; pour les rats sauvages, $n = 5$ (sciure), $n = 9$ (sol témoin) ou $n = 8$ (sol Repl.III).**

pulmonaire
0 9

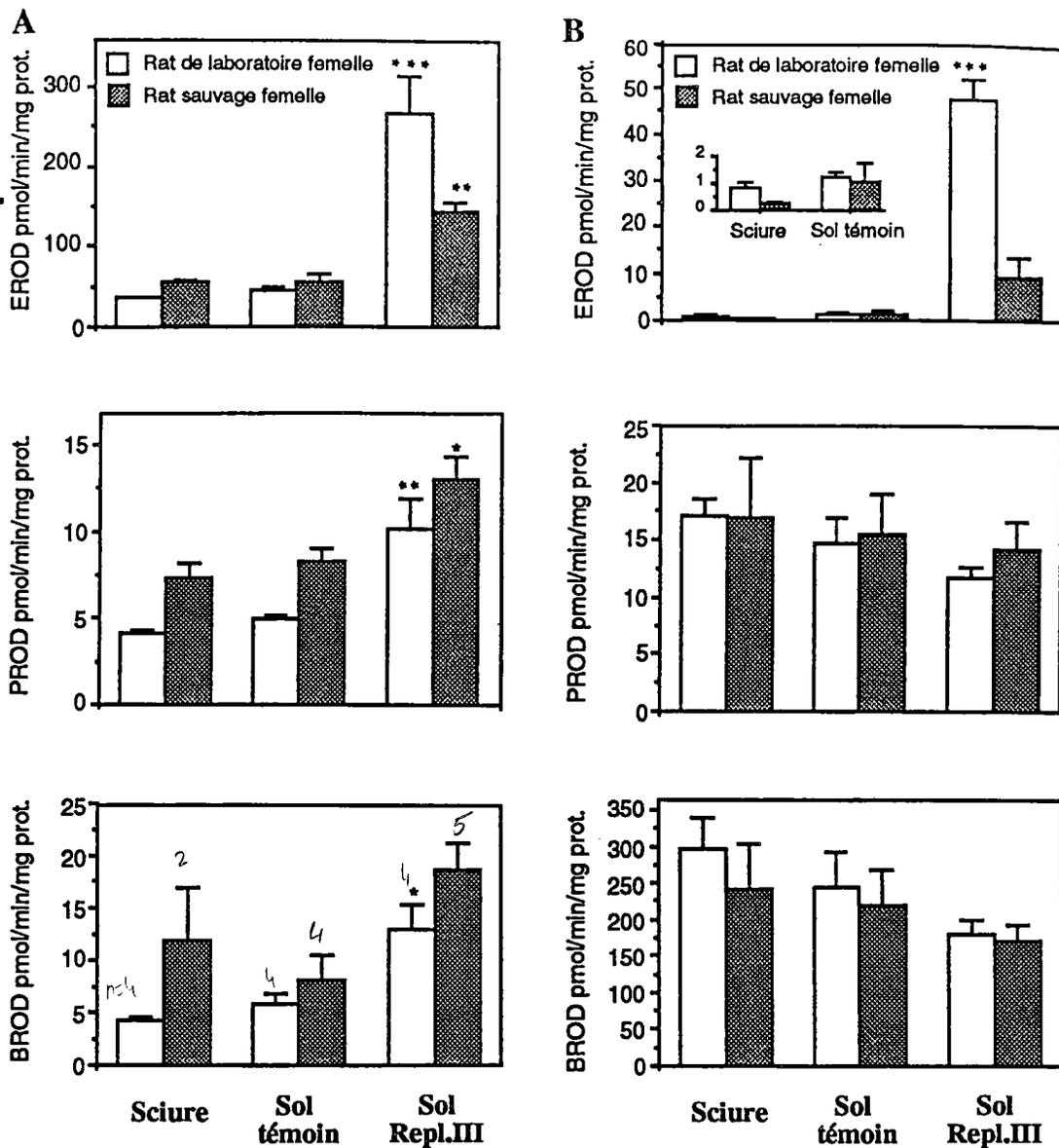


Figure 42 : Activités EROD, PROD et BROD hépatiques (A) et pulmonaires (B) mesurées sur les fractions microsomales de rats de laboratoire (□) ou de rats sauvages (▨) femelles après trois jours d'exposition à une litière composée de sciure, de sol témoin ou de sol contaminé Repl.III. Activités moyennes ± erreur type. Les astérisques *, ** et * représentent les valeurs significativement différentes des valeurs obtenues avec le sol témoin, avec $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$ respectivement (test t de Student). Pour chaque lot de rats de laboratoire, $n = 4$; pour les rats sauvages, $n = 2$ (sciure), $n = 4$ (sol témoin) ou $n = 5$ (sol Repl.III).**

♀
3 sciure exposés

Foie

n=2 à 5

Poumon

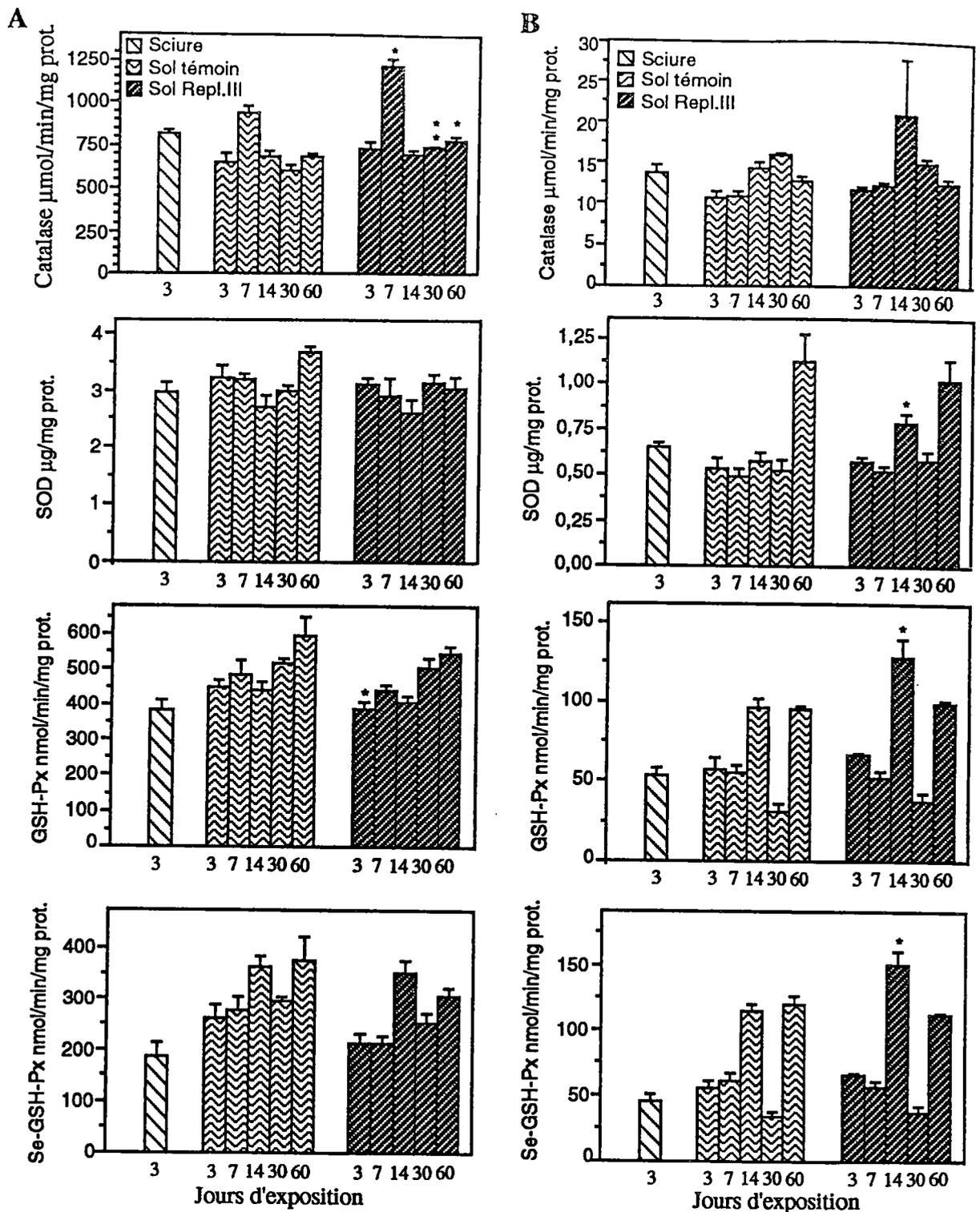


Figure 43 : Activités catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase et glutathion peroxydase séléno-dépendante hépatiques (A) et pulmonaires (B), mesurées dans les fractions cytosoliques de rats de laboratoire SD mâles, en fonction de la durée de leur exposition à des litières composées de sciure (▨), de sol témoin (▩) ou de sol Repl.III (▧). Activités moyennes \pm erreur type. Les astérisques * et ** représentent les valeurs significativement différentes de celles obtenues avec le sol témoin, avec $p < 0,05$ et $p < 0,01$, respectivement (test *t* de Student). $N = 4$ rats par lot.

cytosoliques de foie et de poumon chez des rats de sexe mâle exposés durant trois jours (figure 43).

L'exposition de rats de laboratoire mâles au sol pollué Repl.III provoque une induction significative de l'activité EROD hépatique (figure 40A) : une exposition d'un jour suffit à induire cette activité d'un facteur 5,5. L'induction maximale est obtenue après une exposition de trois jours (taux d'induction de 7) puis elle diminue progressivement au cours du temps d'exposition. Au soixantième jour d'exposition, l'activité EROD est encore significativement induite (activité 4 fois plus élevée que celle du témoin correspondant). Chez les femelles, l'activité EROD est induite dans les mêmes proportions que chez les mâles (taux d'induction = 6), après une exposition de trois jours (figure 42A). L'induction de l'activité EROD hépatique est dose-dépendante, comme le montre le taux d'induction ($\times 4,5$) observé chez les rats exposés au sol Repl.III dilué à 50% pendant trois jours (figure 40A). Les activités PROD et BROD hépatiques évoluent d'une façon similaire en fonction de la durée d'exposition (figures 40B et 40C). Leur induction est également maximale après trois jours d'exposition, puis leur activité décroît et rejoint l'activité de base, bien que les rats soient encore maintenus sur le sol pollué. Cependant, ces deux activités sont moins fortement induites que l'activité EROD, puisque leurs taux d'induction maximale sont de 1,7 et 3 (PROD et BROD respectivement). L'activité BROD montre, à l'instar de l'activité PROD, une relation dose-réponse (figure 40C).

L'activité EROD pulmonaire est très fortement induite (de 16 à 28 fois) chez les rats de laboratoire mâles exposés au sol Repl.III durant un à trois jours, respectivement (figure 41A). L'activité induite est stable au cours du temps, puisqu'elle est encore de 21 et 33 fois supérieure au témoin au 30^{ème} et au 60^{ème} jours d'exposition (respectivement). Chez la femelle, l'activité est multipliée par 38 après une exposition de trois jours (figure 42B). L'activité EROD pulmonaire ne montre pas de relation dose-réponse chez les mâles (figure 41A). Les activités PROD et BROD pulmonaires ne sont pas modifiées lors de l'exposition au sol pollué, à l'exception d'une légère inhibition aux deuxième et trentième jours (PROD) et au premier jour BROD), et d'une induction au soixantième jour (figures 41B et 41C). Chez les femelles, ces activités ne sont pas significativement modifiées au troisième jour d'exposition (figure 42B).

Les activités enzymatiques hépatiques et pulmonaires de défense contre le stress oxydant, mesurées chez les rats de laboratoire de sexe mâle, ne sont pas très sensibles à l'exposition au sol pollué (figures 43A et 43B). On observe seulement une légère augmentation de l'activité catalase hépatique à 7, 30 et 60 jours, des activités SOD, GSH-Px et Se-GSH-Px pulmonaires à 14 jours et une inhibition de l'activité GSH-Px hépatique à 3 jours.

En résumé, les activités monooxygénases EROD, PROD et BROD hépatiques et EROD pulmonaires mesurées sur des rats de laboratoire exposés pendant une durée variable au sol

Repl.III sont induites dès le premier jour, avec un maximum d'induction au troisième jour d'exposition. L'activité EROD pulmonaire est induite plus fortement et plus durablement que l'activité EROD hépatique. Les activités antioxydantes mesurées dans le foie, le poumon ou le sang ne montrent pas de modification significative même après une exposition de longue durée (2 mois).

II.2.1.2. Comparaison des activités monooxygénases des rats de laboratoire et des rats d'origine sauvage

Des rats sauvages élevés en laboratoire ont été exposés à des litières de sciure, de sol témoin et de sol Repl.III. Les rats sauvages des deux sexes ont des activités EROD hépatiques de base similaires aux activités mesurées chez les rats de laboratoire (figures 40A et 42A). Par contre les activités PROD et BROD sont 1,5 à 2 fois plus élevées chez les rats sauvages mâles (figures 40B et 40C). Chez les femelles, la différence entre les deux groupes de rats est moins marquée (figure 42A). L'exposition des rats sauvages au sol pollué Repl.III durant trois jours provoque l'induction de ces trois activités hépatiques, parfois dans des proportions différentes de celles des rats de laboratoire : ainsi, les activités EROD (mâles et femelles) et BROD (mâles) sont deux fois moins fortement induites ($\times 2,8$, $\times 2,6$ et $\times 1,4$ respectivement).

L'activité EROD pulmonaire de base est plus faible chez les rats sauvages des deux sexes que chez les rats de laboratoire. Alors que cette activité est autant induite chez le rat sauvage que chez le rat de laboratoire mâle (environ 30 fois, figure 41A), les rats sauvages femelles montrent une réponse beaucoup plus faible (induction $\times 8,5$ seulement, soit 4 fois moins que la souche de laboratoire ; figure 42B). Comme pour les rats de laboratoire, les activités PROD et BROD des rats sauvages ne sont pas significativement modifiées par l'exposition au sol pollué pendant trois jours (mâles et femelles).

II.2.1.3. Activités monooxygénases : mise en évidence d'une relation dose-réponse

La dilution au 1/2 du sol Repl.III avec le sol témoin avait mis en évidence l'existence d'une relation dose-réponse pour les activités hépatiques et l'activité EROD pulmonaire. Afin d'étudier plus en détail la relation dose-réponse, des rats de laboratoire ont été exposés pendant trois jours et une nuit à des litières de sol artificiel ISO (lot témoin) ou des litières composées de sol Repl.III dilué avec le sol ISO ou non dilué. Les résultats sont présentés dans les tableaux 16 et 17.

L'activité EROD hépatique est induite 3,7 fois lors de l'exposition des rats au sol Repl.III non dilué (tableau 16) ; elle n'est plus significativement induite à partir de la dilution au 1/32^{ème}. Les activités PROD et BROD sont significativement induites ($\times 2,6$ et $\times 1,5$ respectivement), mais moins fortement que l'activité EROD obtenue avec le sol non dilué. Comme pour l'activité EROD, la dernière dilution provoquant encore l'induction significative

de l'activité PROD est le 1/32^{ème}, mais l'activité BROD n'est déjà plus significativement induite par la dilution au 1/8^{ème}.

Tableau 16 : Activités EROD, PROD et BROD mesurées sur les fractions microsomales hépatiques de rats mâles SD exposés durant 88 ± 2 h au sol Repl.III dilué ou non avec le sol ISO.

Repl. III Litière	EROD		PROD		BROD	
	Activité (1)	Ind (2)	Activité (1)	Ind (2)	Activité (1)	Ind (2)
ISO	24,97 ± 4,74	-	2,21 ± 0,74	-	4,29 ± 1,33	-
Repl.III/32	30,05 ± 2,61	1,2	3,29 ± 0,71	1,5	4,47 ± 1,12	1,0
Repl.III/16	39,59 ± 3,16	<i>a</i> 1,6	3,75 ± 0,65	<i>a</i> 1,7	5,25 ± 1,28	1,2
Repl.III/8	35,95 ± 6,18	<i>a</i> 1,4	3,22 ± 0,50	<i>a</i> 1,5	4,97 ± 0,79	1,2
Repl.III/4	55,24 ± 10,64	<i>a</i> 2,2	3,87 ± 1,51	<i>a</i> 1,8	6,12 ± 1,10	<i>a</i> 1,4
Repl.III/2	69,51 ± 14,90	<i>a</i> 2,8	6,19 ± 0,32	<i>a</i> 2,8	7,07 ± 0,99	<i>a</i> 1,7
Repl.III	91,86 ± 16,25	<i>a</i> 3,7	5,78 ± 0,87	<i>a</i> 2,6	6,28 ± 1,10	<i>a</i> 1,5

(1) Activité exprimée en pmol/min/mg de protéines ± écart type.

(2) Taux d'induction = activité moyenne mesurée sur sol Repl.III dilué ou non/activité moyenne mesurée sur sol ISO.

a Activité moyenne significativement différente de la valeur obtenue avec le sol ISO, test de Dunnett, *p*<0,05.

Le sol Repl.III non dilué provoque l'induction de l'activité EROD pulmonaire d'un facteur 26 (tableau 17). L'activité EROD est encore significativement induite par la plus forte dilution testée (1/32). L'exposition au sol non dilué ou dilué au 1/2 ne provoque aucune modification significative des activités PROD et BROD pulmonaires (tableau 17).

Tableau 17 : Activités EROD, PROD et BROD mesurées sur les fractions microsomales pulmonaires de rats mâles SD exposés durant 88 ± 2 h au sol Repl.III dilué ou non avec le sol ISO.

Repl. III Litière	EROD		PROD		BROD	
	Activité (1)	Ind (2)	Activité (1)	Ind (2)	Activité (1)	Ind (2)
ISO	1,11 ± 0,31	-	7,29 ± 0,85	-	141,01 ± 11,2	-
Repl.III/32	5,73 ± 2,91	<i>a</i> 5,2	3,89 ± 0,60	<i>a</i> 0,5	91,91 ± 18,3	<i>a</i> 0,7
Repl.III/16	9,73 ± 1,76	<i>a</i> 8,8	14,11 ± 2,70	<i>a</i> 1,9	171,95 ± 10,5	1,2
Repl.III/8	7,92 ± 2,34	<i>a</i> 7,1	6,08 ± 2,45	0,8	143,95 ± 28,6	1,0
Repl.III/4	12,94 ± 2,17	<i>a</i> 11,6	3,31 ± 0,60	<i>a</i> 0,5	110,32 ± 22,7	0,8
Repl.III/2	15,42 ± 3,68	<i>a</i> 13,9	5,81 ± 2,28	0,8	109,51 ± 44,3	0,8
Repl.III	28,67 ± 3,39	<i>a</i> 25,8	6,97 ± 1,57	1,0	124,68 ± 24,3	0,9

1) Activité exprimée en pmol/min/mg de protéines ± écart type.

(2) Taux d'induction = activité moyenne mesurée sur sol Repl.III dilué ou non/activité moyenne mesurée sur sol ISO.

a Activité moyenne significativement différente de la valeur obtenue avec le sol ISO, test de Dunnett, *p*<0,05.

Le logarithme des activités EROD hépatiques et pulmonaires, PROD et BROD hépatiques est fortement corrélé (*p*<0,001) au logarithme du pourcentage de sol Repl.III dans

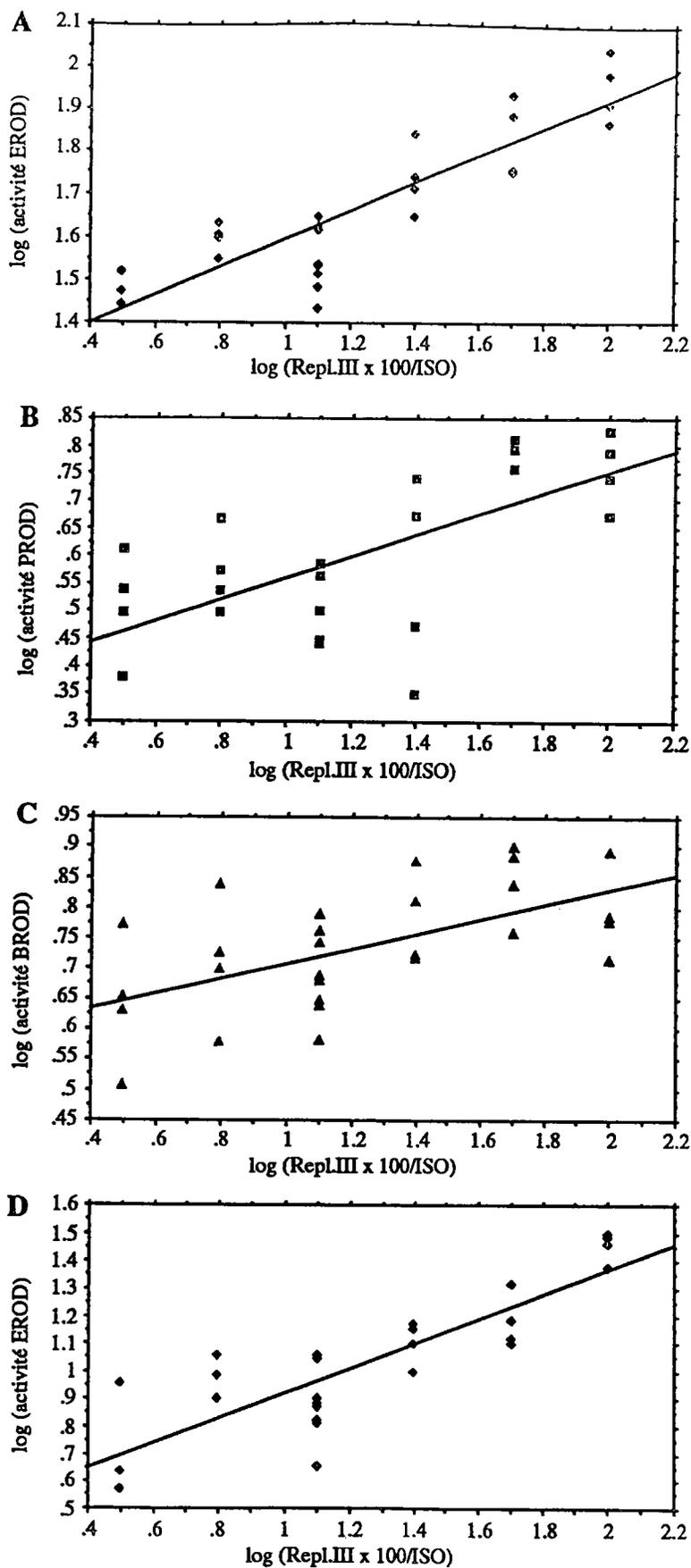


Figure 44 : Corrélations entre le logarithme des activités EROD (A), PROD (B), BROD (C) hépatiques et EROD (D) pulmonaire et le logarithme du pourcentage de sol pollué Repl. III présent dans la litière de sol ISO. Activités mesurées sur les fractions microsomales de rats de laboratoire mâles exposés à différentes litières pendant 88 ± 2 heures. $N = 26$. Coefficients de détermination, r^2 : 0,769 (A), 0,438 (B), 0,351 (C), 0,719 (D), avec $p < 0,001$.

la litière de sol ISO (figure 44). Avec les activités PROD et BROD pulmonaires, la corrélation n'est pas significative.

II.2.2. Discussion

La réussite d'une étude de terrain dépend en premier lieu de la capture d'un nombre suffisant d'animaux sur le site contaminé et sur le site de référence afin que les résultats soient statistiquement exploitables : si certains auteurs ont réussi à capturer plusieurs dizaines d'animaux, d'autres se sont contentés de quelques individus (moins d'une dizaine de même sexe et de même espèce ; Decat *et al.*, 1985 ; Batty *et al.*, 1990 ; Elangbam *et al.*, 1991b ; Lubet *et al.* 1992 ; Pascoe *et al.*, 1994). L'utilisation d'animaux engagés pallie cet inconvénient : Dickerson *et al.* (1994) ont engagé des campagnols (le nombre d'animaux n'a pas été précisé) pendant 7 jours sur un site contaminé par des HAP (naphtalène). Les auteurs ont observé une induction de l'activité EROD d'un facteur 7. A notre connaissance, il n'existe pas d'autres mesures d'activités monooxygénases chez des petits mammifères terrestres engagés.

Nous avons donc voulu développer une autre approche présentant les avantages d'une exposition par des voies naturelles mais dans des conditions contrôlées. Nos résultats montrent que l'exposition de rats de laboratoire au sol contaminé de Replonges (contenant essentiellement des HAP et des hydrocarbures lourds) induit ou inhibe plusieurs activités alkoxyrésorufine *O*-désalkylases hépatiques et pulmonaires. Ces résultats confirment ceux obtenus lors de l'étude de terrain. L'exposition des rats au sol témoin, prélevé à proximité du site, ne provoque pas de modification des activités de base, bien que ce sol soit légèrement contaminé par des HAP (cf. tableau 10). L'induction des activités EROD, PROD et BROD hépatiques et EROD pulmonaire se manifeste dès le premier jour d'exposition, ce qui montre la biodisponibilité très rapide des polluants. L'induction faible, mais significative, des activités PROD et BROD hépatiques a été mise en évidence dans quelques études de terrain (Elangbam *et al.*, 1991b ; Bhatia *et al.*, 1994). Il peut s'agir d'un phénomène marginal dû à l'induction du CYP1A1 (Burke *et al.*, 1985 ; De Jongh *et al.*, 1993) ou à la présence d'inducteurs de CYP2B (Lubet *et al.*, 1990). L'activité BROD est plus sensible à l'induction des CYP1A que l'activité PROD, plus spécifique des CYP2B (Ayrton *et al.*, 1990). Cependant, ces activités sont toujours moins induites que l'activité EROD, même dans des conditions d'induction optimales (Lubet *et al.*, 1990). Les activités PROD et BROD pulmonaires, inhibées par les inducteurs de CYP1A hépatiques (Beebe *et al.*, 1995), ne peuvent pas être utilisées comme biomarqueur d'exposition.

Le degré d'induction des différentes activités est plus faible chez les rats sauvages que chez les rats de laboratoire. Ce résultat n'est pas très surprenant, puisqu'il a été établi qu'il existe des différences de sensibilité importantes liées à la souche de rats ou de souris (Rampersaud & Waltz, 1987). L'induction est également plus faible chez les femelles que

chez les mâles ; des différences de sensibilité liées au sexe avaient déjà été remarquées lors d'études expérimentales (Vodicnick *et al.*, 1981) ou de terrain (Elangbam *et al.*, 1991b ; Henneman *et al.*, 1994).

Les rats que nous avons exposés au sol Repl.III montrent une induction de l'activité EROD plus forte et plus persistante dans le poumon que dans le foie. Le même phénomène avait été observé par Beebe et ses collaborateurs, bien que la dose, la voie d'exposition et la nature des agents inducteurs aient été différentes : à faible dose (100 mg/kg d'Aroclor 1254[®], i.p.), l'induction du CYP1A1 pulmonaire (x 30) était nettement plus sensible que l'induction hépatique (x 2) mais elle était du même ordre à forte dose (x 40-45 avec 500 mg/kg ; Beebe *et al.*, 1992) ; la même observation avait été faite avec la 2,3,7,8-TCDD (5 et 50 nmol/kg ; Beebe *et al.*, 1990). L'activité EROD pulmonaire est particulièrement sensible aux inducteurs de CYP1A1, ce qui en fait un excellent biomarqueur d'exposition.

La réponse des activités monooxygénases dépend de la durée d'exposition. Contrairement aux résultats expérimentaux obtenus après une exposition par voie orale à de faibles doses d'Aroclor 1254[®] (Lubet *et al.*, 1990), l'induction des activités monooxygénases hépatiques diminue lorsque l'exposition au sol Repl.III est prolongée au delà de trois jours. L'injection à des rats (i.p., 3 à 96 mg/kg, 2 jours consécutifs) d'extraits de sol (48 mg/ml de PCB) prélevé sur une décharge provoque, 24 heures après la dernière injection, l'induction significative des activités EROD et PROD hépatiques à partir de la dose 12 mg/kg (respectivement, 18 et 3 fois), mais ces activités atteignent rapidement un plateau (à partir de 36 ppm et 48 ppm, EROD et PROD respectivement ; Hansen *et al.*, 1995). Les activités monooxygénases de rats traités en continu avec de l'Aroclor 1254[®] par voie orale montrent une relation dose-dépendante, même après 84 jours de traitements à des doses de 100 ppm (Dragnev *et al.*, 1994). Dans nos conditions, les raisons de la baisse d'induction sont indéterminées. Les rats sont exposés de façon continue mais la biodisponibilité des polluants a pu être réduite par l'apport de matière organique (fèces).

Les activités des enzymes antioxydantes ont également été mesurées chez les rats exposés à des litières de sol Repl.III, mais les quelques modifications significatives de certaines de ces enzymes dues à la présence des polluants ne permettent pas de les préconiser comme biomarqueurs sensibles d'exposition ou d'effet. Cependant, il est intéressant de noter que la pollution de ce sol n'a pas d'effet mesurable important sur la défense antioxydante (enzymatique) des animaux exposés dans nos conditions expérimentales. La mesure de l'activité glutathion *S*-transférase aurait pu être intéressante du fait de son inductibilité par les xénobiotiques et de son rôle d'enzyme de phase II.

A partir de ces résultats, nous avons finalement mis au point un protocole unique qui peut se résumer par l'exposition en cages de polycarbonate de rats de laboratoire SD mâles (200-220 g) sur une litière de sol pollué, en parallèle avec un sol non pollué. L'exposition dure trois jours et une nuit (88 ± 2 h) dans une pièce climatisée à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et avec une photopériode de 12 h. Les animaux sont nourris et hydratés normalement. A partir de ce

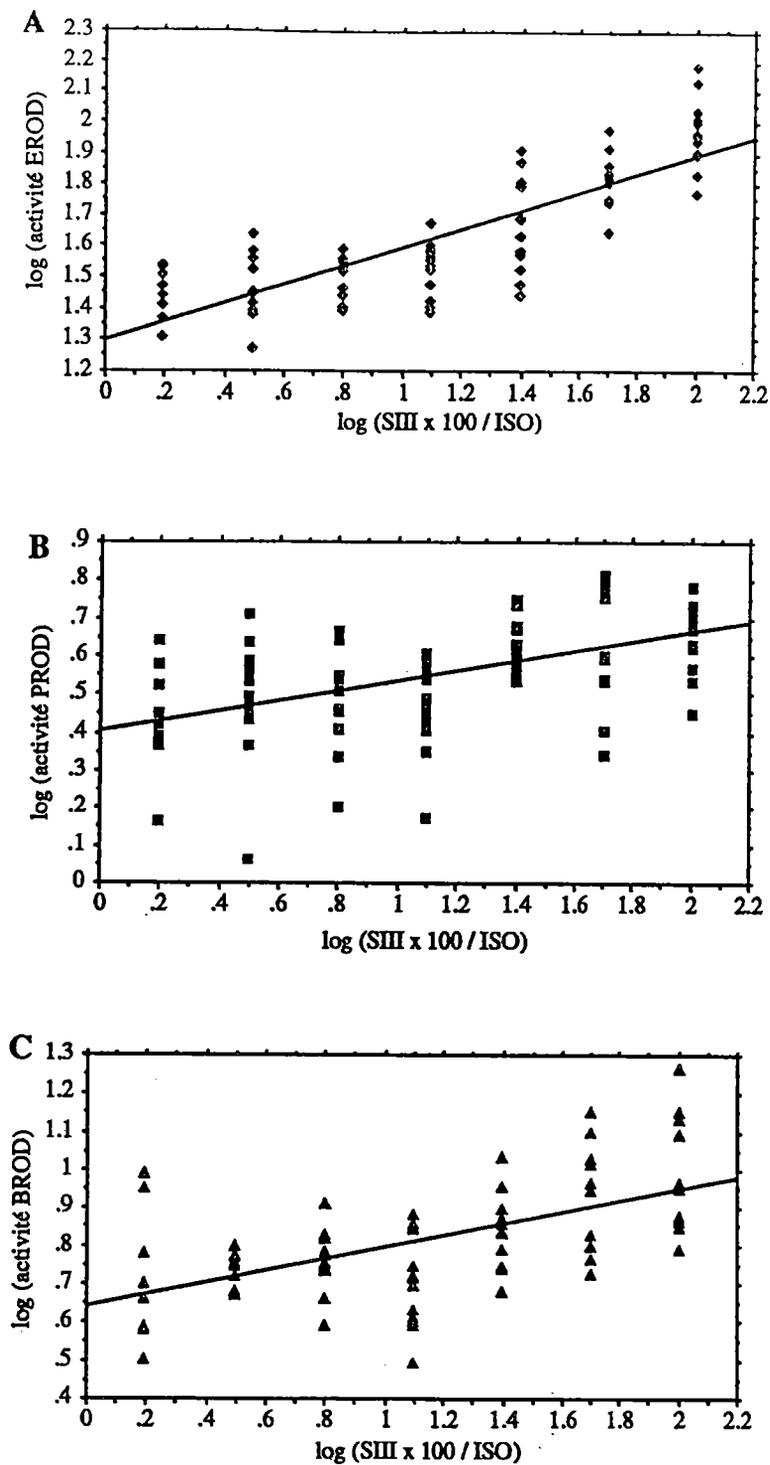


Figure 45 : Corrélations entre le logarithme des activités EROD (A), PROD (B) et BROD (C) hépatiques et le logarithme du pourcentage de sol pollué SIII présent dans la litière de sol ISO. Activités mesurées sur les fractions microsomales de rats de laboratoire mâles exposés à différentes litières durant 88 ± 2 heures. $N = 80$, coefficients de détermination, r^2 : 0,680 (A), 0,230 (B), 0,337 (C), $p < 0,001$.

protocole, nous avons pu comparer la réponse des rats de laboratoire et des rats sauvages. En pratiquant des dilutions avec une matrice non contaminée, nous avons aussi pu étudier les relations dose-réponse des activités monooxygénases avec différents sols et différentes matrices de dilutions.

II.3. Exposition au sol pollué SIII : activités monooxygénases

II.3.1. Résultats

II.3.1.1. Mise en évidence d'une relation dose-réponse

Trois séries d'essais indépendants ont été menées avec le sol SIII et ses dilutions avec le sol ISO. Pour des raisons techniques (ultracentrifugeuse en panne), les organes de la série 2 ont dû être congelés à -80°C avant la préparation des fractions subcellulaires. Afin d'éviter deux congélations et décongélations successives, les activités ont été mesurées immédiatement après la préparation des fractions microsomales. Les activités hépatiques et pulmonaires sont présentées dans les tableaux 18 et 19, respectivement.

L'activité EROD hépatique est induite dans les trois séries par le sol SIII non dilué, avec des taux d'induction de 2,9 (séries 1 et 2) et 5,4 (série 3). L'induction est significative jusqu'à la dilution du sol SIII au demi (série 2), au quart (série 1) ou au 1/8^{ème} (série 3). Dans la série 3, l'activité PROD n'est jamais significativement modifiée par le sol SIII ou ses dilutions alors que dans les deux autres séries, on observe une augmentation significative de cette activité (jusqu'aux dilutions au quart). L'exposition au sol SIII non dilué ne provoque pas d'augmentation de l'activité PROD supérieure à celle observée avec le sol SIII dilué au 1/2 voire au 1/4 (niveau d'induction compris entre 1,2 et 2,5).

L'activité BROD présente un profil d'induction différent de celui de la PROD : les séries 1 et 3 montrent des résultats très semblables, avec une augmentation de l'activité en fonction de la teneur en sol SIII, sans qu'il y ait de plateau. La série 2 montre une augmentation de cette activité plus importante que dans les deux autres séries et un plateau est observé à partir de la dilution 1/2. Malgré ces divergences d'une série à l'autre, le regroupement des trois séries met en évidence l'existence d'une forte corrélation ($p < 0,001$) entre le logarithme des activités EROD, PROD et BROD et le logarithme du pourcentage de sol SIII dans la litière (figure 45).

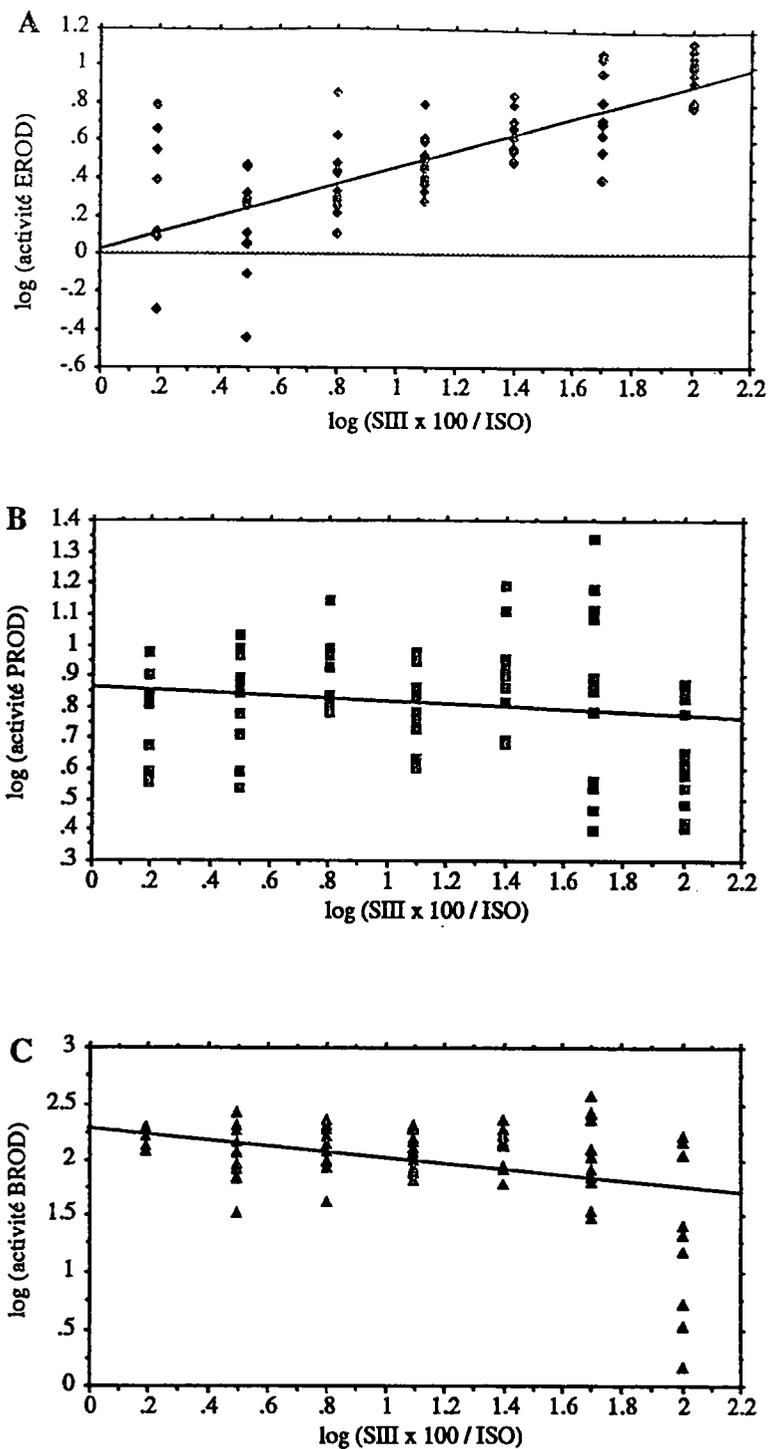


Figure 46 : Corrélations entre le logarithme des activités EROD (A), PROD (B) et BROD (C) pulmonaires et le logarithme du pourcentage de sol pollué SIII présent dans la litière de sol ISO. Activités mesurées sur les fractions microsomales de rats de laboratoire mâles exposés à différentes litières durant 88 ± 2 heures. $N = 80$, coefficients de détermination, r^2 : 0,580, $p < 0,001$ (A), 0,021, $p = 0,19$ (B), 0,187, $p < 0,001$ (C).

Tableau 18 : Activités EROD, PROD et BROD mesurées sur les fractions microsomaales hépatiques de rats de laboratoire SD mâles exposés durant 88 ± 2 h au sol SIII et à ses dilutions avec le sol ISO.

Litière				EROD		PROD		BROD	
Dilution	% sol SIII	Série	n	Activité (1)	Ind (2)	Activité (1)	Ind (2)	Activité (1)	Ind (2)
ISO	0	1	8	24,7 ± 4,74	-	2,35 ± 0,85	-	3,81 ± 0,78	-
		2	4	32,7 ± 5,59	-	2,55 ± 0,57	-	4,35 ± 0,73	-
		3	4	22,5 ± 1,69	-	2,58 ± 0,24	-	3,64 ± 0,37	-
SIII/64	1,56	2	4	34,0 ± 7,24	1,0	3,65 ± 0,66	1,4	7,88 ± 2,30	<i>a</i> 1,8
		3	4	24,6 ± 2,67	1,1	2,32 ± 0,52	0,9	3,57 ± 0,58	1,0
SIII/32	3,13	1	4	24,9 ± 1,72	1,0	2,84 ± 0,64	1,2	4,63 ± 0,06	1,2
		2	4	29,6 ± 4,60	0,9	4,02 ± 1,14	1,6	6,10 ± 0,19	1,4
		3	4	33,9 ± 4,24	1,5	3,72 ± 0,51	1,4	5,49 ± 0,42	1,5
SIII/16	6,25	1	4	29,3 ± 7,32	1,2	2,17 ± 0,55	0,9	4,80 ± 0,83	1,3
		2	4	38,6 ± 4,75	1,2	4,34 ± 0,50	<i>a</i> 1,7	7,18 ± 1,05	<i>a</i> 1,7
		3	4	28,3 ± 3,29	1,3	3,37 ± 0,28	1,3	5,44 ± 0,33	1,5
SIII/8	12,5	1	8	32,0 ± 4,80	1,3	2,98 ± 0,81	1,3	4,96 ± 1,62	1,3
		2	3	35,1 ± 6,63	1,1	3,41 ± 0,74	1,3	7,74 ± 0,39	<i>a</i> 1,8
		3	4	35,9 ± 4,93	<i>a</i> 1,6	3,18 ± 0,69	1,2	4,70 ± 0,54	1,3
SIII/4	25	1	4	39,7 ± 9,41	<i>a</i> 1,6	4,61 ± 0,88	<i>a</i> 2,0	5,72 ± 0,90	1,5
		2	4	41,6 ± 6,56	1,3	4,59 ± 1,16	<i>a</i> 1,8	9,19 ± 1,55	<i>a</i> 2,1
		3	4	66,3 ± 9,06	<i>a</i> 2,9	3,86 ± 0,31	1,5	6,45 ± 0,85	<i>a</i> 1,8
SIII/2	50	1	4	57,4 ± 12,69	<i>a</i> 2,3	4,90 ± 1,57	<i>a</i> 2,1	7,15 ± 1,78	1,9
		2	4	70,9 ± 5,63	<i>a</i> 2,2	6,17 ± 0,34	<i>a</i> 2,4	12,37 ± 1,77	<i>a</i> 2,8
		3	4	70,2 ± 17,72	<i>a</i> 3,1	3,15 ± 0,84	1,2	6,49 ± 1,48	<i>a</i> 1,8
SIII pur	100	1	4	72,4 ± 13,97	<i>a</i> 2,9	4,52 ± 0,70	<i>a</i> 1,9	8,98 ± 3,37	<i>a</i> 2,4
		2	4	95,9 ± 8,21	<i>a</i> 2,9	5,32 ± 0,59	<i>a</i> 2,1	12,66 ± 4,38	<i>a</i> 2,9
		3	4	120,9 ± 23,69	<i>a</i> 5,4	3,77 ± 0,79	1,5	8,68 ± 3,30	<i>a</i> 2,4

1) Activité exprimée en pmol/min/mg de protéines ± écart type.

(2) Taux d'induction = activité moyenne mesurée sur sol SIII dilué ou non/activité moyenne mesurée sur sol ISO.

a Activité moyenne significativement différente de la valeur obtenue avec le sol ISO, test de Dunnett, $p < 0,05$.

L'activité EROD pulmonaire est induite par le sol SIII non dilué (taux d'induction compris entre 9,1 et 12), et par plusieurs de ses dilutions avec le sol ISO. La dernière dilution induisant de manière significative l'activité EROD est le 1/4 (série 3), le 1/8^{ème} (série 2) ou le 1/16^{ème} (série 1). L'augmentation de cette activité est fortement corrélée ($p < 0,001$) à la teneur en sol SIII (figure 46A). Les activités PROD et BROD pulmonaires sont inhibées par le sol SIII non dilué et, selon la série, inhibées avec quelques dilutions de ce sol. Seule la série 2 montre des inductions significatives, avec les dilutions les plus fortes. L'inhibition de l'activité BROD est fortement corrélée au logarithme de la teneur en sol SIII ($p < 0,001$, figure 46C), ce qui n'est pas le cas pour l'activité PROD ($p = 0,19$, figure 46B).

Tableau 19 : Activités EROD, PROD et BROD mesurées sur les fractions microsomaux pulmonaires de rats de laboratoire SD mâles exposés durant 88 ± 2 h au sol SIII et à ses dilutions avec le sol ISO.

Litière			EROD		PROD		BROD	
Dilution	% sol SIII	Série n	Activité (1)	Ind (2)	Activité (1)	Ind (2)	Activité (1)	Ind (2)
ISO	0	1 8	$0,92 \pm 0,40$	-	$7,38 \pm 1,08$	-	$145,8 \pm 18,5$	-
		2 4	$0,93 \pm 0,22$	-	$4,51 \pm 0,56$	-	$54,5 \pm 12,5$	-
		3 4	$0,94 \pm 0,40$	-	$8,01 \pm 1,47$	-	$167,8 \pm 40,9$	-
SIII/64	1,56	2 4	$3,54 \pm 1,06$	3,8	$5,62 \pm 1,35$	1,3	$86,7 \pm 33,3$	1,6
		3 4	$1,08 \pm 0,38$	1,2	$5,40 \pm 0,50$	a 0,7	$76,7 \pm 10,7$	a 0,5
SIII/32	3,13	1 4	$1,28 \pm 0,57$	1,4	$9,22 \pm 1,48$	a 1,3	$124,0 \pm 23,9$	0,9
		2 4	$2,27 \pm 0,60$	2,5	$6,35 \pm 2,03$	1,4	$132,0 \pm 48,1$	a 2,4
		3 4	$1,55 \pm 0,36$	1,6	$5,81 \pm 0,88$	a 0,7	$112,8 \pm 24,0$	a 0,7
SIII/16	6,25	1 4	$2,30 \pm 0,48$	a 2,5	$8,27 \pm 1,43$	1,1	$143,7 \pm 17,2$	1,0
		2 4	$3,15 \pm 1,05$	3,4	$8,52 \pm 2,23$	1,9	$126,8 \pm 26,8$	a 2,3
		3 4	$1,62 \pm 0,32$	1,7	$8,34 \pm 1,11$	1,0	$125,4 \pm 25,5$	0,8
SIII/8	12,5	1 8	$3,11 \pm 0,62$	a 3,4	$7,06 \pm 1,01$	1,0	$130,3 \pm 26,7$	0,9
		2 4	$3,77 \pm 1,80$	a 4,1	$6,59 \pm 1,09$	a 1,5	$118,6 \pm 20,9$	a 2,2
		3 4	$2,50 \pm 0,52$	2,7	$6,22 \pm 0,86$	0,8	$133,1 \pm 21,7$	0,8
SIII/4	25	1 4	$3,96 \pm 0,99$	a 4,3	$7,40 \pm 1,70$	1,0	$135,2 \pm 46,7$	0,9
		2 4	$4,63 \pm 1,72$	a 5,0	$9,49 \pm 3,30$	a 2,1	$137,3 \pm 30,1$	a 2,5
		3 4	$4,70 \pm 1,11$	a 5,0	$8,55 \pm 1,62$	1,1	$165,2 \pm 39,0$	1,0
SIII/2	50	1 4	$6,52 \pm 2,47$	a 7,1	$7,88 \pm 0,75$	1,1	$117,4 \pm 27,8$	0,8
		2 4	$9,86 \pm 2,49$	a 10,7	$11,40 \pm 1,54$	a 2,5	$182,0 \pm 30,1$	a 3,3
		3 4	$3,51 \pm 0,76$	a 3,7	$4,54 \pm 0,52$	a 0,6	$94,9 \pm 20,6$	a 0,6
SIII pur	100	1 4	$9,25 \pm 3,64$	a 10,0	$4,68 \pm 0,43$	a 0,6	$34,3 \pm 8,5$	a 0,2
		2 4	$11,15 \pm 1,20$	a 12,0	$4,73 \pm 0,64$	a 1,1	$73,7 \pm 22,1$	1,4
		3 4	$8,60 \pm 1,56$	a 9,1	$4,50 \pm 0,74$	a 0,6	$49,4 \pm 14,4$	a 0,3

1) Activité exprimée en pmol/min/mg de protéines \pm écart type.

(2) Taux d'induction = activité moyenne mesurée sur sol SIII dilué ou non/activité moyenne mesurée sur sol ISO.

a Activité moyenne significativement différente de la valeur obtenue avec le sol ISO, test de Dunnett, $p < 0,05$.

En bref, le sol SIII, essentiellement contaminé par des PCB et des métaux, induit significativement les activités EROD, PROD et BROD hépatiques et l'activité EROD pulmonaire, et inhibe les activités PROD et BROD pulmonaires. La dilution de ce sol avec le sol standard ISO a montré l'existence d'une forte corrélation entre les activités EROD, PROD et BROD hépatiques et l'activité EROD pulmonaire et la teneur en sol SIII dans la litière. L'inhibition de l'activité BROD pulmonaire est corrélée à la teneur en sol SIII. Les dernières dilutions modifiant significativement les différentes activités sont le plus souvent différentes d'une série à l'autre et d'un organe à l'autre. L'activité EROD pulmonaire est plus sensible que l'activité EROD hépatique, mais le phénomène inverse est observé avec les activités PROD et BROD.

II.3.1.2. Influence de la matière organique sur la biodisponibilité des polluants inducteurs

Quatre lots de rats ont été exposés au sol ISO, au sol SIII, ou au sol SIII dilué au 1/2 avec du sol ISO ou du sable. Les résultats sont présentés dans les tableaux 20 et 21.

L'exposition des rats au sol SIII non dilué ou dilué au 1/2 avec du sable provoque l'induction significative des activités EROD, PROD et BROD hépatiques (tableau 20). La dilution avec le sol ISO induit seulement les activités EROD et PROD d'une manière significative. Les activités EROD et BROD hépatiques mesurées sur les rats exposés au sol SIII dilué avec le sol ISO sont significativement inférieures à celles mesurées sur les rats exposés au sol SIII non dilué. L'activité EROD hépatique des rats exposés au sol SIII dilué avec le sol ISO n'est pas significativement différente de celle mesurée sur les rats exposés au sol SIII dilué avec du sable ($p = 0,056$). La dilution avec du sable ne modifie pas l'induction des activités EROD et PROD observée avec le sol SIII pur mais diminue significativement l'activité BROD.

Tableau 20 : Activités EROD, PROD et BROD mesurées sur les fractions microsomales hépatiques de rats de laboratoire SD mâles exposés durant 88 ± 2 h au sol SIII non dilué ou dilué avec le sol ISO ou avec du sable.

Dilution du sol SIII	Matrice de dilution	<i>n</i>	EROD	PROD	BROD
-	ISO	3	39,8 ± 1,87	4,13 ± 0,90	4,06 ± 0,65
1/2	ISO	3	67,6 ± 5,99 <i>a b</i>	6,64 ± 1,25 <i>a</i>	5,43 ± 1,07 <i>b</i>
1/2	Sable	3	110,5 ± 27,28 <i>a</i>	7,09 ± 2,12 <i>a</i>	7,26 ± 1,25 <i>a b</i>
1	-	3	120,1 ± 8,11 <i>a</i>	8,50 ± 0,77 <i>a</i>	11,14 ± 1,95 <i>a</i>

Activité moyenne exprimée en pmol/min/mg de protéines.

a valeur significativement différente de la valeur obtenue avec le sol ISO, test *t* de Student, $p < 0,05$.

b valeur significativement différente de la valeur obtenue avec le sol SIII, test *t* de Student, $p < 0,05$.

Au niveau pulmonaire, seul le sol SIII non dilué inhibe l'activité PROD. L'activité BROD inhibée par le sol SIII non dilué ou dilué avec du sable n'est pas significativement différente entre les deux lots. Les trois litières contenant le sol SIII induisent l'activité EROD pulmonaire ; l'activité EROD mesurée sur les rats exposés au sol SIII dilué avec le sable ou le sol ISO n'est pas significativement différente de celle obtenue sur les rats exposés au sol SIII non dilué ($p > 0,05$).

Tableau 21 : Activités EROD, PROD et BROD mesurées sur les fractions microsomaux pulmonaires de rats de laboratoire SD mâles exposés durant 88 ± 2 h au sol SIII non dilué ou dilué avec le sol ISO ou avec du sable.

Dilution du sol SIII	Matrice de dilution	<i>n</i>	EROD		PROD		BROD	
-	ISO	3	1,20 ± 0,17		4,33 ± 0,24		100,1 ± 24,8	
1/2	ISO	3	5,50 ± 1,26	<i>a</i>	3,78 ± 1,40		82,4 ± 19,8	<i>b</i>
1/2	Sable	3	12,90 ± 5,66	<i>a</i>	2,96 ± 1,37		57,7 ± 11,4	<i>a</i>
1	-	3	11,36 ± 2,31	<i>a</i>	1,73 ± 0,65	<i>a</i>	34,5 ± 9,2	<i>a</i>

Activité moyenne exprimée en pmol/min/mg de protéines.

a valeur significativement différente de la valeur obtenue avec le sol ISO, test *t* de Student, $p < 0,05$.

b valeur significativement différente de la valeur obtenue avec le sol SIII, test *t* de Student, $p < 0,05$.

Si l'on compare les résultats obtenus avec le sol SIII dilué au 1/2 avec du sable ou du sol ISO, la matière organique du sol ISO ne diminue pas significativement la biodisponibilité des polluants inducteurs. La dilution du sol SIII au 1/2 avec du sable ne diminue pas l'intensité des inductions EROD et PROD hépatiques et EROD pulmonaires observées avec le sol non dilué.

II.3.2. Discussion

L'activité EROD est induite par les PCB coplanaires non substitués en position *ortho* et par les PCB mono- ou di-substitués en cette position ; ces derniers sont des inducteurs mixtes, car ils induisent aussi les CYP2B. Beebe *et al.* (1992) avaient déjà montré que l'activité BROD pulmonaire était inhibée par certains congénères de PCB (le congénère #105 par exemple) malgré la présence de composés inducteurs de CYP2B1 dans le poumon. Ce phénomène ne serait pas lié à l'affinité du congénère inhibiteur pour le récepteur *Ah*, car la 2,3,7,8-TCDD n'a pas cet effet inhibiteur (Beebe *et al.*, 1990). L'inhibition du CYP2B1 a été observée par d'autres auteurs, après administration i.p. ou intratrachéale d'Aroclor® 1254 ou de B(a)P (Mitchell *et al.*, 1987).

La reproductibilité des résultats n'est pas toujours très satisfaisante lors de la réplication des séries d'exposition, notamment pour l'induction de l'activité EROD hépatique. Le fait que les animaux et les échantillons de sol étaient différents pour chaque série peut expliquer en partie ces divergences, mais la variabilité de la réponse elle-même peut être mise en cause. En effet, Nims *et al.* (1992) ont répété deux fois la même expérience, qui consistait à mesurer l'activité EROD dans le foie de rats traités par de l'Aroclor 1254® par voie orale pendant 7 jours : à la plus forte dose (33 ppm), l'activité EROD est induite 22 ou 37 fois (611 et 1024 pmol/min/mg prot.) selon l'expérience considérée ; à la dose de 10 ppm, les inductions sont respectivement de 6,5 et 8,4 fois, ce qui correspond approximativement à la variabilité d'induction que nous avons pu observer.

II.4. Exposition au sol pollué SIV : activités monooxygénases

II.4.1. Résultats

II.4.1.1. Mise en évidence d'une relation dose-réponse

Dilutions avec le sol ISO

Deux séries d'exposition indépendantes ont été réalisées avec le sol SIV, contaminé par des HAP (séries 1 et 2). L'exposition au sol SIV non dilué provoque une forte induction de l'activité EROD hépatique (x 13,5), identique pour les deux séries (tableau 22).

Tableau 22 : Activités EROD, PROD et BROD mesurées sur les fractions microsomaux hépatiques de rats de laboratoire SD mâles exposés durant 88 ± 2 heures au sol SIV et ses dilutions avec le sol ISO.

Sol SIV			EROD		PROD		BROD	
Litière	Série	n	Activité (1)	Ind (2)	Activité (1)	Ind (2)	Activité (1)	Ind (2)
ISO	1	4	33,4 ± 2,84	-	3,56 ± 0,18	-	4,98 ± 1,06	-
	2	4	30,5 ± 2,10	-	4,50 ± 0,29	-	5,53 ± 0,8	-
SIV/128	2	4	34,3 ± 4,65	1,1	3,86 ± 0,36	0,9	4,69 ± 0,21	0,9
SIV/64	1	4	24,7 ± 5,42	a 0,7	2,28 ± 0,34	a 0,7	4,30 ± 1,24	0,9
	2	4	29,9 ± 4,90	1,0	2,62 ± 0,38	a 0,6	3,91 ± 0,38	0,7
SIV/32	1	4	27,2 ± 4,80	1,1	3,10 ± 0,59	0,9	4,66 ± 0,66	0,9
	2	4	23,4 ± 3,40	1,3	3,11 ± 0,42	0,7	5,48 ± 0,86	1,0
SIV/16	1	4	29,0 ± 3,08	1,0	3,25 ± 0,55	0,9	4,28 ± 0,74	0,9
	2	4	38,6 ± 1,90	1,4	4,03 ± 0,48	0,9	5,72 ± 0,64	1,0
SIV/8	1	4	27,0 ± 5,65	2,3	2,86 ± 0,43	0,8	4,09 ± 0,55	0,8
	2	4	29,1 ± 7,60	1,0	3,04 ± 0,45	0,7	4,46 ± 1,86	0,8
SIV/4	1	4	29,1 ± 2,86	0,9	3,23 ± 0,63	0,9	3,73 ± 0,32	0,8
	2	4	43,4 ± 4,70	a 1,4	4,54 ± 1,11	1,0	5,95 ± 1,54	1,1
SIV/2	1	4	72,3 ± 10,4	a 2,2	4,65 ± 0,95	a 1,3	5,48 ± 0,71	1,1
	2	4	68,8 ± 12,2	a 2,3	4,78 ± 0,95	1,1	5,62 ± 0,83	a 1,0
SIV pur	1	4	447,0 ± 78,5	a 13,4	9,44 ± 0,79	a 2,7	12,21 ± 1,31	a 2,5
	2	4	413,6 ± 44,3	a 13,6	9,96 ± 1,79	a 2,2	15,28 ± 1,16	a 2,8

(1) Activité moyenne ± écart type exprimée en pmol/min/mg de protéines.

(2) Induction = activité moyenne mesurée sur le sol SIV dilué ou non/activité moyenne mesurée sur le sol ISO.

a Moyenne significativement différente de la valeur obtenue sur sol ISO, test de Dunnett, $p < 0,05$.

Après une dilution au 1/2 avec le sol ISO, l'activité chute et n'est plus que doublée par rapport à l'activité de base. Les dernières dilutions induisant une augmentation significative de l'activité EROD sont au 1/2 ou au 1/4 (série 1 et 2, respectivement). Les activités PROD et BROD hépatiques sont moins fortement induites par le sol SIV (x 2,2 à x 2,8), mais l'induction est significative. La dilution du sol SIV au 1/2 avec le sol ISO diminue ces

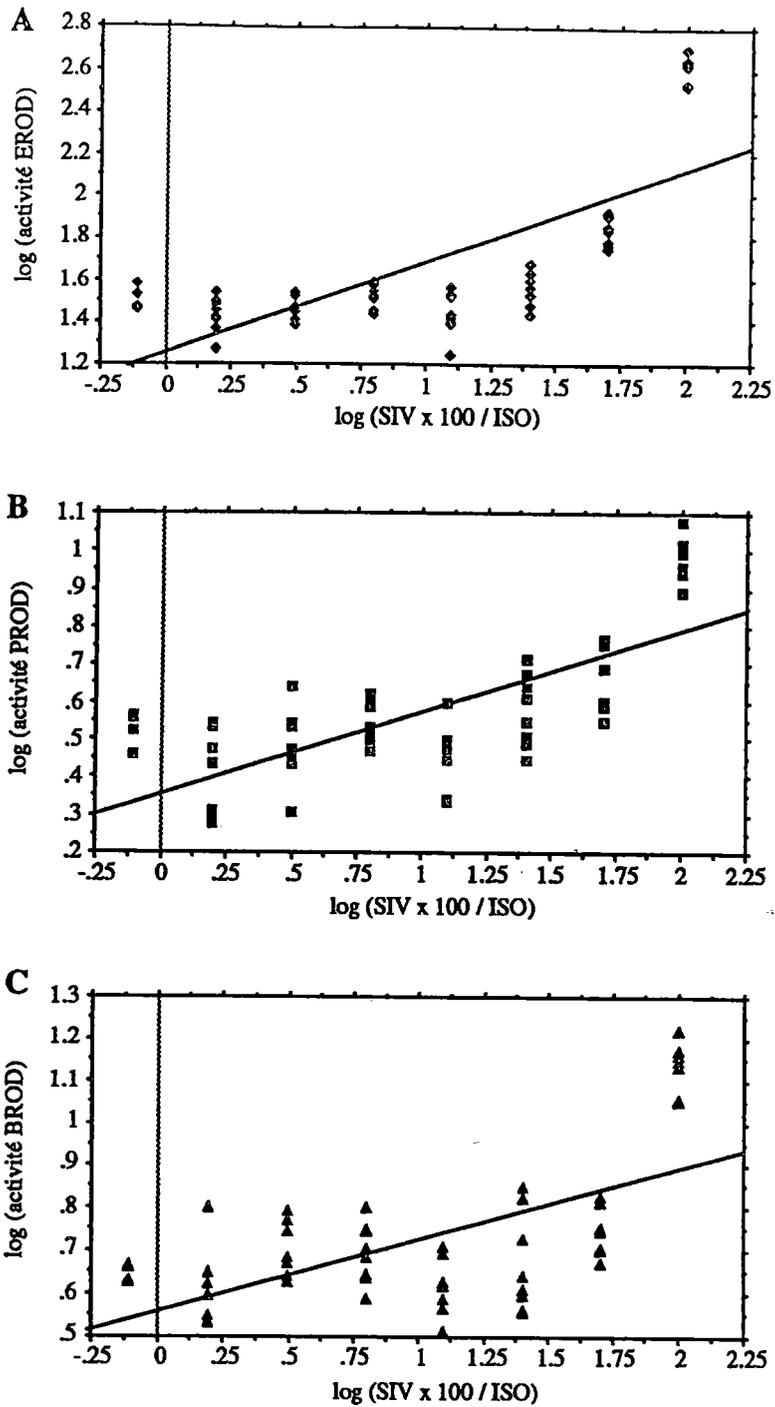


Figure 47 : Corrélations entre le logarithme des activités EROD (A), PROD (B), BROD (C) hépatiques et le logarithme du pourcentage de sol pollué SIV présent dans la litière de sol ISO. Activités mesurées sur les fractions microsomales de rats de laboratoire mâles exposés à différentes litières pendant 88 ± 2 heures. $N = 58$. Coefficients de détermination, r^2 : 0,531 (A), 0,51 (B), 0,397 (C), $p < 0,001$.

activités de moitié. Ces trois activités sont corrélées à la teneur en sol SIV dans la litière ($p < 0,001$), mais la relation n'est pas linéaire (figure 47).

Tableau 23 : Activités EROD, PROD et BROD mesurées sur les fractions microsomales pulmonaires de rats de laboratoire SD mâles exposés durant 88 ± 2 heures au sol SIV et ses dilutions avec le sol ISO.

Sol SIV			EROD		PROD		BROD	
Litière	Série	n	Activité (1)	Ind (2)	Activité (1)	Ind (2)	Activité (1)	Ind (2)
ISO	1	4	$0,6 \pm 0,25$	-	$7,62 \pm 1,48$	-	$149,5 \pm 23,5$	-
	2	4	$1,0 \pm 0,47$	-	$6,84 \pm 1,14$	-	$68,5 \pm 18,7$	-
SIV/128	2	4	$2,0 \pm 0,89$	a 3,3	$6,66 \pm 0,74$	0,9	$113,1 \pm 13,7$	a 0,8
SIV/64	1	4	$2,1 \pm 0,54$	a 3,5	$6,84 \pm 0,62$	0,9	$107,2 \pm 17,7$	a 0,7
	2	4	$1,4 \pm 0,16$	1,4	$4,62 \pm 0,99$	a 0,7	$48,3 \pm 9,5$	0,7
SIV/32	1	4	$2,8 \pm 1,12$	a 4,6	$8,02 \pm 1,70$	1,1	$106,2 \pm 22,2$	a 0,7
	2	4	$2,3 \pm 0,58$	a 2,3	$5,04 \pm 1,21$	0,7	$67,2 \pm 25,2$	1,0
SIV/16	1	4	$5,2 \pm 1,78$	a 8,6	$8,36 \pm 1,33$	1,1	$115,7 \pm 9,8$	a 0,8
	2	4	$3,9 \pm 0,73$	a 3,8	$6,72 \pm 1,56$	1,0	$81,5 \pm 5,5$	1,2
SIV/8	1	4	$6,9 \pm 0,74$	a 11,4	$6,05 \pm 1,83$	0,8	$68,8 \pm 25,1$	a 0,5
	2	4	$5,5 \pm 0,97$	a 4,5	$6,37 \pm 0,55$	0,9	$72,8 \pm 1,3$	1,1
SIV/4	1	4	$23,6 \pm 2,05$	a 39,3	$8,57 \pm 1,65$	1,1	$115,0 \pm 17,4$	a 0,8
	2	4	$8,4 \pm 1,22$	a 8,3	$5,70 \pm 0,60$	0,8	$54,4 \pm 3,3$	0,8
SIV/2	1	4	$42,5 \pm 6,02$	a 70,7	$5,61 \pm 1,36$	0,7	$80,9 \pm 14,1$	a 0,5
	2	4	$26,9 \pm 4,68$	a 26,6	$7,44 \pm 1,55$	1,1	$83,6 \pm 8,7$	1,2
SIV pur	1	4	$47,0 \pm 5,26$	a 78,3	$4,32 \pm 0,35$	a 0,6	$69,3 \pm 13,0$	a 0,5
	2	4	$38,3 \pm 5,32$	a 37,9	$2,76 \pm 0,63$	a 0,4	$37,4 \pm 9,7$	0,6

(1) Activité moyenne \pm écart type exprimée en pmol/min/mg de protéines.

(2) Induction = activité moyenne mesurée sur le sol SIV dilué ou non/activité moyenne mesurée sur le sol ISO.

a Moyenne significativement différente de la valeur obtenue sur sol ISO, test de Dunnett, $p < 0,05$.

L'induction de l'activité EROD pulmonaire par le sol SIV est très forte ($\times 38$, série 1 et $\times 78$, série 2 ; tableau 23). Contrairement à ce qui a été observé dans le foie, la dilution avec le sol ISO ne provoque pas de chute brutale de cette activité. Au contraire, on observe une sorte de plateau entre la dilution 1/2 (voire 1/4 pour la série 2) et le sol SIV non dilué. Les dilutions au 1/32^{ème} (série 1) et au 1/128^{ème} (série 2) induisent encore significativement cette activité.

Une excellente corrélation ($p < 0,001$) est établie entre cette activité et le pourcentage de sol SIV dans la litière (figure 48A). Les activités PROD et BROD montrent des profils d'induction peu cohérents, mais leur inhibition est corrélée à la teneur en sol SIV ($p < 0,05$, figures 48B et C)

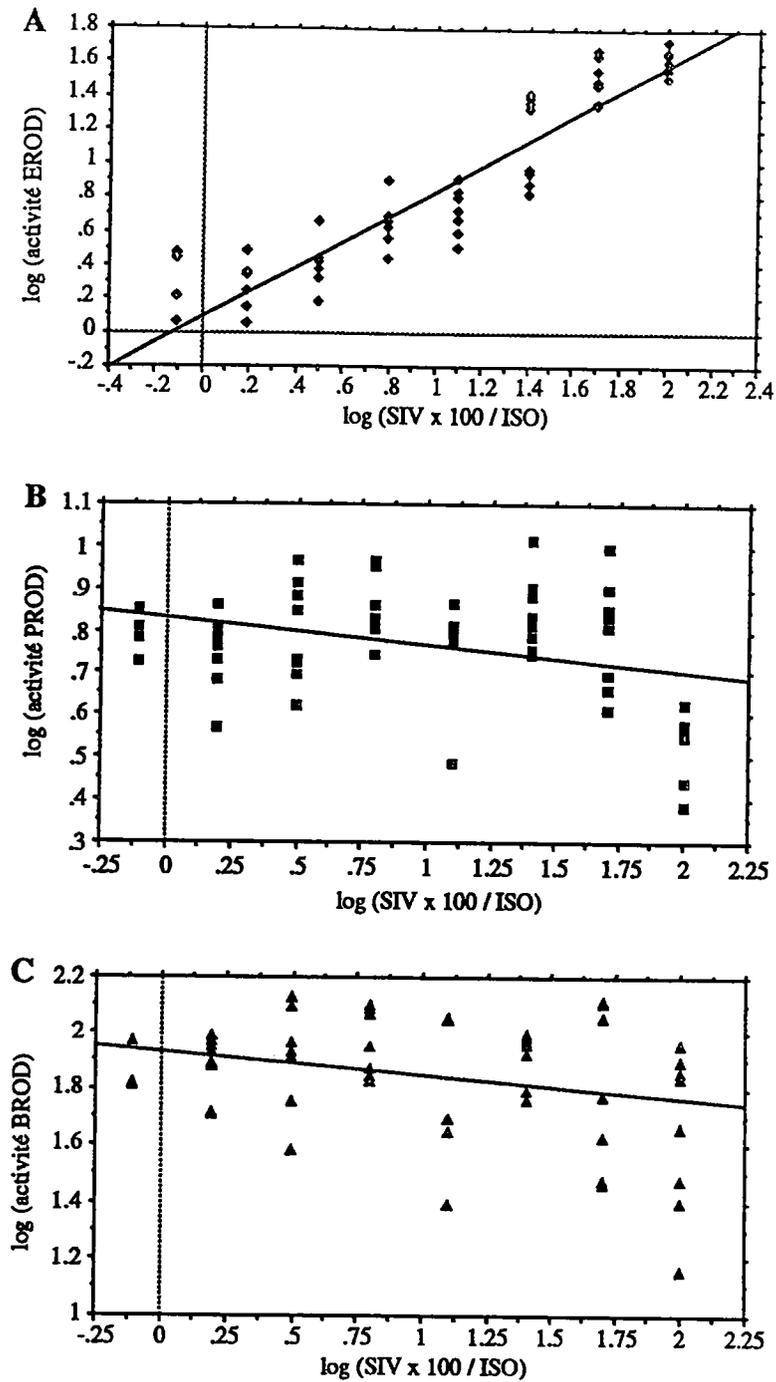


Figure 48 : Corrélations entre le logarithme des activités EROD (A), PROD (B), BROD (C) pulmonaires et le logarithme du pourcentage de sol pollué SIV présent dans la litière de sol ISO. Activités mesurées sur les fractions microsomales de rats de laboratoire mâles exposés à différentes litières pendant 88 ± 2 heures. $N = 58$. Coefficients de détermination, $r^2 : 0,868, p < 0,001$ (A), $0,102, p < 0,05$ (B), $0,079, p < 0,05$ (C).

Dilutions avec du sable

Une seule série d'exposition au sol SIV dilué avec du sable a été réalisée. Les résultats sont présentés dans les tableaux 24 et 25.

L'activité EROD hépatique est augmentée d'un facteur 30 avec le sol SIV non dilué. La dilution au 1/3 du sol SIV diminue l'induction par un facteur 3,4, et une seconde dilution au 1/3 diminue cette activité d'un facteur 4,4. La dilution au 1/27^{ème} est la dernière à induire significativement l'activité EROD hépatique. Les activités PROD et BROD sont induites par le sol SIV pur et dilué au 1/3. L'augmentation de ces trois activités est corrélée à la dilution du sol SIV avec le sable, avec $p < 0,001$ (figure 49).

Tableau 24 : Activités EROD, PROD et BROD mesurées dans les fractions microsomales hépatiques de rats de laboratoire SD mâles exposés durant 88 ± 2 heures au sol SIV ou ses dilutions avec du sable.

Litière		EROD		PROD		BROD	
Dilution	% de sol SIV	Activité (1)	Ind (2)	Activité (1)	Ind (2)	Activité (1)	Ind (2)
Sable	0	28,5 ± 3,28	-	2,40 ± 0,50	-	4,12 ± 1,37	-
SIV/243	0,41	30,4 ± 4,16	1,1	2,67 ± 0,49	1,1	3,88 ± 0,40	0,9
SIV/81	1,23	30,7 ± 4,77	1,1	2,82 ± 0,45	1,2	4,64 ± 0,34	1,1
SIV/27	3,70	51,6 ± 10,84	a 1,8	3,26 ± 0,32	1,4	4,92 ± 0,76	1,2
SIV/9	11,11	57,7 ± 11,58	a 2,0	4,17 ± 0,76	1,7	5,24 ± 0,91	1,3
SIV/3	33,33	250,6 ± 54,22	a 8,8	7,07 ± 1,62	a 3,0	8,34 ± 1,68	a 2,0
SIV	100	844,7 ± 133,6	a 29,7	10,71 ± 2,22	a 4,5	17,68 ± 1,79	a 4,3

Activité moyenne exprimée en pmol/min/mg de protéines.

a Activité moyenne significativement différente de la valeur obtenue sur le sable, test de Dunnett, $p < 0,05$.

L'activité EROD pulmonaire est induite 46 fois par le sol SIV non dilué (tableau 25). Le plateau, déjà observé lors des dilutions avec le sol ISO, est accentué lorsque le sol SIV est dilué avec du sable : la dilution au tiers provoque la même induction que le sol non dilué, et la dilution au 1/9^{ème} provoque encore une induction par un facteur 32. La dilution au 1/243^{ème} permet encore d'induire 2,5 fois l'activité EROD pulmonaire. La corrélation entre l'induction de cette activité et la teneur en sol SIV dans la litière est établie ($p < 0,001$), mais la relation ne doit pas être considérée comme linéaire. Les activités BROD et PROD sont inhibées par le sol SIV non dilué (PROD et BROD) et dilué au 1/3 (PROD) et l'inhibition est corrélée à la teneur en sol SIV ($p < 0,01$, figure 50).

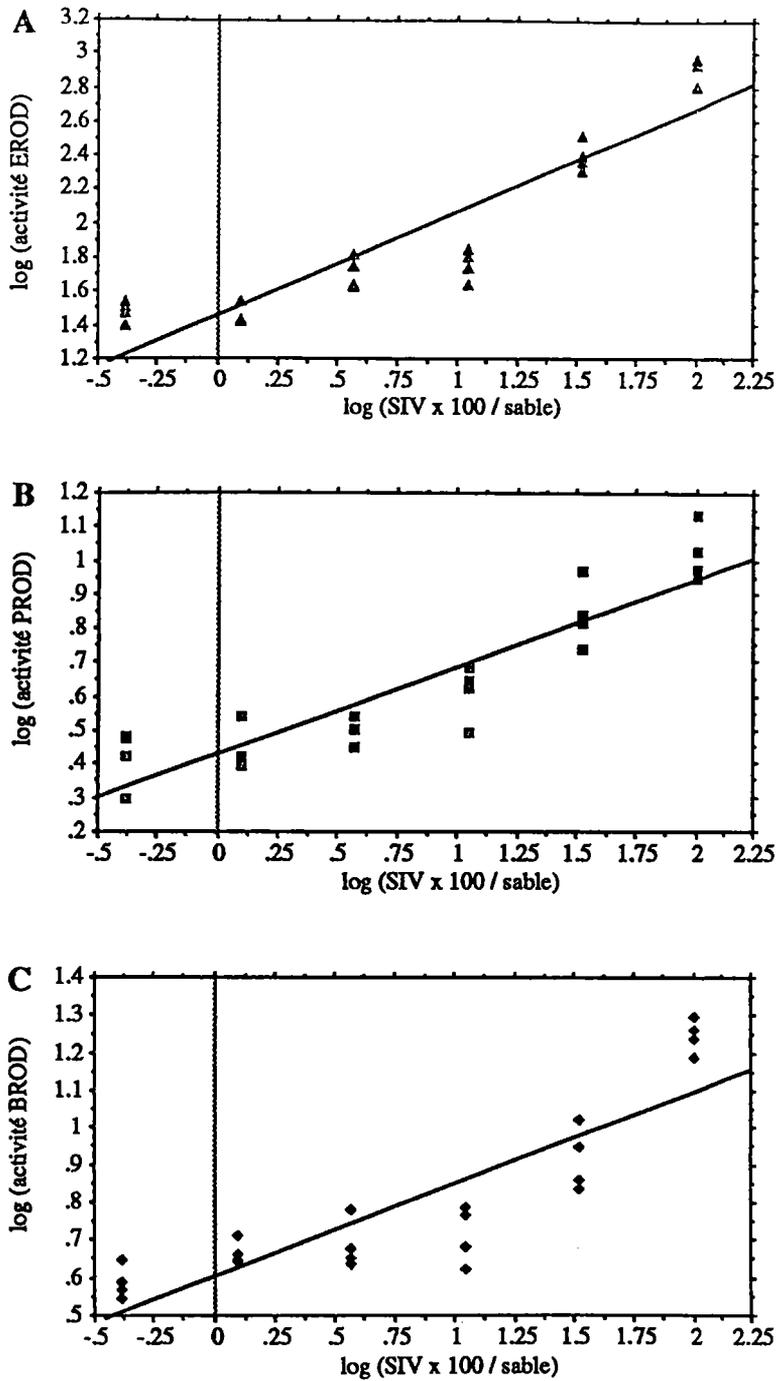


Figure 49 : Corrélations entre le logarithme des activités EROD (A), PROD (B), et BROD (C) hépatiques et le logarithme du pourcentage de sol pollué SIV présent dans la litière de sable. Activités mesurées sur les fractions microsomales de rats de laboratoire mâles exposés à différentes litières pendant 88 ± 2 heures. $N = 24$. Coefficients de détermination, r^2 : 0,835 (A), 0,831 (B), 0,760 (C), avec $p < 0,001$.

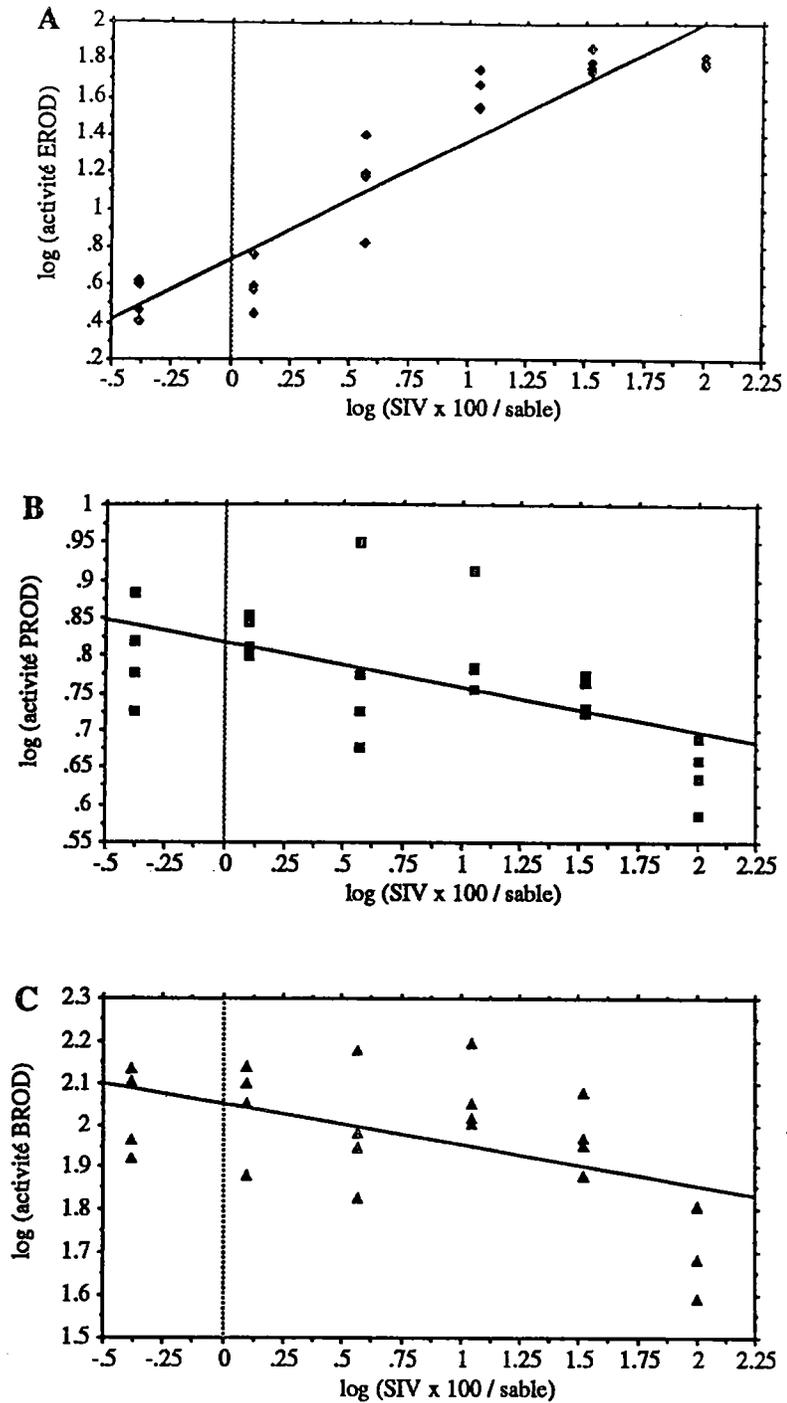


Figure 50 : Corrélations entre le logarithme des activités EROD (A), PROD (B), et BROD (C) pulmonaires et le logarithme du pourcentage de sol pollué SIV présent dans la litière de sable. Activités mesurées sur les fractions microsomales de rats de laboratoire mâles exposés à différentes litières pendant 88 ± 2 heures. $N = 24$. Coefficients de détermination, r^2 : 0,877, $p < 0,001$ (A), 0,337, $p < 0,005$ (B), 0,300, $p < 0,01$ (C).

Tableau 25 : Activités EROD, PROD et BROD mesurées dans les fractions microsomaux pulmonaires de rats de laboratoire SD mâles exposés durant 88 ± 2 heures au sol SIV ou ses dilutions avec du sable.

Litière		EROD		PROD		BROD	
Dilution	% de sol SIV	Activité (1)	Ind (2)	Activité (1)	Ind (2)	Activité (1)	Ind (2)
Sable	0	$1,38 \pm 0,49$	-	$7,79 \pm 1,59$	-	$113,16 \pm 37,3$	-
SIV/243	0,41	$3,42 \pm 0,8$	<i>a</i> 2,5	$6,41 \pm 0,99$	0,8	$109,45 \pm 26,0$	1,0
SIV/81	1,23	$4,05 \pm 1,22$	<i>a</i> 2,9	$6,74 \pm 0,40$	0,9	$112,75 \pm 26,9$	1,0
SIV/27	3,70	$15,51 \pm 7,51$	<i>a</i> 11,2	$6,25 \pm 1,86$	0,8	$100,43 \pm 35,6$	0,9
SIV/9	11,11	$43,9 \pm 10,24$	<i>a</i> 31,8	$6,52 \pm 1,13$	0,8	$118,49 \pm 26,3$	1,1
SIV/3	33,33	$62,54 \pm 8,15$	<i>a</i> 45,3	$5,63 \pm 0,33$	<i>a</i> 0,7	$94,52 \pm 18,2$	0,8
SIV	100	$63,58 \pm 3,68$	<i>a</i> 46,0	$4,42 \pm 0,44$	<i>a</i> 0,6	$53,97 \pm 12,5$	<i>a</i> 0,5

Activité moyenne exprimée en pmol/min/mg de protéines.

a Activité moyenne significativement différente de la valeur obtenue sur le sable, test de Dunnett, $p < 0,05$.

En résumé, le sol SIV non dilué est très fortement inducteur des activités EROD hépatiques et pulmonaires. Les activités EROD, PROD et BROD hépatiques et l'activité EROD pulmonaire sont fortement corrélées à la teneur en sol SIV dans la litière ($p < 0,001$) ; la corrélation est moins bonne pour l'inhibition des activités PROD et BROD pulmonaires ($p < 0,05$). Cependant, ces relations dose-réponse ne sont pas linéaires : la dilution du sol SIV avec le sol ISO diminue très rapidement la biodisponibilité des polluants inducteurs au niveau du foie, alors que l'activité EROD pulmonaire atteint un plateau d'induction entre la dilution au 1/4 et le sol non dilué. La dilution du sol SIV avec du sable permet d'obtenir une relation plus linéaire entre la dose et les activités hépatiques, mais le plateau est plus accentué pour l'activité EROD pulmonaire.

II.4.1.2. Influence de la matière organique sur la biodisponibilité des polluants inducteurs

Cinq lots de rats ont été exposés aux sols ISO, SIV, SIV dilué au 1/2 avec du sable ou avec un mélange sable et kaolin (80:20) ou sable et tourbe (90:10). Les résultats sont présentés dans les tableaux 27 et 28.

L'activité EROD hépatique est induite par toutes les litières contenant du sol SIV (tableau 27). L'induction obtenue avec le sol SIV dilué au 1/2 est toujours significativement inférieure à celle obtenue avec le sol SIV non dilué. La dilution avec le sable provoque une induction supérieure aux deux autres dilutions. La litière contaminée contenant du kaolin provoque une induction égale à 20% seulement de l'induction observée avec le sol SIV dilué avec du sable, et significativement plus faible que la litière contenant de la tourbe. Les activités PROD et BROD ne sont pas modifiées par le sol SIV dilué avec du sable et du

kaolin. La dilution au 1/2 avec du sable résulte en la même induction que le sol non dilué, mais l'ajout de tourbe fait diminuer l'induction de 45% par rapport à l'induction observée avec le sol dilué avec du sable (activités PROD et BROD) ou avec le sol SIV non dilué (activité BROD).

Tableau 27 : Activités EROD, PROD et BROD mesurées sur les fractions microsomaux hépatiques de rats de laboratoire SD mâles exposés durant 88 ± 2 h au sol SIV non dilué ou dilué au 1/2 avec différentes matrices.

Dilution du sol SIV	Matrice de dilution	n	EROD		PROD		BROD	
-	ISO	3	27,6 ± 0,9		3,19 ± 0,14		4,1 ± 0,15	
1/2	Sable + kaolin	3	108,9 ± 25,8	<i>a b c d</i>	4,34 ± 0,85	<i>c d</i>	5,0 ± 0,99	<i>b c d</i>
1/2	Sable + tourbe	3	327,7 ± 13,6	<i>a b c</i>	6,75 ± 0,66	<i>a c</i>	8,4 ± 0,78	<i>a b c</i>
1/2	Sable	3	575,6 ± 39,0	<i>a b</i>	10,23 ± 1,57	<i>a</i>	11,9 ± 0,46	<i>a</i>
1	-	3	1226,0 ± 220,0	<i>a</i>	7,92 ± 2,83	<i>a</i>	23,4 ± 5,23	<i>a</i>

Activité moyenne exprimée en pmol/min/mg de protéines.

a valeur significativement différente de la valeur obtenue avec le sol ISO, test de Dunnett, $p < 0,05$.

b valeur significativement différente de la valeur obtenue avec le sol SIV, test *t* de Student, $p < 0,05$.

c valeur significativement différente de la valeur obtenue avec le sol SIV dilué avec le sable, test *t* de Student, $p < 0,05$.

d valeur significativement différente de la valeur obtenue avec le sol SIV dilué avec le sable et la tourbe, test *t* de Student, $p < 0,05$.

L'activité EROD pulmonaire est fortement induite par toutes les litières contaminées (tableau 28). Lorsque le sol SIV est dilué au 1/2, l'induction est plus faible que lorsqu'il est utilisé sans

Tableau 28 : Activités EROD, PROD et BROD mesurées sur les fractions microsomaux pulmonaires de rats de laboratoire SD mâles exposés durant 88 ± 2 h au sol SIV non dilué ou dilué au 1/2 avec différentes matrices.

Dilution du sol SIV	Matrice de dilution	n	EROD		PROD		BROD	
-	ISO	3	2,0 ± 0,6		7,43 ± 0,76		132,2 ± 14,2	
1/2	Sable + kaolin	3	38,7 ± 12,3	<i>a b</i>	6,95 ± 0,96	<i>b</i>	107,4 ± 25,8	
1/2	Sable + tourbe	3	58,7 ± 6,8	<i>a b</i>	6,77 ± 1,31		87,1 ± 2,6	<i>a b</i>
1/2	Sable	3	54,3 ± 6,1	<i>a b</i>	6,40 ± 0,37		82,7 ± 6,6	<i>a</i>
1	-	3	77,4 ± 4,9	<i>a</i>	4,59 ± 0,37	<i>a</i>	68,9 ± 7,0	<i>a</i>

Activité moyenne exprimée en pmol/min/mg de protéines.

a valeur significativement différente de la valeur obtenue avec le sol ISO, test de Dunnett, $p < 0,05$.

b valeur significativement différente de la valeur obtenue avec le sol SIV, test *t* de Student, $p < 0,05$.

dilution. L'ajout de tourbe ou de kaolin ne modifie pas significativement l'induction observée lors d'une dilution du sol SIV avec du sable seul. L'activité PROD pulmonaire n'est inhibée

que par le sol SIV non dilué, mais l'activité BROD est inhibée lors de l'exposition à toutes les litières ne contenant pas de kaolin.

II.4.2. Discussion

Nos résultats ont montré que les activités monooxygénases, et particulièrement l'activité EROD hépatique et pulmonaire, étaient fortement induites chez les rats exposés au sol SIV. Dans le poumon, l'activité EROD est rapidement saturée lorsque la litière contient une forte proportion de sol SIV, bien qu'elle ne soit pas à son taux d'induction maximal (Beebe *et al.*, 1990).

Les HAP sont des molécules planes et certains d'entre eux sont de très bons inducteurs des CYP1A : les HAP comportant plus de 4 cycles condensés (B(a)P, B(b)F, B(k)F, dibenz(a)anthracène...) sont inducteurs de CYP1A1, alors que les HAP comportant 3 cycles (phénanthrène, fluorène, anthracène, acénaphène, acénaphylène...) sont de bons inducteurs de CYP1A2, par un mécanisme *Ah*-indépendant (Chaloupka *et al.*, 1995). Roos *et al.* (1996) ont montré que l'activité EROD hépatique n'était pas augmentée chez des rats traités par l'ingestion d'un sol contaminé par 1.813 ppm de HAP comprenant 2 à 4 cycles, alors qu'avec des sols contenant des HAP de plus grande taille (pour une concentration voisine en HAP totaux) induisaient cette activité 40 à 360 fois. Cependant, les HAP de 2 à 4 cycles doivent tout de même être pris en considération dans l'évaluation du risque, car ils peuvent être transformés en métabolites mutagènes ou toxiques par les CYP1A1 (Goldstein & Faletto, 1993 cités par Roos *et al.*, 1996).

La dilution du sol SIV avec le sol ISO a montré que la matière organique diminuait fortement la biodisponibilité des HAP présents dans le sol SIV. Ce phénomène bien connu est dû à l'adsorption des composés hydrophobes sur la matière organique. Nos résultats peuvent s'expliquer par les travaux de deux équipes qui ont étudié l'absorption cutanée du B(a)P marqué, *in vivo* et *in vitro* : Yang *et al.* (1989) ont mesuré l'absorption de B(a)P marqué, dans de l'huile de pétrole brut pure ou adsorbée sur du sol. Les fractions argileuses et limoneuses renferment la majorité du carbone organique et les composés lipophiles y sont fortement liés. La biodisponibilité du B(a)P dans l'huile est d'environ 36% ; lorsque l'huile est adsorbée sur le sol, la biodisponibilité est de 8 à 9% seulement. Les particules de matière organique de petite taille (< 50 µm) sont prioritairement présentes à la surface de la peau et la pénétration du B(a)P à partir du sol dépend essentiellement de la première couche de sol appliquée : une application épaisse n'augmente pas la quantité de B(a)P absorbée par la peau. Les résultats obtenus *in vitro* sur des fragments de peau humaine ou *in vivo* sur des singes (avec du B(a)P ou du phénanthrène) donnent des résultats comparables (Wester *et al.* 1990 ; Kadry *et al.*, 1995). Le phénanthrène adsorbé sur du sol est plus disponible par la voie digestive que par la voie dermique (Kadry *et al.*, 1995).

Nos résultats ont montré que la biodisponibilité des HAP est augmentée dans le poumon lorsque les dilutions sont effectuées avec du sable, mais il est difficile de déterminer si cela est dû uniquement à la présence de davantage de composés inducteurs dans la circulation sanguine ou si la biodisponibilité est également augmentée au niveau alvéolaire. La fraction inhalable d'un sol est composée de particules $<10 \mu\text{m}$ en majorité composées de matière organique (argile) et ces particules ont un fort pouvoir de rétention des composés organiques, comme l'ont montré Nessel *et al.* (1992) avec la 2,3,7,8-TCDD. Les mêmes auteurs ont mis en évidence la forte biodisponibilité (au niveau hépatique) de la dioxine présente dans ces particules après instillation trachéale : la teneur en cytochrome P-450 et l'activité AHH hépatique sont augmentées dans les mêmes proportions qu'après instillation de particules d'oxyde de gallium ($0,7 \pm 0,5 \mu\text{m}$, substrat inerte) contaminées par la même quantité de TCDD.

II.5. Exposition à des sols artificiellement contaminés : activités monooxygénases

II.5.1. Résultats

Les rats ont été exposés à des litières de sols S0, SI, SII, SII' ou SII'' non dilués. Seuls les rats exposés au sol SI ont montré une perte d'appétit, qui s'est traduit par une diminution significative du poids du foie (tableau 29). Seule l'activité EROD est modifiée par l'exposition à ces sols : le sol SI contaminé par des métaux et le sol SII' contaminé par 250 mg/kg de B(a)P induisent significativement l'activité EROD et la teneur en cytochrome P-450 hépatique. Mais si l'on exprime l'activité EROD en pmol/nmol de cytochrome P-450, ces inductions ne sont plus significatives. L'activité EROD pulmonaire est induite 6,5 fois par le sol SII'.

Tableau 29 : Activités EROD, PROD et BROD hépatiques et pulmonaires et teneur en cytochrome P-450 hépatique mesurés dans les fractions microsomales et poids des organes de rats de laboratoire SD mâles exposés durant 88 ± 2 h à différents sols contaminés artificiellement.

Organe	Sol	Poids (1)	EROD (2)	PROD (2)	BROD(2)	P-450 (3)
Foie	S0	$12,5 \pm 1,0$	$26,74 \pm 4,35$	$2,08 \pm 0,61$	$4,02 \pm 1,11$	$0,87 \pm 0,03$
	SI	$9,2 \pm 1,3$ <i>b</i>	$37,95 \pm 6,83$ <i>a</i>	$3,01 \pm 0,67$	$4,88 \pm 0,88$	$1,07 \pm 0,11$ <i>a</i>
	SII	$12,9 \pm 0,5$	$34,88 \pm 4,49$	$2,82 \pm 0,39$	$4,37 \pm 0,36$	$0,9 \pm 0,04$
	SII"	$12,8 \pm 0,8$	$33,88 \pm 6,05$	$2,71 \pm 0,22$	$4,47 \pm 0,51$	$0,9 \pm 0,15$
	SII'	$12,6 \pm 1,1$	$35,09 \pm 4,81$ <i>a</i>	$2,67 \pm 0,43$	$4,33 \pm 0,70$	$1,07 \pm 0,11$ <i>a</i>
Poumon	S0	$1,4 \pm 0,1$	$1,30 \pm 0,30$	$4,55 \pm 1,05$	$90,7 \pm 21,3$	ND
	SI	$1,3 \pm 0,2$	$0,74 \pm 0,06$	$5,85 \pm 0,89$	$124,5 \pm 29,5$	ND
	SII	$1,4 \pm 0,1$	$1,08 \pm 0,46$	$4,32 \pm 1,44$	$86,2 \pm 32,6$	ND
	SII"	$1,4 \pm 0,1$	$1,14 \pm 0,34$	$6,21 \pm 1,38$	$110,3 \pm 20,0$	ND
	SII'	$1,5 \pm 0,1$	$6,81 \pm 1,34$ <i>a</i>	$5,91 \pm 0,73$	$96,0 \pm 12,9$	ND

(1) Poids moyen en grammes,

(2) Activités moyenne \pm écart type exprimées en pmol/min/mg de protéines

(3) Teneur moyenne \pm écart type exprimée en nmol/mg de protéines

a : activité moyenne différente de la valeur obtenue sur le sol S0, test de Dunnett, $p < 0,05$

b : poids moyen différent de celui du lot S0, test *t* de Student, $p < 0,01$.

II.5.2. Discussion

L'induction de l'activité EROD et du cytochrome P-450 par le sol SI est pour le moins surprenante, les métaux présents étant habituellement connus pour bloquer l'action ou la synthèse des cytochromes P-450. Les polluants présents dans les sols SII et SII" (800 ppm de phénanthrène) ou SII' (250 ppm de B(a)P) ne sont pas de bons inducteurs. Leur concentration est voisine ou supérieure à la teneur totale en HAP présents dans le sol SIV (238 ppm) ou Repl.III (88 ppm). Le sol SIV contient 32,5 ppm de B(a)P et le sol Repl.III en contient 4,4 ppm ; la teneur en phénanthrène dans le sol Repl.III est de 8,6 ppm.

La faible capacité d'induction des sols artificiellement contaminés peut s'expliquer par : a) le caractère faiblement inducteur du phénanthrène, qui ne comporte que 3 cycles benzéniques (Chaloupka *et al.*, 1995) et/ou b) l'absence d'interactions entre différents HAP et/ou d'autres polluants présents dans le sol SIV.

Les chlorophénols présents dans le sol SII ne modifient pas l'activité inductrice (indétectable) du phénanthrène (sol SII").

II.6. Exposition aux sol SIII et SIV par inhalation : activités monooxygénases

Dans le but de déterminer le rôle de l'inhalation de produits volatils dans l'exposition des rats aux sols SIII et SIV, nous avons exposé des rats 1 cm au dessus d'une litière de sol ; la séparation est faite par un grillage, qui évite le contact direct entre les rats et le sol, et par là même évite la formation de poussières.

II.6.1. Résultats

Les rats ont été exposés durant trois jours au dessus d'une litière de sol ISO, SIII ou SIV. Les résultats sont présentés dans le tableau 30. L'exposition des rats aux sols SIII et SIV dans ces conditions ne provoque aucune modification significative des activités monooxygénases hépatiques. Au niveau pulmonaire, seule l'activité EROD est significativement induite par l'exposition au sol SIV (x 1,25).

Tableau 30 : Activités EROD, PROD et BROD mesurées sur les fractions microsomales hépatiques et pulmonaires de rats de laboratoire SD mâles exposés par inhalation aux sols ISO, SIII et SIV durant 88 ± 2 h.

Organe	Sol	EROD	PROD	BROD
Foie	ISO	36,91 ± 5,07	3,05 ± 0,32	4,98 ± 0,94
	SIII	31,80 ± 7,53	3,10 ± 0,66	5,19 ± 0,77
	SIV	30,93 ± 6,98	3,19 ± 0,98	4,73 ± 0,79
Poumon	ISO	0,60 ± 0,05	6,38 ± 0,68	130,5 ± 22,6
	SIII	0,65 ± 0,05	6,93 ± 1,96	116,9 ± 43,8
	SIV	0,75 ± 0,07 <i>a</i>	5,97 ± 1,35	109,1 ± 35,9

Activité moyenne exprimée en pmol/min/mg de protéines.

a valeur significativement différente de la valeur obtenue avec le sol ISO, test de Dunnett, $p < 0,05$.

II.6.2. Discussion

Lors d'une exposition avec contact direct, ingestion, absorption percutanée et inhalation interviennent, mais il est difficile de déterminer la part de chacune des voies. Le sol SIII n'est pas inducteur sans contact direct avec les rats, mais l'activité EROD pulmonaire est augmentée significativement par le sol SIV ; l'induction est seulement de 1,25 fois. Cette induction peut être considérée comme négligeable si on la compare au taux d'induction mesuré lors d'une exposition directe (compris entre 38 et 78). Lors des expositions sur la litière, l'induction pulmonaire est donc probablement liée à l'exposition par la voie sanguine et par inhalation de poussières.

III. RECHERCHE D'ADDUITS À L'ADN HÉPATIQUE ET PULMONAIRE CHEZ DES RATS EXPOSÉS À DIFFÉRENTES LITIÈRES DE SOL POLLUÉ

Comme nous l'avons vu précédemment, l'activité EROD est induite dans le foie et le poumon des rats exposés aux sols Repl.III et SIV pendant 88 ± 2 heures. L'induction du CYP1A1 étant souvent responsable de la formation de métabolites réactifs, une relation entre l'induction de l'activité EROD et l'induction de la formation d'adduits à l'ADN dans ces organes mériterait d'être recherchée.

Les adduits ont été détectés par la méthode de post-marquage au γ [³²P]-ATP des nucléotides modifiés (ou adduits) présents dans des hydrolysats d'ADN obtenus à partir d'un pool d'homogénats de foie ou de poumon de rats, suivie d'une chromatographie bidimensionnelle et d'une révélation par autoradiographie. La mesure de la radioactivité des taches permet la quantification des adduits exprimée en nombre d'adduits par 10^9 nucléotides (Nt).

D'une façon générale, il est fréquent d'observer des taches sur les autoradiogrammes témoins. La présence de ces adduits endogènes peut être expliquée par l'effet de molécules endogènes susceptibles de se lier à l'ADN ou de facteurs environnementaux liés à la nourriture ou l'atmosphère. L'impact des xénobiotiques dans les essais se manifeste généralement par une amplification des adduits endogènes et/ou par l'apparition de nouveaux adduits. Dans ce cas, on considère que le xénobiotique utilisé dans ces essais a des potentialités génotoxiques.

III.1. Résultats

III.1.1. Rats exposés au sol Repl.III

Les essais ont été effectués en duplicat pour chaque pool de foie et de poumon (2 rats par pool et par lot). Le profil des autoradiogrammes obtenus pour les duplicats sont identiques et nous n'avons présenté ici qu'un autoradiogramme pour chaque essai (figure 51) mais l'ensemble des résultats est consigné dans les tableaux 31 et 32.

III.1.1.1. Détection d'adduits dans le foie

Les autoradiogrammes obtenus à partir de l'ADN de foie de rats exposés au sol témoin ISO et au sol pollué Repl.III sont présentés sur la figure 51 (A et B). Les taches majeures numérotées 1, 2, 3 et 4 sont détectées aussi bien chez les rats exposés au sol témoin (A) que chez les rats exposés au sol pollué (B) mais leur intensité est différente. Sept taches mineures (a, b, c, d, e, f, g) sont également détectées sur les autoradiogrammes du lot témoin et huit taches mineures (numérotées de a à h) sont repérées sur les autoradiogrammes du lot Repl.III.

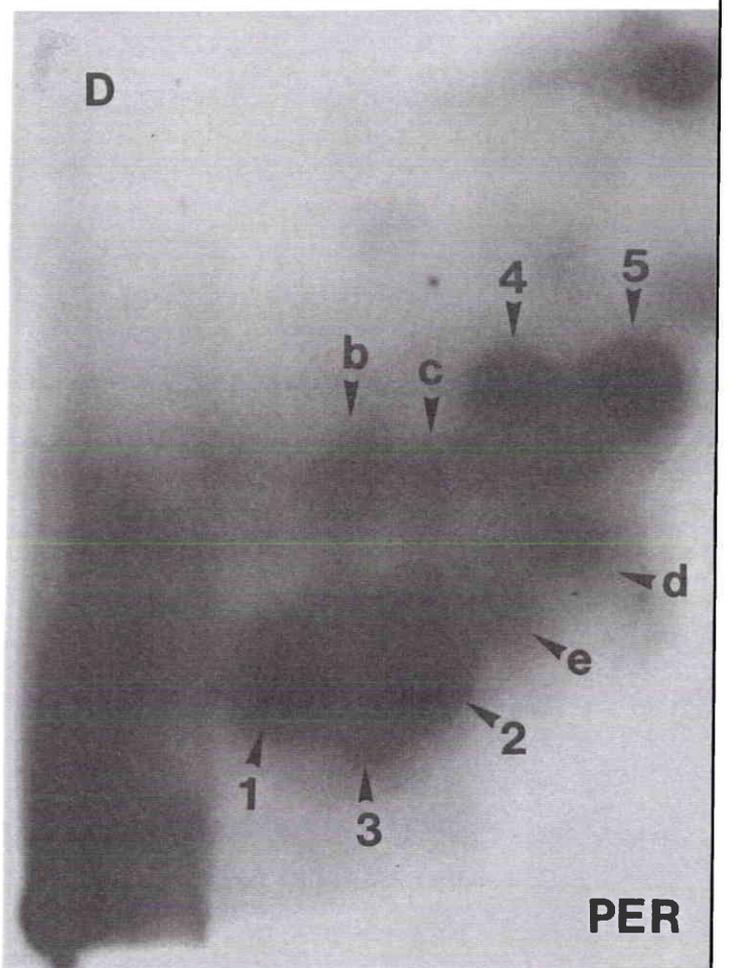
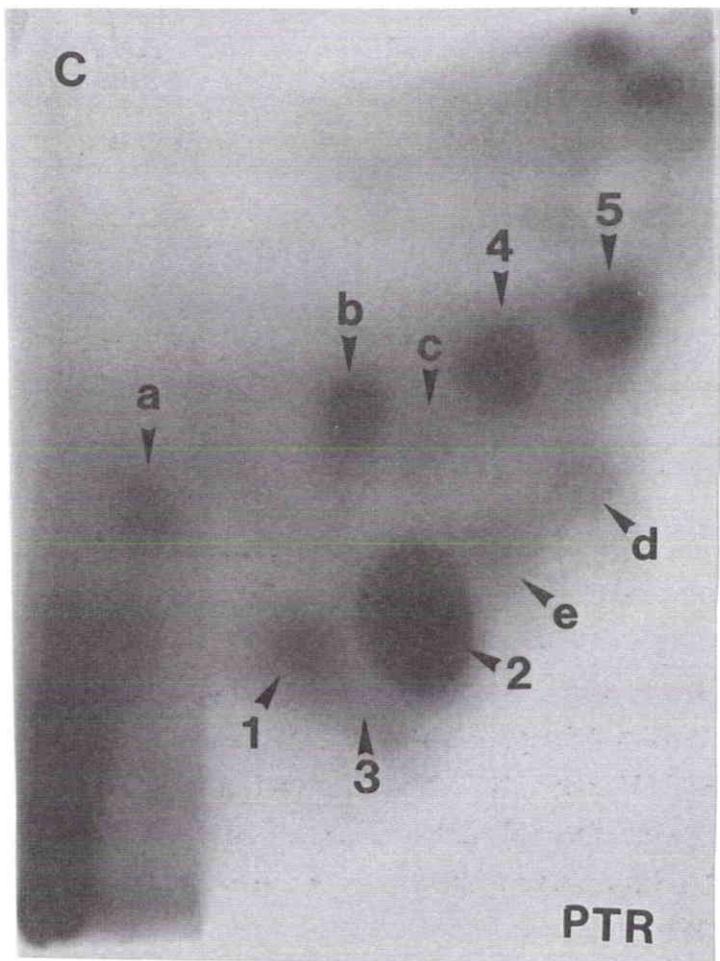
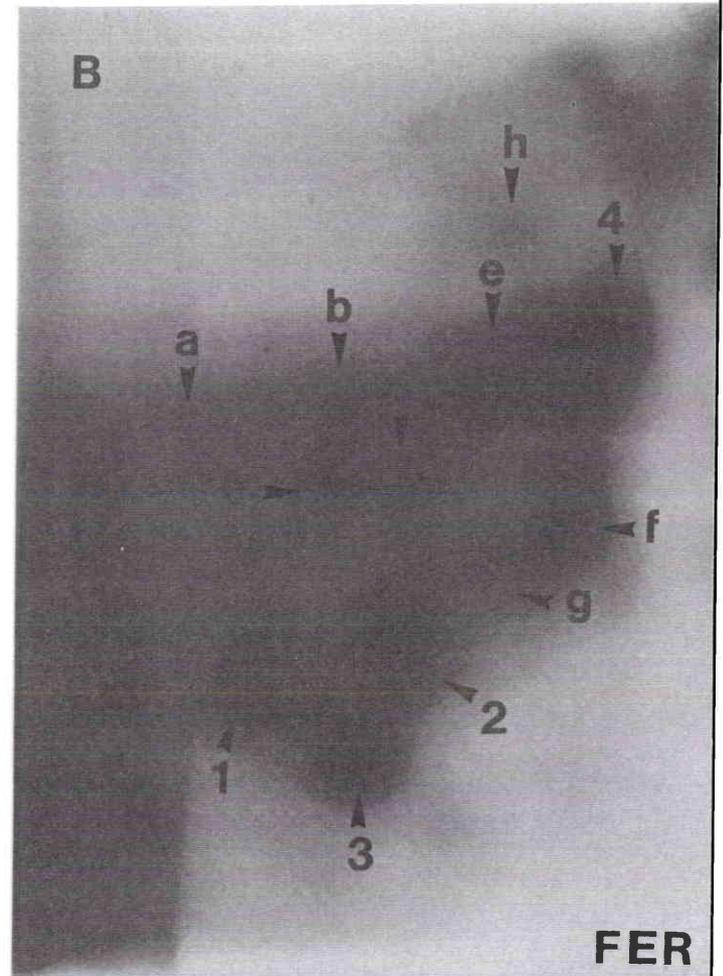
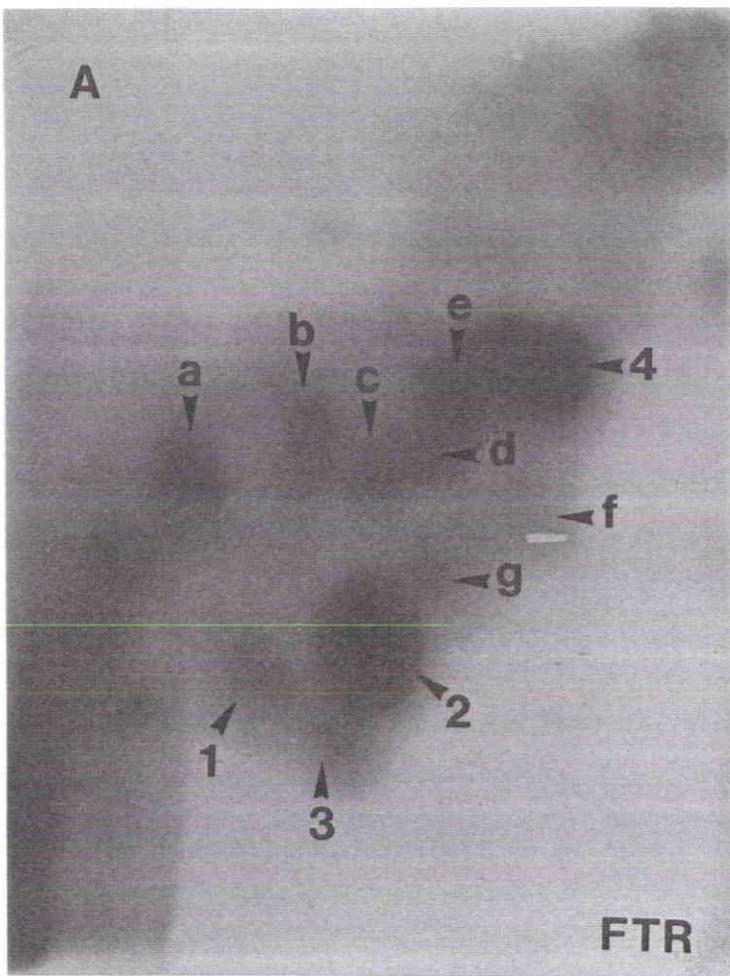


Figure 51 : Autoradiogrammes des adduits obtenus à partir de l'ADN de foie (A et B) et de poumon (C et D) de rats de laboratoire SD mâles exposés pendant 88 ± 2 h au sol témoin ISO (A et C) ou au sol pollué Repl.III (B et D). Les autoradiogrammes ont été exposés pendant 24 h.

La quantification des adduits correspondant aux taches majeures est présentée dans le tableau 31. Les essais ont été dupliqués, mais nous nous sommes basés sur les moyennes pour effectuer les calculs de taux d'induction des adduits. Un total de 54 adduits pour 10^9 Nt a été mesuré dans le foie du lot témoin, contre 102 adduits/ 10^9 Nt dans le foie du lot Repl.III, soit une induction de deux fois. Les taches mineures repérées sur l'autoradiogramme du lot témoin représentent 21 adduits pour 10^9 Nt et les taches mineures correspondant au lot Repl.III représentent 48 adduits pour 10^9 Nt. Seule une tache mineure nouvelle (h) a été détectée dans le foie des rats exposés au sol pollué ; l'effet principal provoqué par le sol pollué est l'amplification de la quantité d'adduits endogènes qui est de l'ordre de 2, aussi bien pour les adduits majeurs que pour les mineurs.

Tableau 31 : Quantification des adduits correspondant aux taches majeures repérées sur les autoradiogrammes obtenus à partir des ADN de foie de rats de laboratoire SD mâles exposés pendant 88 ± 2 h au sol témoin ISO ou au sol pollué Repl.III. Les essais ont été dupliqués.

Lot	Témoin			Repl.III			Taux d'induction
	Essai 1	Essai 2	Moyenne	Essai 1	Essai 2	Moyenne	
1	13	8	10,5	44	4	24	2,3
2	18	31	24,5	36	40	38	1,6
3	0	4	2	11	0	5,5	2,8
4	13	21	17	34	36	35	2,1
Total	44	64	54	125	80	102,5	1,9

Les valeurs sont exprimées en nombre d'adduits pour 10^9 Nt.

Le taux d'induction correspond au nombre moyen d'adduits mesurés dans l'essai divisé par le nombre moyen d'adduits mesurés dans le témoin.

Parallèlement à la détection des adduits, l'activité EROD a été mesurée dans les fractions microsomales obtenues à partir des pools d'homogénats : elle est de 55 pmol/min/mg de protéines dans le lot témoin et de 283 pmol/min/mg de protéines dans le lot Repl.III, soit une induction de 5.

III.1.1.2. Détection d'adduits dans le poumon

Les autoradiogrammes correspondant aux essais effectués sur le poumon sont présentés sur la figure 51 (B et C). Cinq taches majeures, numérotées de 1 à 5 et cinq taches mineures (a, b, c, d, e) sont détectées dans le poumon des lots témoin et Repl.III. Leur intensité est variable et la quantification des adduits correspondant aux taches majeures est présentée dans le tableau 32.

Dans le lot témoin, une moyenne de 63 adduits pour 10^9 Nt a été obtenue ; cette quantité est doublée dans le lot Repl.III (127 adduits/ 10^9 Nt). Les taches mineures représentent 16 adduits pour 10^9 Nt dans le lot témoin et 27 adduits pour 10^9 Nt dans le lot Repl.III, ce qui représente une induction de 1,7 fois. L'activité EROD mesurée dans le lot

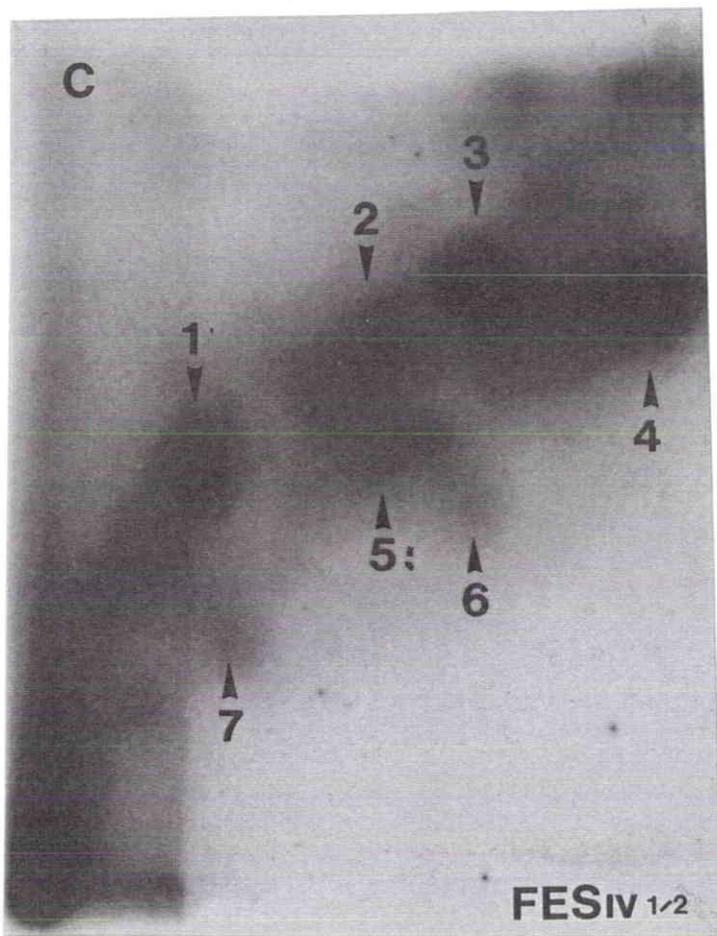
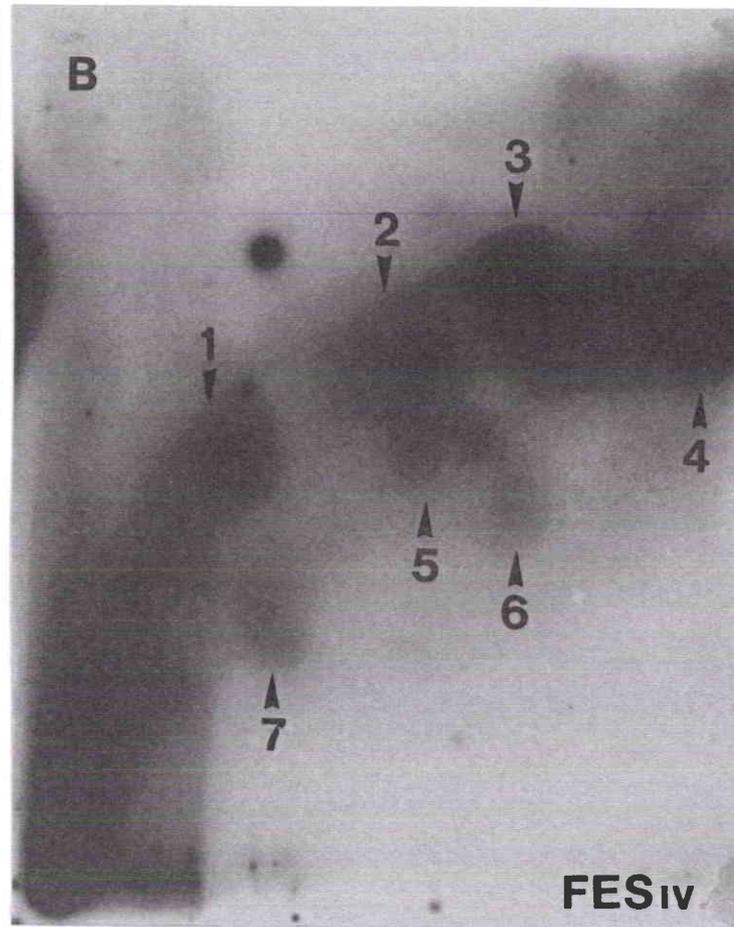
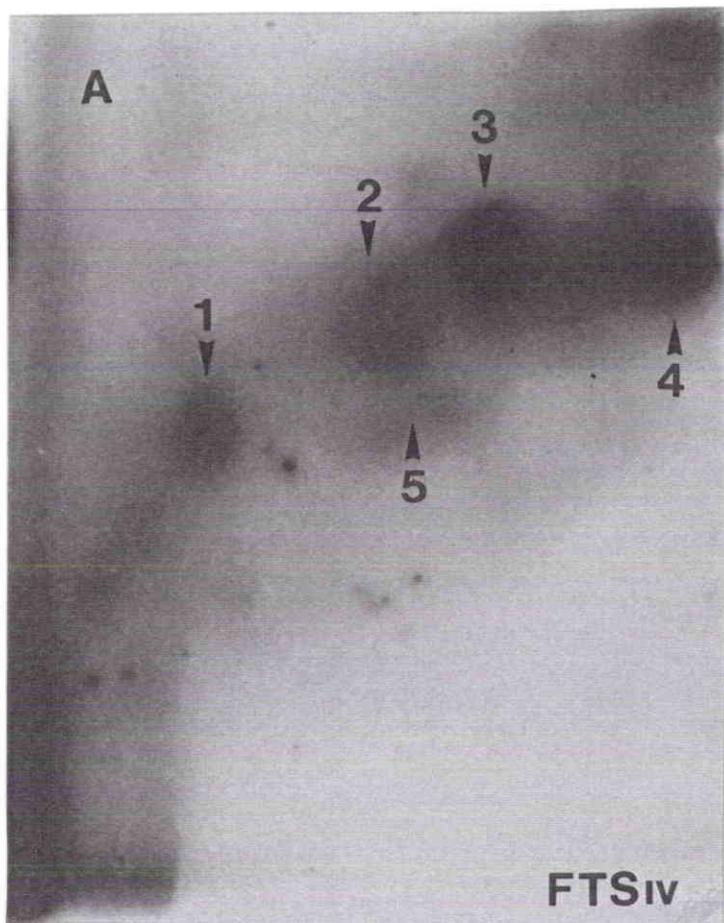


Figure 52 : Autoradiogrammes des adultes obtenus à partir de l'ADN de foie de rats de laboratoire SD mâles exposés pendant 88 ± 2 h à la matrice témoin sable (A), au sol pollué SIV (B) ou au sol SIV dilué au 1/2 avec du sable (C). Les autoradiogrammes ont été exposés pendant 40 h.

témoin est de 1,8 pmol/min/mg de protéines, contre 35,0 pmol/min/mg de protéines dans le lot Repl.III, soit une induction de 19 fois.

Tableau 32 : Quantification des adduits correspondant aux taches majeures repérées sur les autoradiogrammes obtenus à partir des ADN de poumon de rats de laboratoire SD mâles exposés pendant 88 ± 2 h au sol témoin ISO ou au sol pollué Repl.III. Les essais ont été dupliqués.

Lot	Témoin			Repl.III			Taux d'induction
	Essai 1	Essai 2	Moyenne	Essai 1	Essai 2	Moyenne	
1	9	7	8	11	29	20	2,5
2	36	40	38	55	54	54,5	1,4
3	0	0	0	0	9	4,5	-
4	10	11	10,5	20	20	20	1,9
5	6	7	6,5	31	25	28	4,3
Total	61	65	63	117	137	127	2,0

Les valeurs sont exprimées en nombre d'adduits pour 10^9 Nt.

Le taux d'induction correspond au nombre moyen d'adduits mesurés dans l'essai divisé par le nombre d'adduits mesurés dans le témoin.

En résumé, le taux d'induction de la formation d'adduits dans l'ADN de foie et de poumon de rats exposés au sol Repl.III est significatif et de l'ordre de deux, que ce soit pour les taches majeures ou mineures. On peut considérer ce résultat comme significatif et estimer que le sol Repl.III a un effet génotoxique sur les organes des animaux traités. Bien qu'il n'existe pas de similitude entre le taux d'induction d'adduits et le taux d'induction de l'activité EROD, on peut néanmoins envisager l'existence d'une relation de cause à effet entre ces deux marqueurs.

III.1.2. Rats exposés au sol SIV

Dans cette expérience, un essai de détection des adduits a été réalisé pour chaque pool (3 rats par pool et par lot).

III.1.2.1. Détection d'adduits dans le foie

Les autoradiogrammes présentés sur la figure 52 correspondent aux adduits détectés dans le foie de rats exposés à la matrice témoin sable (A) ou au sol pollué SIV non dilué (B) ou dilué au 1/2 (C) avec du sable. Dans le lot témoin, cinq taches (numérotées de 1 à 5) ont été détectées, mais deux taches supplémentaires (n° 6 et 7) ont été mises en évidence dans l'ADN de foie des rats exposés au sol SIV non dilué ou dilué au 1/2.

La quantification des adduits est présentée dans le tableau 33. La somme des adduits correspondant aux cinq taches présentes dans le lot témoin est de 49 adduits pour 10^9 Nt. A partir des sept taches, un total de 73 adduits pour 10^9 Nt et de 105 pour 10^9 Nt a été obtenu dans le foie des rats exposés au sol SIV dilué au 1/2 ou non dilué, respectivement.

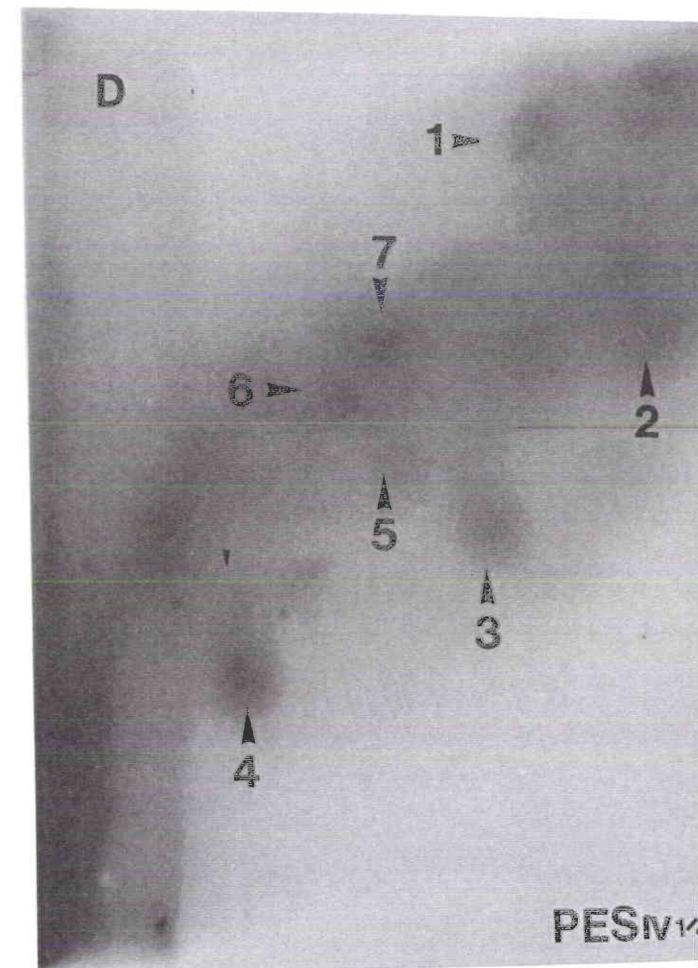
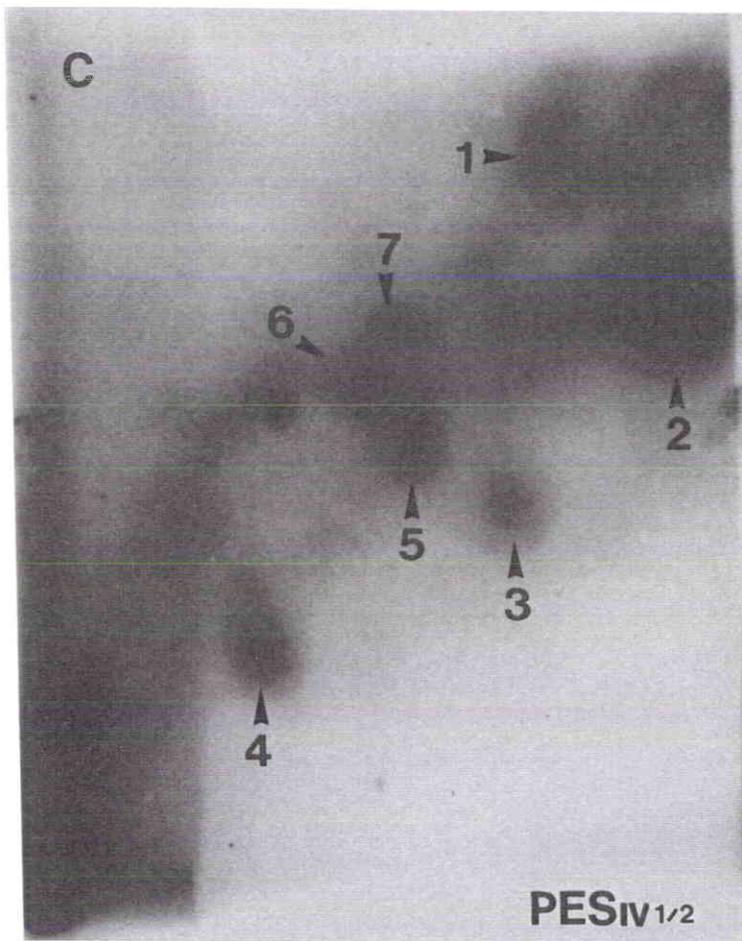
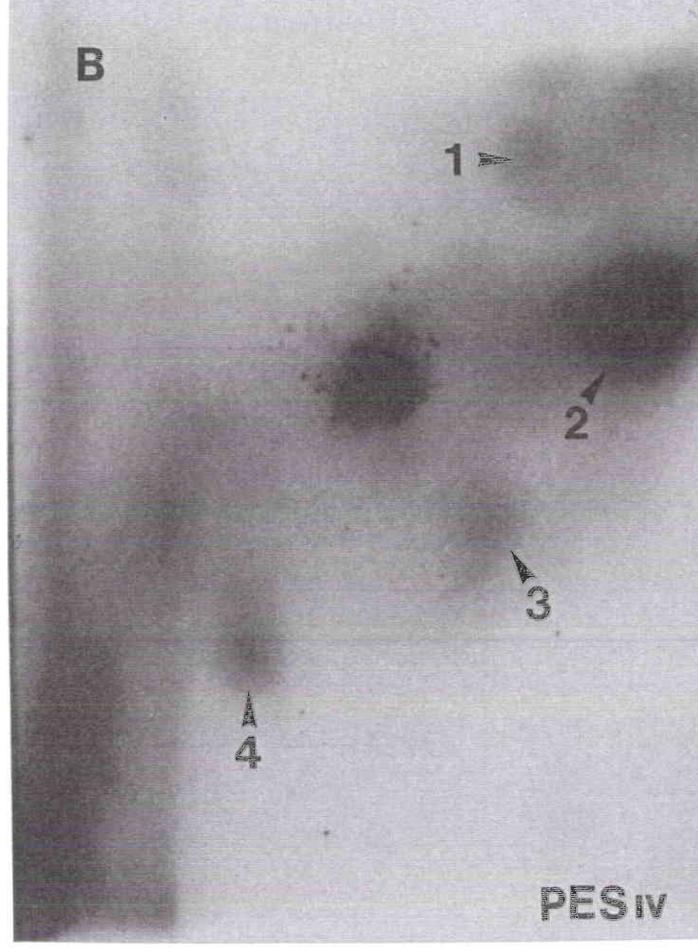
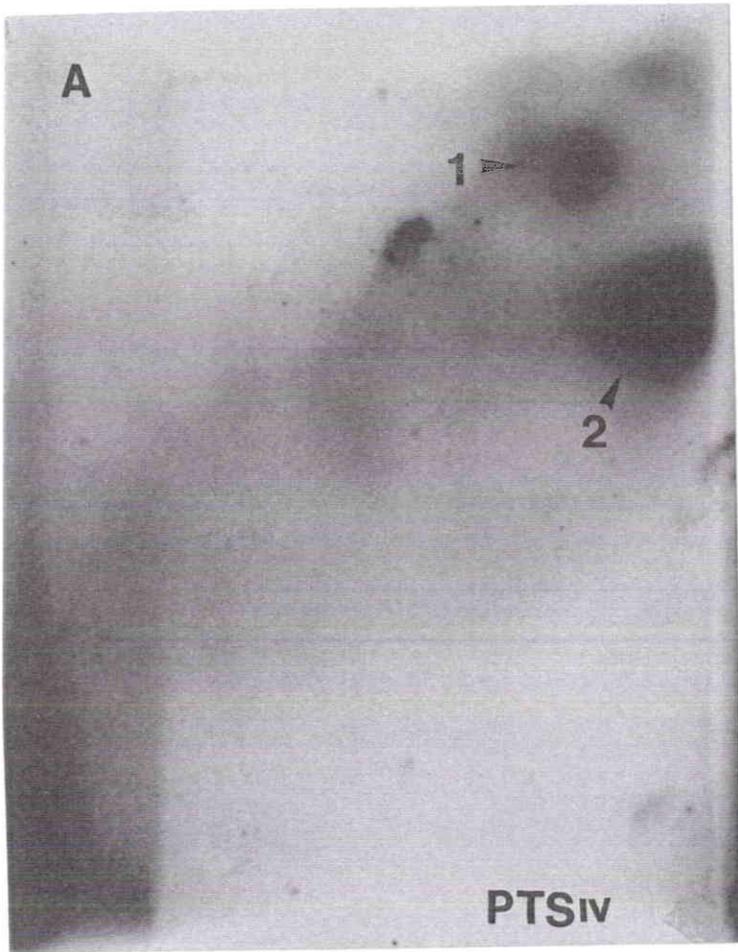


Figure 53 : Autoradiogrammes des adultes obtenus à partir de l'ADN de poumon de rats de laboratoire SD mâles exposés pendant 88 ± 2 h à la matrice témoin sable (A), au sol pollué SIV (B), au sol pollué SIV dilué au 1/2 avec du sable (C) ou au sol SIV dilué au 1/4 avec du sable (D). Les autoradiogrammes ont été exposés pendant 40 h.

L'exposition au sol SIV induit de deux fois la formation d'adduits hépatiques ; l'induction est de 1,5 fois avec le sol SIV dilué au 1/2. Les taches n° 6 et 7 sont d'une intensité comparable dans les deux lots de rats exposés au sol pollué.

Tableau 33 : Quantification des adduits correspondant aux taches repérées sur les autoradiogrammes obtenus à partir des ADN de foie de rats de laboratoire SD mâles exposés pendant 88 ± 2 h à du sable ou aux sols pollués SIV ou SIV dilué au 1/2 avec du sable.

N° tache	Témoin	SIV pur		SIV dilué au 1/2	
	Nombre d'adduits	Nombre d'adduits	Taux d'induction	Nombre d'adduits	Taux d'induction
1	6	11	1,8	12	2,0
2	6	10	1,7	9	1,5
3	17	35	2,1	22	1,3
4	14	33	2,4	16	1,1
5	4	8	2,0	8	2,0
6	0	2	-	2	-
7	0	6	-	4	-
Total	47	105	2,2	73	1,6

Les valeurs sont exprimées en nombre d'adduits pour 10^9 Nt.

Le taux d'induction correspond au nombre d'adduits mesurés dans l'essai divisé par le nombre d'adduits mesurés dans le témoin.

L'activité EROD mesurée sur les fractions microsomales obtenues à partir des homogénats est du même ordre de grandeur que celle mesurée précédemment sur des rats exposés au sol SIV (cf tableau 24) : l'activité du lot témoin est de 41,2 pmol/min/mg de protéines ; l'activité mesurée sur les lots SIV et SIV dilué au 1/2 est respectivement de 1.072 et 528 pmol/min/mg de protéines, soit une induction respective de 26 et 13 fois.

III.1.2.2. Détection d'adduits dans le poumon

Les autoradiogrammes correspondant aux essais réalisés sur le poumon sont présentés sur la figure 53. Deux taches (n° 1 et 2) ont été détectées dans l'ADN de poumon de rats exposés à du sable (A) ; deux taches supplémentaires (n° 3 et 4) ont été mises en évidence dans l'ADN de poumon de rats exposés au sol SIV (B). Dans les poumons de rats exposés au sol SIV dilué au 1/2 (C) ou au 1/4 (D) avec du sable, sept taches (numérotées de 1 à 7) ont pu être détectées.

La quantification des adduits est présentée dans le tableau 34. Les deux taches détectées dans le lot témoin contiennent un total de 30 adduits pour 10^9 Nt. Dans les taches correspondant aux lots SIV non dilué, SIV dilué au 1/2 et SIV dilué au 1/4, la quantification totale est respectivement de 34, 46 et 13 adduits pour 10^9 Nt. La quantité totale d'adduits dans l'ADN des poumons exposés aux sols pollués n'est pas significativement différente de celle mesurée dans l'ADN pulmonaire du lot témoin.

Les taches 3 à 7 apparaissent uniquement sur les autoradiogrammes obtenus à partir des poumons de rats exposés aux sols pollués et sont donc des adduits nouveaux probablement induits par la présence des polluants du sol SIV. Les résultats obtenus dans le cas de l'essai B (sol SIV non dilué) sont à première vue surprenants dans la mesure où d'une part, le nombre d'adduits est inférieur à celui obtenu avec le sol dilué (au 1/2 ou au 1/4) et d'autre part, le nombre total d'adduits est voisin de celui obtenu dans l'essai témoin.

Tableau 34 : Quantification des adduits correspondant aux taches repérées sur les autoradiogrammes obtenus à partir des ADN de poumon de rats de laboratoire SD mâles exposés pendant 88 ± 2 h à du sable ou aux sols pollués SIV, SIV dilué au 1/2 avec du sable ou SIV dilué au 1/4 avec du sable.

N° tache	Témoin	SIV pur		SIV dilué au 1/2		SIV dilué au 1/4	
	Nombre d'adduits	Nombre d'adduits	Taux d'induction	Nombre d'adduits	Taux d'induction	Nombre d'adduits	Taux d'induction
1	4	8	2,0	6	1,5	1	0,3
2	26	23	0,9	24	0,9	5	0,2
3	0	3	-	3	-	1	-
4	0	5	-	6	-	3	-
5	0	0	-	4	-	2	-
6	0	0	-	2	-	0	-
7	0	0	-	1	-	1	-
Total	30	39	1,3	46	1,5	13	0,4

Les valeurs sont exprimées en nombre d'adduits pour 10^9 Nt.

Le taux d'induction correspond au nombre d'adduits mesurés dans l'essai divisé par le nombre d'adduits mesurés dans le témoin.

L'activité EROD pulmonaire montre également un profil semblable à celui déjà observé avec des rats exposés au sol SIV dilué avec du sable, à savoir l'existence d'un plateau : avec une activité sur le lot témoin égale à 4,7 pmol/min/mg de protéines, les activités mesurées sur les lots SIV, SIV dilué au 1/2 et SIV dilué au 1/4 sont, respectivement, de 43,9, 43,1 et 44,3 pmol/min/mg de protéines. Bien que ces activités soient proches de celles déjà mesurées, les taux d'induction sont 4 fois plus faibles (de l'ordre de 9) car l'activité mesurée sur le lot contrôle est 4 fois plus élevée que lors des autres expériences (cf tableaux 23 et 25).

Au niveau hépatique, on observe une induction des adduits et de l'activité EROD. Bien que l'induction de l'activité EROD soit plus forte qu'avec le sol Repl.III, le taux d'induction des adduits est du même ordre ($\times 2$), ce qui permet de penser que le sol SIV présente une certaine génotoxicité au niveau de l'ADN du foie. Dans le poumon, l'induction des adduits est faible. Les activités EROD pulmonaires sont équivalentes dans les trois lots de sol contaminé mais le sol SIV dilué au 1/4 ou au 1/2 induit la formation de nouveaux adduits par rapport au sol témoin (mais aussi par rapport au sol SIV non dilué, essai qui pose quelques problèmes) ce

qui peut être un argument pour estimer que le sol SIV présente une certaine génotoxicité au niveau de cet organe.

III.2. Discussion

Les rats ont été exposés à des sol pollués par des HAP (Repl.III, 88 ppm ; SIV, 238 ppm) pendant un peu plus de trois jours, dans des conditions naturelles (i.e. sans administration forcée). Dans ces conditions, nous avons pu observer l'induction significative des activités EROD et la formation d'une plus grande quantité d'adduits à l'ADN dans le foie et le poumon, soit par amplification des adduits endogènes, soit par apparition d'adduits nouveaux.

Les HAP sont des polluants très répandus dans l'environnement et d'autres auteurs ont déjà montré que le nombre d'adduits à l'ADN chez des animaux vivant dans des zones contaminées par des HAP est augmenté, que ce soit chez des poissons (Dunn *et al.*, 1987 ; Van der Oost *et al.*, 1994), des mammifères marins (Martineau *et al.*, 1988) ou des mammifères semi-aquatiques (rats musqués, Halbhook *et al.*, 1992). Expérimentalement, une induction de la formation d'adduits a été observée chez des vers de terre (Walsh *et al.*, 1995) et dans des plantes (Rether, communication personnelle) exposés à des sols contaminés par des HAP. La corrélation entre la quantité d'adduits à l'ADN et l'incidence de cancers du poumon a été établie (étude épidémiologique chez des fumeurs, Ross *et al.*, 1993) ou suspectée (enfants résidant à proximité d'usines pétrochimiques, Pan *et al.*, 1994) chez l'homme et les HAP sont des produits connus pour leur caractère génotoxique et carcinogène. Par ailleurs, l'application topique, l'instillation intratrachéale et l'inhalation de certains HAP provoquent la formation de tumeurs dans la peau, le tractus respiratoire ou le poumon (Whong *et al.*, 1994).

Nos résultats montrent une induction parallèle des activités EROD hépatiques et de la quantité d'adduits à l'ADN dans les mêmes organes, mais si l'on compare les taux d'induction des adduits avec les taux d'induction des activités EROD, on peut remarquer qu'il n'existe pas de similitude entre ces différentes valeurs. Ce fait peut s'expliquer par la complexité des mécanismes intervenant dans ces voies métaboliques avec en particulier les mécanismes des systèmes de réparation de l'ADN. D'autre part, certaines molécules peuvent contribuer à induire les activités enzymatiques sans toutefois induire des adduits. Dans ce contexte, il est peu probable d'obtenir des rapports similaires entre d'une part les taux d'induction des adduits et d'autre part les taux d'induction des activités enzymatiques EROD.

La relation entre l'induction du CYP1A1 et l'induction de la formation d'adduits à l'ADN avait déjà été montrée par d'autres auteurs dans des conditions naturelles ou expérimentales. Le temps de sommeil induit au phénobarbital est réduit chez des rats musqués vivant dans une zone contaminée par des HAP, ce qui met en évidence une modification de certaines activités à cytochrome P-450 (les CYP2B notamment). Chez les rats nouveau-nés, les activités AHH et ECOD (activité éthoxycoumarine O-déséthylase, spécifique des CYP1A

et 2B) sont induites dans divers organes et tissus (poumon, rein, peau, foie, intestin) avec une intensité variable après une application unique d'une solution de goudrons de houille sur la peau ; l'application séparée des différents HAP montre une spécificité HAP-organe (Mukhtar *et al.*, 1982). Dans des travaux semblables (application sur la peau d'extraits de suie, de goudrons, de particules diesel...), plusieurs auteurs ont mis en évidence l'induction d'adduits à l'ADN dans les cellules dermiques et le poumon (Mukhtar *et al.*, 1986 ; Schoket *et al.*, 1988 ; Carmichael *et al.*, 1990 ; Gallagher *et al.*, 1990). Une corrélation a été établie entre l'activité EROD et la quantité d'adduits à l'ADN dans le foie de truites arc-en-ciel exposées à du B(a)P par injection i.p. (Masfaraud, 1992) mais il est difficile de généraliser en considérant que toute induction de l'activité EROD est liée à une induction de la formation d'adduits. En effet, le B(a)P est un inducteur du CYP1A1, mais il en est aussi un substrat et sa métabolisation par le CYP1A1 conduit à la formation de métabolites réactifs ; dans le cas d'un inducteur non substrat, la formation d'adduits à l'ADN à partir de l'inducteur est peu probable bien que d'autres molécules substrats, inductrices ou non, puissent être activées.

En outre, la corrélation entre l'induction d'adduits et le niveau de contamination du milieu est dans certains cas difficile à établir, car de nombreux facteurs endogènes ou exogènes peuvent intervenir : âge, température, saison, biodisponibilité des HAP, interactions entre les polluants (Shaw *et al.*, 1995), conditions d'exposition et surtout le choix des organes cibles étudiés.

En effet, l'ingestion est une voie d'exposition aux polluants non négligeable pour l'homme et les animaux. Les xénobiotiques sont absorbés au niveau intestinal, après une éventuelle métabolisation dans le tractus digestif (cellules et microflore intestinales). Plusieurs travaux portant sur la biodisponibilité de polluants (HAP entre autres) présents dans le sol ou associés à des gels alimentaires ont été menés : Roos *et al.* (1996) ont mis en évidence la biodisponibilité (par induction d'activités monooxygénases hépatiques) de différents HAP présents dans un sol après incorporation de 5% de sol pollué dans la nourriture habituelle de rats de laboratoire : les HAP comportant plus de 5 cycles condensés sont davantage inducteurs de l'activité EROD hépatique que les HAP de plus petite taille. Weyand *et al.* (1991, 1994) ont étudié les effets de l'ingestion de goudrons de houille (résidus d'usines à gaz) à long terme (0,05 à 0,5%, 94 et 185 j) et à court terme (0,1 à 1%, 14 j) chez des rats : dans les deux cas, la quantité d'adduits à l'ADN dans le poumon est supérieure à celle mesurée dans la partie antérieure de l'estomac et augmente avec la dose, ce qui n'est pas toujours le cas avec les adduits formés dans l'estomac.

Une exposition aux HAP par voie dermique ou orale peut conduire à des effets potentiellement carcinogènes (formation d'adduits à l'ADN) dans des organes indirectement exposés, comme le poumon. Cette hypothèse est confirmée par des études épidémiologiques mettant en évidence une recrudescence de cancer du poumon chez des mécaniciens par exemple. Cependant, le poumon est aussi un organe exposé directement par inhalation. La formation d'adduits à l'ADN dans des cellules pulmonaires a été mise en évidence après trois

instillations consécutives d'HAP à des rats (Ayrton *et al.*, 1990). L'instillation intratrachéale de particules de poussières chargées de B(a)P a montré que le B(a)P est relargué et métabolisé (en partie) dans le poumon ; la métabolisation du B(a)P *in situ* est d'autant plus élevée que le relargage est lent (ce qui évite la saturation du système de métabolisation) et il s'ensuit une quantité maximale d'adduits à l'ADN pulmonaire (Gøtze *et al.*, 1994). Lors d'un prétraitement par un inducteur de CYP1A1, le nombre d'adduits pulmonaires augmente (ce qui n'est pas le cas dans le foie) ; la présence de composés inducteurs dans les particules de poussières peut donc faciliter la formation de métabolites carcinogènes.

De plus, la détection d'adduits d'origine exogène dans les lymphocytes, le foie et le poumon de rats traités par une dose unique de B(a)P ou de benzo(b)fluoranthène montre que les xénobiotiques ou leurs métabolites génotoxiques sont disséminés dans l'organisme par la circulation sanguine. La mesure d'adduits dans les lymphocytes (qui présentent l'avantage d'être prélevés par une simple prise de sang) suffit à détecter l'exposition à des composés génotoxiques mais ne permet pas de prévoir la quantité d'adduits présents dans d'autres tissus : après une injection de B(b)F, il se forme 4 fois plus d'adduits dans le poumon que dans le foie ou les lymphocytes et la capacité de réparation est plus lente (la demi-vie des adduits est de 18 jours dans le poumon contre 8 jours dans les lymphocytes ou le foie) et moins efficace dans les cellules pulmonaires (en 56 jours, la quantité d'adduits dans le poumon est seulement diminuée de moitié, alors qu'elle est divisée par 6 dans les deux autres tissus ; Ross *et al.*, 1993).

Ces travaux montrent que le poumon est une cible particulièrement sensible aux xénobiotiques génotoxiques car : a) il est doublement exposé, b) il n'est pas armé efficacement pour la réparation de certains adduits à l'ADN et c) la présence simultanée d'inducteurs de CYP1A1 et de HAP accroît la formation de métabolites génotoxiques. Ces travaux montrent aussi la complexité des mécanismes et facteurs intervenant dans l'induction des adduits à l'ADN. En effet, la quantité d'adduits à l'ADN reflète la quantité de composés génotoxiques présents dans les cellules, mais elle intègre aussi l'activation métabolique et la détoxification, la capacité de fixation à l'ADN, l'efficacité de réparation et le renouvellement cellulaire.

Les résultats que nous avons obtenus sont dans l'ensemble en accord avec ceux des autres auteurs. Ce sont des résultats préliminaires intéressants et significatifs, même si l'induction des adduits peut paraître faible. Cependant, des études complémentaires pourraient être entreprises afin de préciser en particulier les conditions optimales dans ce type d'expérimentation. Ainsi, en utilisant la même méthode d'exposition, la cinétique de formation des adduits pourrait être suivie en faisant varier la durée de l'exposition au sol pollué. Après avoir déterminé une durée d'exposition optimale, l'efficacité de la réparation pourrait être étudiée en détectant les adduits à des délais différents après arrêt de l'exposition au sol pollué. Ces études complémentaires permettraient la mise au point d'un test de génotoxicité de sols pollués standardisé sur mammifères.

IV. Recherche d'altérations du système immunitaire chez des rats exposés au sol Repl.III

Comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, la formation de métabolites réactifs à partir des xénobiotiques peut conduire à des altérations du fonctionnement des effecteurs du système immunitaire. En se basant sur les tests proposés par le NTP, nous avons essayé de mettre en évidence des effets immunotoxiques chez les rats exposés au sol pollué Repl.III.

IV.1. Résultats

IV.1.1. Topographie du thymus

La topographie du thymus permet de détecter une déplétion cellulaire des cellules du cortex thymique.

Nous avons commencé par observer les coupes correspondant à la durée d'exposition la plus longue. Si aucune modification n'est visible sur ces coupes, il est peu probable que des modifications soient observées sur les thymus de rats exposés moins longtemps.

Les thymus de rats qui ont été exposés au sol Repl.III durant 5 semaines ne montrent pas, après une coloration topographique à l'hémalum-éosine, de différence de densité cellulaire, que ce soit au niveau du cortex ou de la médullaire thymique. Aucune différence n'est visible entre les quatre rats exposés à la sciure et les quatre rats exposés au sol Repl.III. Des colorations effectuées sur les lots exposés durant 3 semaines ne montrent pas non plus de modification.

IV.1.2. Activité NK

La mesure de l'activité des cellules NK permet d'explorer une des parties les plus sensibles de l'immunité non spécifique.

L'étape de marquage des cellules cibles nous a posé de sérieux problèmes techniques dus à une contamination mycoplasmatique de la souche de cellules cibles. Cette expérience n'a donc pas pu être menée à bien.

IV.1.3. Réponse primaire anti-KLH

Le test le plus sensible permettant de mettre en évidence une altération de la réponse anticorps est le test des PFC, mettant en jeu la réponse anticorps dirigée contre des globules rouges de mouton. Cette technique nécessitant un grand savoir-faire, nous l'avons remplacée par la mesure des IgM anti-KLH selon une méthode ELISA. La KLH est aussi un antigène T-dépendant.

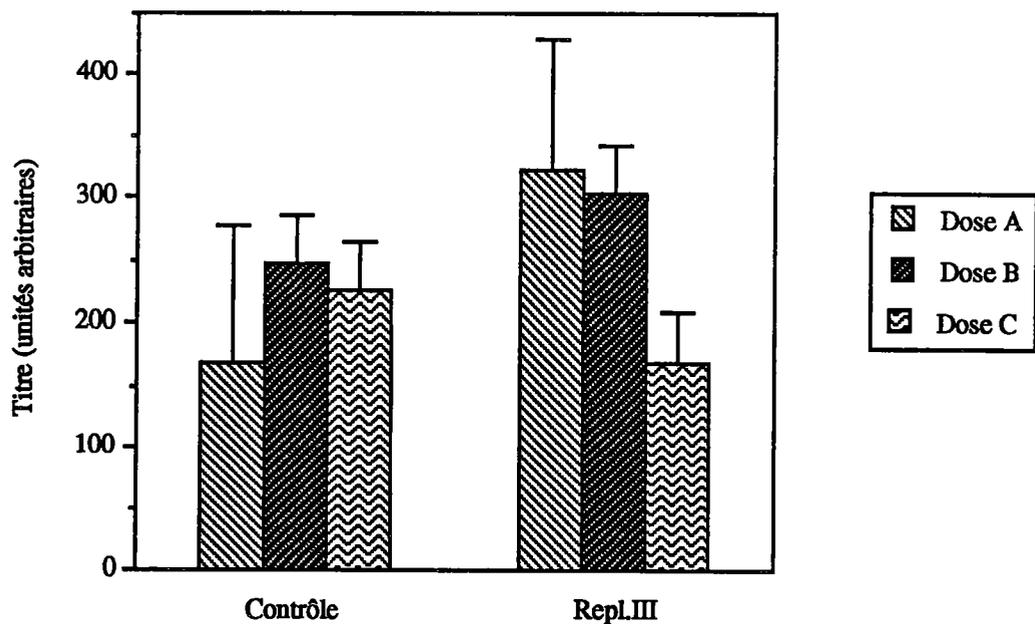


Figure 54 : Titre d'IgM anti-KLH dans les sérums de rats exposés à une litière de sciure ou de sol Repl.III pendant deux semaines, puis immunisés par une injection i.p. de KLH, à raison de 50, 100 ou 200 µg/rat (doses A, B et C, respectivement). Les rats ont été réexposés à leur litières respectives après l'immunisation. Dosage à J5 par une méthode ELISA indirecte. Titre exprimé en unités arbitraires et les barres d'erreur correspondent à l'écart type. $N = 3$ rats par lot. Chaque dosage a été triplé. Il n'y a pas de différence significative entre le titre de chaque lot sciure et le titre du lot Repl.III correspondant (test t de Student).

Nous avons effectué les mesures correspondant aux trois doses, 5 jours après l'immunisation. Les résultats présentés sur la figure 54 sont assez difficiles à interpréter : la dose A montre une différence entre le lot témoin et le lot Repl.III, la réponse IgM étant plus forte dans le lot exposé au sol contaminé. Pour les doses B et C, on n'observe pas de différence significative entre les deux lots. Selon ces résultats, la dose A devrait être retenue.

Face aux nombreux problèmes que nous avons rencontrés au niveau technique, devant le manque d'infrastructure adaptée au laboratoire et au regard de nos premiers résultats, nous n'avons pas jugé utile d'approfondir les dosages d'IgM (cinétique sur J₆ et J₇).

IV.2. Discussion

Nos résultats concernant les effets immunotoxiques dus au sol Repl.III sont assez minces. Aucune déplétion thymique n'a pu être mise en évidence, même après 5 semaines d'exposition. Les activités NK n'ont pas pu être mesurées et le dosage des IgM anti-KLH ne semble pas montrer d'altération de la réponse anticorps. Cependant, ce dernier résultat n'a pas été suffisamment approfondi (dosage limité au cinquième jour après l'immunisation) pour être considéré comme définitif. Il est difficile de conclure à partir de ces quelques données à l'existence ou à l'absence d'effets immunotoxiques.

Les altérations du système immunitaire étant généralement plus sensibles que de nombreux autres points finaux (notamment l'activité EROD, Dickerson *et al.*, 1994), il est fort probable que l'exposition de rats à des sols pollués provoque des effets immunotoxiques, mais la durée d'exposition devrait être rallongée, car les études expérimentales mettant en oeuvre des doses relativement élevées sont déjà pratiquées sur quelques semaines. Par exemple, l'administration orale d'Aroclor[®] 1254 à des rats (10, -25mg/kg pendant 15 jours) provoque une diminution de l'activité NK (Smialowicz *et al.*, 1989). Dogra *et al.* (1995) ont utilisé une approche plus expérimentale, en pratiquant des instillations intratrachéales de cendres volantes et en mesurant la réponse anticorps primaire (PFC) au niveau de la rate et des ganglions associés au poumon : la réponse spécifique d'organe est diminuée mais pas la réponse au niveau de la rate (système général) et l'association de cadmium avec les cendres accentue la réponse au niveau pulmonaire.

Chez les animaux sauvages, il est difficile de mesurer des paramètres immunologiques, car la variabilité due aux conditions de vie et à l'hétérogénéité des individus est importante. Cependant, Halbrook *et al.* (1993) ont remarqué que les rats musqués vivant dans une zone contaminée par des HAP présentaient des infections parasitaires dans une proportion beaucoup plus importante que des populations vivant dans une zone non contaminée. Cette recrudescence d'infections peut-être due à l'ingestion de proies contaminées, mais l'hypothèse d'une diminution des défenses antiparasitaires des rats musqués contaminés ne peut être écartée.

V. MESURE DE DOSES INTERNES CHEZ DES RATS EXPOSÉS À DIFFÉRENTES LITIÈRES DE SOL

V.1. Teneurs en PCB dans le foie et le poumon de rats exposés au sol SIII

Différents congénères de PCB ont été mesurés dans le foie et le poumon de rats exposés au sol SIII. Les résultats sont exprimés en mg/kg de sol (ppm) ou en µg/kg d'organe frais (ppb). Afin d'avoir une idée de la rétention des différents congénères, leur pourcentage individuel est calculé par rapport à la somme de leurs teneurs. L'analyse du sol SIII, déjà pratiquée par l'IRH, a été refaite afin que tous les échantillons soient comparables.

V.1.1. Résultats

V.1.1.1. Teneurs en PCB dans le foie

Les teneurs en PCB ont été mesurées dans le foie de rats exposés au sol SIII non dilué, au sol SIII dilué au 1/2 ["1/2 (ISO)"] ou au 1/4 avec du sol ISO ["1/4(ISO)"] et au sol SIII dilué au 1/2 avec du sable ["1/2(sable)"]. Les résultats obtenus sur les foies et sur le sol SIII sont présentés dans le tableau 35.

Le sol SIII contient 207 et 241 ppm de PCB respectivement exprimés en Aroclor® 1254 et 1260. Le total des 12 congénères dosés est égal à 93 ppm. Les congénères les plus représentés sont les hexachlorés # 138 (23,5%), #118 (19,7%) et #153 (14%) et le tétraCB #52 (10,5%). Les congénères coplanaires #169, #126 et #77 n'ont pas été détectés dans nos conditions de dosage.

Dans le foie des rats exposés au sol SIII non dilué, les teneurs exprimées en Aroclor® 1254 et 1260 sont respectivement de 1.845 et 2.031 ppb. Ces teneurs représentent un peu plus de 1% de la teneur mesurée dans le sol. Le total des 12 congénères est de 1.212 ppb et les congénères principaux sont les hexaCB #138 (22,1%), #128 (13,4%) et #153 (13%), le pentaCB #118 (18%) et le tétraCB #101 (10,5%). Seul l'hexaCB coplaire #169 n'est pas détecté. Lorsque les rats sont exposés au sol SIII dilué (avec du sable ou du sol ISO), les proportions de chaque congénère sont bien conservées, tout au moins pour ceux qui restent détectables. En comparant la proportion de chaque congénère dans le foie et dans le sol SIII, on observe un enrichissement de certains congénères dans le foie : l'hexaCB #128 est enrichi deux fois (13,4 à 17% contre 8,9% dans le sol) et le tétraCB coplaire #77 représente environ 6% du total des congénères dans le foie. Le tétraCB #52 et le pentaCB #101 sont apparemment plus rapidement métabolisés que les autres congénères qui ont des proportions semblables à celles observées dans le sol.

Tableau 35 : Teneurs en PCB dans le sol SIII, le foie et le poumon de rats SD mâles exposés durant 88 ± 2 h à une litière de ce sol. Résultats exprimés en équivalents Aroclor et en congénères de PCB.

	n	Aroclor®	Aroclor®	Total des 12	CONGÉNÈRES											
		1254	1260	congénères	#28	#52	#77	#101	#105	#118	#126	#128	#138	#153	#169	#180
Sol (1) SIII	1	207	241	93	0,5 0,5%	9,8 10,6%	<0,5 0,0%	8,9 9,6%	7,2 7,7%	18,2 19,6%	<0,5 0,0%	8,2 8,8%	21,8 23,4%	13,0 13,9%	<0,5 0,0%	5,0 5,4%
Foie (2) SIII	3	1845 ± 288 (1514-2029)	2031 ± 331 (1654-2275)	1212 ± 29 (1186-1244)	4,7 ± 4,1 (a) <0,5-7,6 0,4%	40,4 ± 28,2 (19,2-72,4) 3,3%	75,9 ± 7,0 (70-83,6) 6,3%	127,6 ± 68,1 (83,2-206) 10,5%	84,1 ± 5,7 (77,6-88) 6,9%	218,7 ± 4,8 (214-224) 18,0%	5,5 (b) <0,5-16,4 0,5%	162,1 ± 69,1 (82-205) 13,4%	268,5 ± 28,2 (236-287) 22,1%	157,7 ± 20,0 (138-179) 13,0%	<0,5 <0,5 0,0%	67,3 ± 17,2 (50-68) 5,6%
Foie (2) 1/2 (ISO)	2	1171 ± 173 (1049-1293)	1297 ± 200 (1156-1439)	722 ± 87 (661-783)	<0,5 <0,5 0,0%	14,0 ± 1,7 (12,8-15,2) 1,9%	44,8 ± 9,0 (38,4-51,2) 6,2%	54,0 ± 9,6 (47,2-60,8) 7,5%	53,4 ± 15,0 (42,8-64) 7,4%	125,6 ± 14,7 (115,2-136) 17,4%	<0,5 <0,5 0,0%	122,4 ± 9,6 (115,6-129,2) 17,0%	163,8 ± 17,8 (151,2-176,4) 22,7%	99,8 ± 9,9 (92,8-106,8) 13,8%	2,0 (a) <0,5-4 0,3%	42,2 ± 5,4 (38,4-46) 5,8%
Foie (2) 1/4 (ISO)	2	487 ± 16 (476-498)	552 ± 1 (551-553)	304 ± 10 (312-296)	<0,5 <0,5 0,0%	<0,5 <0,5 0,0%	20,2 ± 0,8 (19,6-20,8) 6,6%	24,1 ± 1,9 (22,8-25,4) 7,9%	20,3 ± 5,5 (16,5-24,2) 6,7%	53,5 ± 2,9 (51,5-55,5) 17,6%	<0,5 <0,5 0,0%	49,3 ± 1,9 (50-50,6) 16,2%	71,8 ± 0,0 (71,8-71,8) 23,6%	43,5 ± 3,2 (43,4-43,7) 14,3%	<0,5 <0,5 0,0%	21,3 ± 0,4 (21-21,5) 7,0%
Foie (2) 1/2 (sable)	3	1025 ± 312 (838-1385)	1339 ± 571 (958-1995)	746 ± 306 (543-1098)	2,5 (b) <0,5-7,6 0,3%	7,5 (b) <0,5-22,4 1,0%	44,3 ± 16,2 (31,6-62,4) 5,9%	41,3 ± 13,5 (30,4-56,4) 5,5%	52,9 ± 36,0 (29,6-94,4) 7,1%	146,1 ± 80,4 (94,4-238,8) 19,6%	<0,5 <0,5 0,0%	105,5 ± 9,4 (96-114,8) 14,1%	183,7 ± 74,1 (130,8-260,4) 24,6%	111,2 ± 49,4 (76-167,6) 14,9%	<0,5 <0,5 0,0%	51,7 ± 20,7 (34,8-74,8) 6,9%
Poumon (2) SIII	5	214 ± 75 (143-325)	272 ± 127 (177-486)	144 ± 38 (112-192)	0,3 ± 0,48 (c) (0,5-1,1) 0,2%	13,3 ± 13,4 (b) <0,5-30,3 9,2%	6,9 ± 4,7 (a) <0,5-11,4 4,8%	3,8 ± 2,7 (a) <0,5-7,2 2,7%	10,0 ± 2,7 (7,2-12,9) 7,0%	22,2 ± 7,74 (15,1-33,6) 15,4%	<0,5 <0,5 0,0%	11,8 ± 6,9 (4,7-21,3) 8,2%	36,3 ± 12,6 (23,6-55,6) 25,2%	31,4 ± 11,3 (19,8-49,1) 21,8%	<0,5 <0,5 0,0%	7,9 ± 6,8 (3,2-19,4) 5,5%
Poumon (2) 1/2 (ISO)	3	230 ± 31 (200-263)	295 ± 47 (249-342)	145 ± 7 (104-195)	<0,5 <0,5 0,0%	<0,5 <0,5 0,0%	<0,5 <0,5 0,0%	6,3 ± 5,4 (a) <0,5-10,8 4,3%	12,7 ± 6,6 (8,3-20,3) 8,8%	20,2 ± 11,8 (7,1-30,2) 13,9%	<0,5 <0,5 0,0%	14,7 ± 12,7 (a) <0,5-23,1 10,1%	48,9 ± 10,3 (42,8-60,7) 33,7%	40,0 ± 9,5 (33,6-50,9) 27,6%	<0,5 <0,5 0,0%	2,2 (b) <0,5-6,6 1,5%
Poumon (2) 1/4 (ISO)	3	127 ± 17 (184-206)	195 ± 11 (108-142)	85 ± 7 (78-91)	<0,5 <0,5 0,0%	<0,5 <0,5 0,0%	<0,5 <0,5 0,0%	3,8 ± 3,6 (a) <0,5-7,2 4,5%	6,3 ± 5,9 (a) <0,5-11,7 7,5%	11,8 ± 3,9 (7,2-14,2) 13,9%	<0,5 <0,5 0,0%	<0,5 <0,5 0,0%	33,5 ± 5,9 (26,6-37,4) 39,6%	29,3 ± 3,5 (26-33) 34,6%	<0,5 <0,5 0,0%	<0,5 <0,5 0,0%

(1) Valeur exprimée en mg/kg de sol SIII

(2) Valeur moyenne exprimée en µg/kg d'organe frais ± écart type

Les valeurs extrêmes sont indiquées entre parenthèse

Les pourcentages correspondent au rapport "100 x moyenne pour le congénère/moyenne du total des congénères"

(a) Une valeur <0,5

(b) Deux valeurs <0,5

(c) Trois valeurs <0,5

Les numéros de congénères sont les n° IUPAC (cf Annexe I)

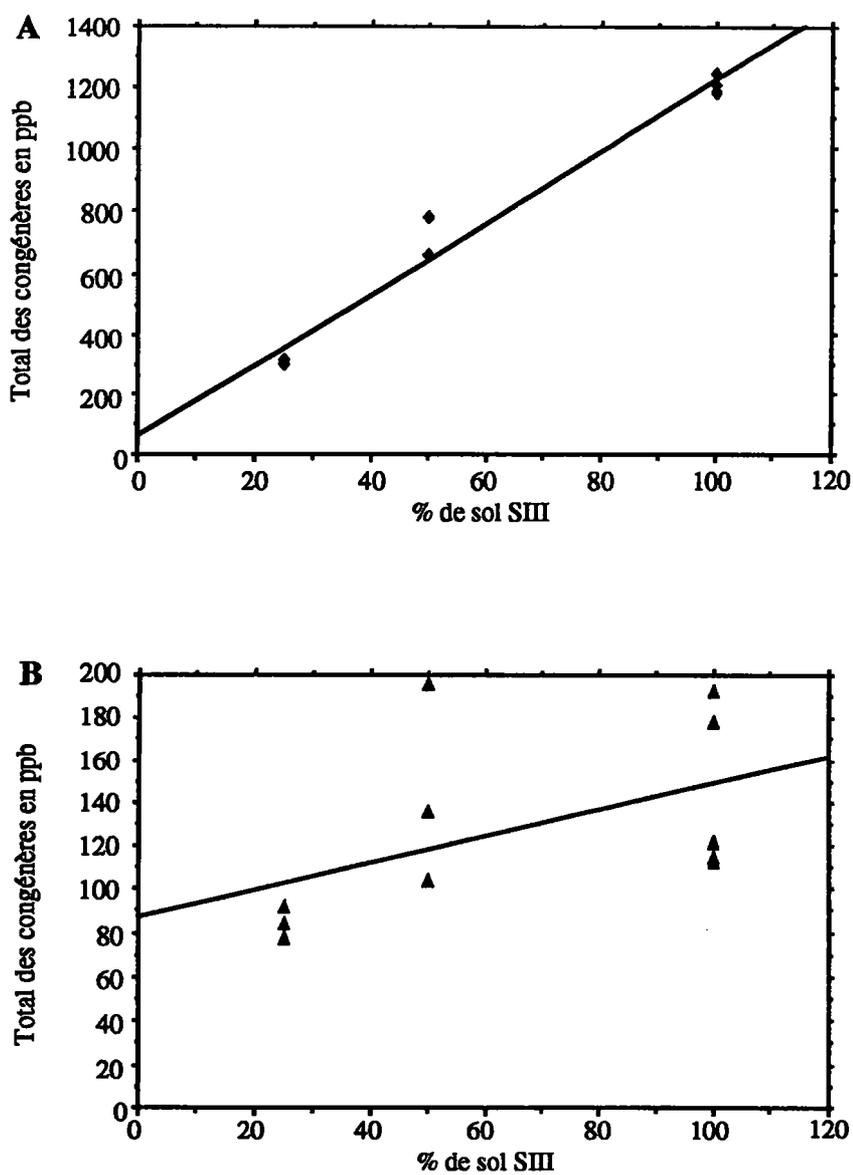


Figure 55 : Corrélations entre le total des 12 congénères de PCB mesurés dans le foie (A) et le poumon (B) et le pourcentage de sol SIII dans la litière de sol ISO. Teneurs mesurées sur les homogénats de foie et de poumon de rats SD mâles exposés aux différentes litières pendant 88 ± 2 h. $N = 6$ (foie) et $n = 10$ (poumon). Coefficients de détermination $r^2 : 0,974$, $p < 0,001$ (A) et $0,25$, $p = 0,12$ (B).

La teneur en PCB diminue lorsque les rats sont exposés au sol dilué ; elle est significativement corrélée à la teneur en sol SIII dans la litière (figure 55 ; $p < 0,001$ et $p < 0,005$, pour une teneur en PCB exprimée respectivement en total des congénères ou en équivalent Arclor®1254 ou 1260). Nous n'avons pas pu mettre en évidence de corrélation entre les activités EROD, PROD ou BROD et la teneurs en PCB, ni en considérant le total des congénères, ni en les séparant selon leur spécificité d'induction.

V.1.1.2. Teneurs en PCB dans le poumon

Les teneurs en PCB dans le poumon de rats exposés au sol SIII non dilué ou dilué au 1/2 ["1/2(ISO)"] ou au 1/4 ["1/4(ISO)"] avec le sol ISO sont présentées dans le tableau 35.

La teneur en PCB exprimée en Aroclor® 1254 ou 1260 est respectivement de 214 et 272 ppb dans le poumon de rats exposés au sol SIII non dilué et le total des 12 congénères est de 144 ppb. Tous les congénères sont détectés à l'exception des hexaCB coplanaires #126 et #169. Les congénères les plus représentés sont les hexaCB #138 (25,2%) et #153 (21,8%) et le pentaCB #118 (15,4%). Le congénère #153 est 1,5 fois plus représenté que dans le foie ou le sol. Il est intéressant de noter que dans le poumon des rats exposés au sol dilué au 1/2 et au 1/4, les congénères #138 et #153 représentent respectivement 61,3% et 74,2% du total des congénères, contre 47% seulement dans le lot exposé au sol non dilué.

La teneur en PCB dans le poumon n'est pas corrélée à la teneur en sol SIII dans la litière (figure 55 ; $p = 0,12$). Comme dans le foie, nous n'avons pas pu mettre en évidence de corrélation sentre les activités EROD, PROD ou BROD et la teneurs en PCB.

V.1.2. Discussion

Le foie contient environ 10 fois plus de PCB que le poumon et le profil des congénères est différent : alors que le foie retient le congénère #128, le poumon retient les congénères #153 et #138. Le poumon semble davantage métaboliser les autres congénères lorsque l'exposition est faible, tout en concentrant de plus en plus les congénères #153 et #138.

Les teneurs en PCB mesurées dans le foie des rats exposés au sol SIII sont de l'ordre de celles mesurées par Lubet *et al.* (1992) sur des souris (*Reithrodontomys fulvescens*) capturées sur un site contaminé (0,2 à 6 ppm). Il n'y a pas, à notre connaissance, de résultats concernant les teneurs en PCB dans le poumon de rats exposés dans des conditions naturelles. Cependant, les teneurs d'Aroclor 1254® pulmonaires sont de l'ordre de 1,5 ppm, 48 heures après l'injection i.p. de 100 mg/kg d'Aroclor 1254® à des souris (environ 13 ppm dans la carcasse ; Beebe *et al.*, 1992). Si l'on compare cette valeur à celles que nous avons observées (de l'ordre de 0,2 ppm), on peut considérer que l'exposition des rats dans nos conditions permet une exposition importante du poumon aux PCB présents dans le sol.

La métabolisation des congénères de PCB dépend du nombre et de la position de leurs substituants : les congénères faiblement chlorés (3 à 5 constituants) sont assez bien

métabolisés, de même que les congénères sur lesquels il y a au moins deux atomes de carbone vicinaux non substitués. Les congénères sont stockés sans sélectivité dans les tissus adipeux, mais il existe une rétention spécifique de certains congénères dans différents organes (foie, poumon, rein) ou tissus (muqueuse olfactive ou intestinale, prostate ; revue par Anderson *et al.*, 1993). Lubet *et al.* (1992) avaient montré la prédominance des congénères #138, #153, #99 et #180 qui représentaient, respectivement, 32,8, 14,5, 13,7 et 11,8 % des congénères mesurés chez dans le foie de souris sauvages exposées à des PCB. Les congénères #128, #105 et #118 avaient des proportions de l'ordre de 6%. Bien que nous n'ayons pas dosé les mêmes congénères, nos résultats concordent dans le sens où le congénère #138 est le plus représenté (22-24,6%), suivi du congénères #153 (environ 13-15%), alors que le congénères #105 est faiblement retenu. Par contre, nous n'avons pas observé la rétention du congénère #180 et le congénères #118 et #128 sont beaucoup plus fortement retenus (respectivement, 18 et 15%) que dans le foie des souris.

Au niveau pulmonaire, les congénères #153 et #138 sont fortement retenus, surtout lorsque les rats sont exposés au sol SIII dilué. Le poumon est un organe connu pour bien retenir les PCB (par rapport à la carcasse), notamment les congénères hexachlorés #105 et #138 (Beebe *et al.*, 1991 ; Anderson *et al.*, 1993). Le poumon n'est pas un organe à forte teneur lipidique et cette spécificité de rétention peut être expliquée en partie par la forte affinité des dérivés méthylsulfonés des PCB pour une protéine "utéroglobin-like", présente dans les cellules de Clara (revue par Beebe *et al.*, 1992) ; la rétention congénères coplanaires #126 et #169 est en partie due à leur fixation sur le CYP1A2, dont ils peuvent induire la synthèse par un mécanisme *Ah* dépendant (De Jongh *et al.*, 1993).

La rétention spécifique conduit à des effets spécifiques d'organes, comme l'induction durable par les congénères inducteurs de CYP1A1 (#105, #169, #126...) ou de CYP2B1 (#153...) : l'injection i.p. d'une seule dose d'Aroclor 1254[®] chez des souris provoque l'induction de l'activité EROD pulmonaire pendant plus de 30 semaines (100 mg/kg) voire un an (500 mg/kg ; Beebe *et al.*, 1991) ; l'activité BROD n'est modifiée qu'à forte dose (500 mg/kg) mais cette activité est inhibée malgré la présence de composés inducteurs de CYP2B par l'action antagoniste d'autres congénères, notamment le congénère #105 (2,3,3',4,4' CB).

Une étude expérimentale menée par Henneman *et al.* (1994) sur des rongeurs de l'espèce *Sigmodon hispidus* avait mis en évidence un plateau de l'activité EROD lorsque la teneur en Aroclor 1254[®] hépatique dépassait 120 ppb. Bien que les teneurs hépatiques des rats exposés au sol SIII soient de l'ordre de 1 ppm, nous n'avons observé qu'un faible ralentissement de l'induction (cf. tableau 18). L'induction de l'activité EROD n'est pas toujours linéaire en fonction de la teneur pulmonaire en congénères inducteurs de CYP1A1 ; l'établissement d'une toxicité cellulaire inhibant la réponse et la présence de congénères antagonistes peuvent expliquer ce défaut d'induction (Beebe *et al.*, 1992).

V.2. Teneurs en métaux dans le foie de rats exposés aux sols SI, SIII ou SIV

V.2.1. Résultats

Les teneurs en plomb, cadmium et zinc ont été mesurées dans le foie des rats exposés au sol SI, SIII et SIV et dans ces trois sols (tableau 36).

Tableau 36 : Teneurs en plomb, cadmium et zinc dans les sols SI, SIII et SIV et dans le foie de rats exposés à ces sols ou au sol ISO pendant 88 ± 2 h.

Echantillon		<i>n</i>	Plomb	Cadmium	Zinc
Sol (1)	SI	1	2 300	37,5	n.d.
	SIII	1	1 250	22,3	n.d.
	SIV	1	2 905	<5	n.d.
Foie (2)	ISO	3	3,4 ± 0,35 (3,0-3,6)	<0,025 -	401,7 ± 77,5 (325-480)
	SI	4	9,1 ± 0,6 <i>a</i> (8,25-9,8)	0,40 ± 0,17 (0,20-0,58)	n.d.
	SIII	2	16,6 ± 8,0 <i>a</i> (11-22,3)	<0,025 -	103,5 ± 11,5 <i>a</i> (92-115)
	SIV	4	19,3 ± 10,8 <i>a</i> (9,4-34,6)	0,54 ± 0,28 <i>b</i> (<0,025-0,74)	84,8 ± 16,3 <i>a</i> (63-100)

(1) Teneur exprimée en mg/kg de sol

(2) Teneur moyenne exprimée en mg/kg de matière sèche ± écart type. Les valeurs extrêmes sont signalées entre parenthèse.

a Teneur significativement différente de la teneur obtenue sur le sol ISO, test de Bonferroni, $p < 0,05$.

b Moyenne calculée à partir des deux valeurs supérieures à 0,025 ppm.

Les teneurs en cadmium obtenues sur les sols SIII et SIV sont semblables à celles fournies par l'IRH ainsi que la teneur en plomb du sol SIII ; ce métal n'avait pas été dosé par l'IRH dans le sol SIV et nous trouvons une teneur de 2.905 ppm. Les valeurs correspondant au sol SI sont assez différentes des valeurs théoriques, puisque nous avons mesuré 2.300 ppm de plomb et 37,5 ppm de cadmium, contre respectivement 800 ppm et 50 ppm attendus. Nous n'avons pas dosé le zinc dans ces échantillons.

Les teneurs hépatiques en plomb sont faibles chez les rats exposés au sol ISO, mais elles sont toutes significativement supérieures à cette valeur chez les rats exposés aux trois sols pollués. Il n'existe pas de différence significative entre les teneurs moyennes en Pb dans le foie des rats exposés aux différents sols contaminés. Cependant, bien que les sols SI et SIV aient des teneurs voisines, le foie des rats exposés au sol SV contient en moyenne deux fois plus de Pb que le foie des rats exposés au sol SI, et les rats exposés au sol SIII (le moins contaminé) présentent également des teneurs hépatiques supérieures à celles du sol SI.

Les rats exposés au sol SI contiennent des teneurs en cadmium de l'ordre de 0,4 ppm. Les teneurs en cadmium dans le foie de rats exposés au sol SIV sont difficilement explicables,

étant donné qu'il n'a pas été détecté de Cd dans ce sol. Inversement, bien que 22 ppm de Cd aient été mesurés dans le sol SIII, ce métal n'est pas retrouvé dans le foie des rats qui y sont exposés.

Les sols SIII et SIV ont des teneurs en zinc très voisines (2.270 et 2.080 ppm, respectivement, valeurs de l'IRH) et les rats exposés à ces sols ont des teneurs hépatiques en Zn 4 fois plus faibles que celles mesurées chez les rats exposés au sol témoin ISO.

V.2.2. Discussion

Les teneurs en *cadmium* observées ici sont du même ordre ou sont inférieures à celles données dans la littérature, mesurées sur des petits mammifères capturés sur des sites pollués (Everett & Anthony, 1976 ; Beardsley *et al.*, 1978 ; Anderson *et al.*, 1982 ; Maly, 1984 ; Ma *et al.*, 1991). Ces valeurs mesurées sur le terrain ou dans nos conditions sont en dessous des valeurs entraînant un effet toxique (Shore & Douben, 1994b). Les teneurs en *plomb* sont voisines de celles mesurées dans le foie de souris vivant à proximité moins de 300 m d'une usine de récupération de batteries (Kisseberth *et al.*, 1984) ou de rats vivants dans différentes zones urbaines (Way & Schroder, 1982) ou aux abords d'une voie à fort trafic routier (Beardsley *et al.*, 1978). Le *zinc* est un métal qui n'a pas d'effets toxiques au dessous de 2.000 ppm dans le foie et les concentrations mesurées ici ne portent pas à conséquences.

Les faibles valeurs en Zn observées chez les rats exposés à des sols contaminés par environ 2.000 ppm de zinc sont assez surprenantes si on les compare aux valeurs obtenues sur le sol ISO. Cependant, les teneurs en zinc du sol ISO ne sont pas connues et il est possible qu'il soit particulièrement riche en cet élément. Le plomb présent dans le sol contaminé artificiellement SI semble moins biodisponible que le plomb présent dans les sols SIII et SIV, à pollution mixte (organique et métallique). Bien que ces deux sols aient des teneurs différentes (du simple au double), les teneurs observées dans le foie des rats sont semblables. Par contre, le cadmium semble plus disponible dans le sol SI que dans le sol SIII. La différence de biodisponibilité des métaux que l'on peut soupçonner entre chaque sol peut s'expliquer par a) des interactions synergiques avec les polluants organiques, b) les caractéristiques physicochimiques des sols (teneur en matière organique, pH...) et/ou c) la spéciation des métaux. Le plomb a été apporté dans le sol SI sous forme d'acétate de plomb trihydraté, une forme facilement biodisponible, mais l'évolution de la spéciation des métaux dans le sol n'est pas connue et nous ne pouvons affirmer qu'au moment des expositions, tout le plomb présent dans le sol SI était sous la forme du sel d'origine.

CONCLUSION

L'étude *in situ* du site pollué de Replonges nous a permis de mettre en évidence la biodisponibilité de polluants chez des rats vivant sur le site en mesurant l'induction des activités monooxygénases à cytochrome P-450. Des résultats semblables avaient déjà été présentés par plusieurs équipes, mais cette approche ne permettant pas de faire une étude approfondie de la relation qui existe entre la réponse biologique et le niveau et la nature de la contamination du sol, nous avons développé un bioessai de laboratoire, qui consiste à exposer des rats à une litière de sol pollué sans administration forcée. La biodisponibilité des polluants peut être mesurée par divers biomarqueurs enzymatiques, le plus sensible de ceux que nous avons testés étant l'activité EROD hépatique et pulmonaire. Les taux d'induction observés dans le foie et le poumon de rats exposés à différents sols pollués par des HAP et/ou des PCB sont relativement importants : supérieurs aux taux observés sur le terrain, ils sont parfois du même ordre de grandeur que ceux observés lors d'études expérimentales, que ce soit dans le poumon ou dans le foie.

Pour la première fois, la biodisponibilité de polluants organiques dans le poumon d'animaux exposés naturellement à des sols pollués a été montrée. Le poumon est exposé aux polluants par la voie sanguine et par inhalation, ce qui en fait un organe de choix pour la mise en évidence d'une exposition à des polluants. L'activité EROD, souvent utilisée chez différentes espèces comme biomarqueur d'exposition à des polluants chimiques, est généralement mesurée dans le foie, mais nous avons montré que l'activité EROD pulmonaire répond mieux que l'activité hépatique et peut être considérée comme un excellent biomarqueur d'exposition.

Le protocole d'exposition au laboratoire a été mis au point pour obtenir une réponse optimale des activités monooxygénases hépatiques et pulmonaires, mais la durée de l'exposition peut être modulée pour optimiser la réponse d'autres biomarqueurs d'exposition ou d'effets. Les doses internes de PCB mesurées dans le foie sont semblables à celles déjà observées chez des animaux sauvages vivant sur des sites contaminés, mais il n'a pas été publié à notre connaissance de valeurs concernant les teneurs pulmonaires. Comme nous l'avons vu, les activités antioxydantes ne sont pas sensiblement modifiées par le sol pollué Repl.III, même après deux mois d'exposition, mais l'induction de l'activité EROD nous a permis de supposer l'existence d'effets toxiques liés à la production de métabolites réactifs par le CYP1A1. L'augmentation de la quantité d'adduits dans le foie et le poumon a confirmé cette hypothèse. Cependant, ces résultats ne sont que préliminaires et mériteraient d'être approfondis après optimisation du protocole d'exposition. En effet, les adduits pouvant être réparés, il serait intéressant d'étudier la cinétique et le niveau de leur réparation. Divers biomarqueurs de génotoxicité (échanges de chromatides soeurs, détection d'aneuploïdie...)

pourraient également être mesurés après optimisation du protocole. Nos essais concernant la mesure de paramètres immunologiques ont été infructueux, mais cet échec est dû à des problèmes techniques plutôt que conceptuels. En effet, le système immunitaire étant plus sensible que les autres systèmes de défense aux agressions par les produits chimiques, il est fort probable que l'exposition de rats ou de souris pendant plusieurs semaines à des sols pollués provoque des effets immunotoxiques.

La relation dose-réponse peut être étudiée en diluant les sols pollués avec une matrice non contaminée : au niveau hépatique, l'activité EROD est corrélée à la teneur en sol pollué par des inducteurs, mais est très sensible à la présence de matière organique, notamment avec le sol SIV, pollué par des HAP. Au niveau pulmonaire, l'activité EROD est plus sensible à la présence de polluants inducteurs que l'activité hépatique, mais sa capacité d'induction est limitée et son activité présente rapidement un plateau avec les sols fortement pollués.

Le choix de la matrice de dilution peut se discuter en fonction des objectifs fixés. Le sol ISO, composé de sable, de kaolin et de tourbe (70:20:10) est assez représentatif d'un sol courant, mais la matière organique qu'il contient diminue la biodisponibilité de certains composés. Si le but de l'expérimentation est seulement la mise en évidence de la biodisponibilité de polluants présents dans le sol, il suffit de tester le sol non dilué. Lorsque la réponse est positive et que l'on cherche à situer le niveau de pollution du sol par rapport à l'intensité de la réponse, il est préférable de pratiquer quelques dilutions afin de détecter une éventuelle saturation dans la réponse du biomarqueur (cas observé avec l'activité EROD pulmonaire). Si l'on veut déterminer la dernière dilution provoquant un effet sur un biomarqueur donné, il est préférable de diluer le sol avec une matrice permettant d'obtenir une relation linéaire entre la réponse du biomarqueur et la teneur en sol dans la litière. Il n'est pas possible d'exprimer les résultats en DE₅₀ car ce type de calcul nécessite la connaissance du taux d'induction 100%, impossible à déterminer dans nos conditions expérimentales.

Ce bioessai pourrait être utilisé pour vérifier l'efficacité de mesures de bioremédiation de sols pollués, en complément avec une vérification basée sur des tests bactériens. En effet, la bioremédiation des HAP par des micro-organismes n'est pas efficace avec tous les HAP car les bactéries sont surtout sensibles aux molécules de petite taille : les HAP comportant plus de quatre cycles sont peu biodisponibles donc peu toxiques pour les bactéries (Wang *et al.*, 1990), alors que ces mêmes HAP sont les plus toxiques pour les mammifères. L'évaluation de l'efficacité du traitement d'un sol à partir de tests bactériens (Microtox[®], test d'Ames) ne permet donc pas de conclure quant à la toxicité du sol pour les mammifères, donc pour l'homme.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADESNIK M. & ATCHISON M. – 1986 – Genes for cytochrome P-450 and their regulation, *Crit. Rev. Biochem.*, **19** (3), 247-305.
- ALCOCK R.E. & JONES K.C. – 1993 – Polychlorinated biphenyls in digested UK sewage sludges, *Chemosphere*, **26** (12), 2199-2207.
- ALSHARIF N.Z., LAWSON T. & STOHS S.J. – 1994a – Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin is mediated by the aryl hydrocarbon (*Ah*) receptor complex, *Toxicology*, **92**, 39-51
- ALSHARIF N.Z., SCHLUETER W.J. & STOHS S.J. – 1994b – Stimulation of NADPH-dependent reactive oxygen species formation and DNA damage by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rat peritoneal lavage cells, *Arch. environ. Contam. Toxicol.*, **26**, 392-397.
- AMARO A.R., OAKLEY G.G., BAUER U., SPIELMANN H.P. & ROBERTSON L.W. – 1996 – Metabolic activation of PCBs to quinones: reactivity toward nitrogen and sulfur nucleophiles and influence of superoxide dismutase, *Chem. Res. Toxicol.*, **9** (3), 623-629.
- ANDERSON L.M., FOX S.D., RIGGS C.W. & ISSAQ H.J. – 1993 – Selective retention of polychlorinated biphenyl congeners in lung and liver after single-dose exposure of infant mice to Aroclor 1254, *J. environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, **12** (1), 3-16.
- ANDERSON T.J., BARRETT G.W., CLARK C.S., ELIA V.J. & MAJETI V.A. – 1982 – Metal concentration in tissues of meadow voles from sewage sludge-treated fields, *J. environ. Qual.*, **11** (2), 272-277.
- ANONYME – 1995 – Bioassay for soils. In : *4th report of the interdisciplinary DECHEMA Committee "Environmental biotechnology-soil"*, Klein J. (Ed.), Dechema, Frankfurt, 1-45.
- ARINÇ E. – 1993 – Extrahepatic microsomal forms: lung microsomal cytochrome P450 isozymes. In : *Cytochrome P450. Handb. experimental Pharmacol.* **105**, Schenkman J.B. & Greim H. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Chap. 24, 373-386.
- ASOKAN P., DAS M., DIXIT R. & MUKHTAR H. – 1985 – Interaction of certain metal ions with aryl hydrocarbon hydroxylase of rat lung microsomes, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **57**, 72-77.
- ASSMUTH T. & VARTIAINEN T. – 1994 – Concentrations of 2,3,7,8-chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans at landfills and disposal sites for chlorophenolic wood preservative wastes, *Chemosphere*, **28** (5), 971-979.

- ATKINSON A., MEEKS R.G. & ROY D. – 1993 – Increased oxidative stress in the liver of mice treated with trichloroethylene, *Biochem. mol. Biol. int.*, **31** (2), 297-304.
- AYRTON A.D., MCFARLANE M., WALKER R., NEVILLE S., COOMBS M.M. & IOANNIDES C. – 1990 – Induction of the P-450 I family of proteins by polycyclic aromatic hydrocarbons: possible relationship to their carcinogenicity, *Toxicology*, **60**, 173-186.
- BABO S. & VASSEUR P. – 1992 – *In vitro* effects of Thiram on liver antioxidant activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquat. Toxicol.*, **22**, 61-68.
- BAGCHI M. & STOHS S.J. – 1993 – *In vitro* induction of reactive oxygen species by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, endrin, and lindane in rat peritoneal macrophages, and hepatic mitochondria and microsomes, *Free radic. Biol. Med.*, **14** (1), 11-18.
- BALDWIN R.W. – 1973 – Immunological aspects of chemical carcinogenesis, *Adv. Cancer Res.*, **18**, 1-77.
- BALLSCHMITTER K. & ZELL M. – 1980 – Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **302**, 20-31.
- BANDIERA S., SAFE S. & OKEY A.B. – 1982 – Binding of polychlorinated biphenyls classified as either phenobarbitone-, 3-methylcholanthene- or mixed-type inducers to cytosolic Ah receptor, *Chem. Biol. Interact.*, **38**, 259-277.
- BANSAL A.K., BHATNAGAR D. & BHARDWAJ R. – 1992 – Lipid peroxidation and activities of antioxygenic enzymes *in vitro* in mercuric chloride treated human erythrocytes, *Bull. environ. Contam. Toxicol.*, **48**, (1), 89-94.
- BARKER C.W., FAGAN J.B. & PASCO D.S. – 1994 – Down-regulation of P4501A1 and P4501A2 mRNA expression in isolated hepatocytes by oxidative stress, *J. biol. Chem.*, **269** (6), 3985-3990.
- BARON J. & VOIGT J.M. – 1990 – Localization, distribution, and induction of xenobiotic-metabolizing enzymes and aryl hydrocarbon hydroxylase activity within lung, *Pharmacol. Ther.*, **47**, 419-445.
- BATT A.M., STRAZIELLE N. & SIEGST G. – 1993 – Induction et répression des cytochromes P450. Approche *in vivo* et *in vitro*, *Thérapie*, **48**, 527-536.
- BATTY J., LEAVITT R.A., BIONDO N. & POLIN D. – 1990 – An ecotoxicological study of a population of the white footed mouse (*Peromyscus leucopus*) inhabiting a polychlorinated biphenyls-contaminated area, *Arch. environ. Contam. Toxicol.*, **19**, 283-290.
- BEARDSLEY A., VAGG M.J., BECKETT P.H.T. & SANSOM B.F. – 1978 – Use of the field vole (*M. agrestis*) for monitoring potentially harmful elements in the environment, *Environ. Pollut.*, **16**, 65-71.

BEEBE L., FOX S.D., RIGGS C.W., PARK S.S., GELBOIN H.V., ISSAQ H.J. & ANDERSON L.M. – 1992 – Persistent effects of a single dose of Aroclor 1254 on cytochromes P450IA1 and IIB1 in mouse lung, *Toxicol. appl. Pharmacol.*, **114**, 16-24.

BEEBE L., PARK S.S. & ANDERSON L.M. – 1990 – Differential enzyme induction of mouse liver and lung following a single low or high dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), *J. biochem. Toxicol.*, **5** (4), 211-219.

BEEBE L.E., FORNWALD L.W., RIGGS C.W. & ANDERSON L.M. – 1995 – Suppression of pulmonary P4502b and induction of hepatic, intestinal and kidney P4501a-1 and 1a-2 in the *Ah*-responsive and non-responsive mouse by Aroclor 1254, *Xenobiotica*, **25** (6), 541-551.

BEEBE L.E., FOX S.D., ISSAQ H.J. & ANDERSON L.M. – 1991 – Biological and biochemical effects of retained polyhalogenated hydrocarbons, *Environ. Toxicol. Chem.*, **10**, 757-763.

BEERS RF. & SIZER W.I. – 1952 – A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, *J. Biol. Chem.*, **195**, 133-140.

BELFROID A., VAN DEN BERG M., SEINEN W., HERMENS J. & VAN GESTEL K. – 1995 – Uptake, bioavailability and elimination of hydrophobic compounds in earthworms (*Eisenia andrei*) in field-contaminated soil, *Environ. Toxicol. Chem.*, **14** (4), 605-612.

BEREZIAT J-C., RAFFALLI F., SCHMEZER P., FREI E., GENESTE O. & LANG M.A. – 1995 – Cytochrome P450 2A of nasal epithelium: regulation and role in carcinogen metabolism, *Mol. Carcinog.*, **14**, 130-139.

BHAGWAT S.V., BOYD M.R. & RAVINDRANATH V. – 1995a – Rat brain cytochrome P450. Reassessment of monooxygenase activities and cytochrome P450 levels, *Drug Metab. Dispos.*, **23** (6), 651-654.

BHAGWAT S.V., BOYD M.R. & RAVINDRANATH V. – 1995b – Brain mitochondrial cytochromes P450: xenobiotic metabolism, presence of multiple forms and their selective inducibility, *Arch. Biochem. Biophys.*, **320** (1), 73-83.

BHATIA A. & KAUR J. – 1993 – Recent advances in immunomodulatory effects of some chemical pollutants: a review, *Int. J. environ. Stud. Sect. A*, **45** (1), 61-70.

BHATIA A., TOBIL F., LEPSCHY G., WERK X. & MAZZUCCO K. – 1994 – Biomonitoring of pollution: the hepatic cytochrome P-450 enzyme system in the feral mouse *Apodemus flavicollis* as indicator, *Chemosphere*, **28** (8), 1525-1537.

BLANCK J. & RUCKPAUL K. – 1993 – Lipid-protein interactions. In : *Cytochrome P450. Handb. Exp. Pharm.* **105**, Schenkamn J.B. & Greim H. (Eds.), Springer Verlag, Berlin, Chap. 37, 581-597.

BOBOVNIKOVA T., DIBTSEVA A., MITROSHKOV A. & PLESKACHEVSKAYA G. – 1993 – Ecological assessment of a region with PCB emissions using samples of soil, vegetation and breast milk: a case study, *Sci. total Environ.*, **139-140**, 357-364.

BONDY S.C. & NADERI S. – 1994 – Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species, *Biochem. Pharmacol.*, **48** (1), 155-159.

BORDET F., MALLET J., MAURICE L., BORREL S. & VENANT A. – 1993 – Organochlorine pesticide and PCB congener content of french human milk, *Bull. environ. Contam. Toxicol.*, **50**, 425-432.

BOSVELD A.T.C. – 1995 – Effects of polyhalogenated aromatic hydrocarbons on piscivorous avian wildlife, Thèse de doctorat d'Université, Rijkuniversiteit, Utrecht, 171p.

BRUGEILLES L. – 1995 – La réhabilitation des sites pollués orphelins s'accélère, *La lettre de l'Ademe*, (27), 2.

BUCK W.B. – 1979 – Animals as monitors of environmental quality, *Vet. hum. Toxicol.*, **21** (4), 277-284.

BULL K.R., ROBERTS R.D., INSKIP M.J. & GOODMAN G.T. – 1977 – Mercury concentrations in soil, grass, earthworms and small mammals near an industrial emission source, *Environ. Pollut.*, **12**, 135-140.

BURGEAP – 1993 – Ancien dépotoir à vidanges, lieu-dit “ les Fougères ”, Replonges (01). Diagnostic de sécurité environnement, rapport final, 10 novembre 1993, Ademe Rhône-Alpes, 45 p.

BURKE M.D., THOMPSON S., ELCOMBE C.R., HALPERT J., HAAPARANTA T. & MAYER R.T. – 1985 – Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450, *Biochem. Pharmacol.*, **34** (18), 3337-3345.

CARMICHAEL P.L., JACOB J., GRIMMER G. & PHILLIPS D.H. – 1990 – Analysis of the polycyclic aromatic hydrocarbon content of petrol and diesel engine lubricating oils determination of DNA adducts in topically treated mice by ³²P-postlabelling, *Carcinogenesis*, **11** (11), 2025-2032.

CARPENTER D.O., SUK W.A., BLAHA K. & CIKRT M. – 1996 – Hazardous wastes in Eastern and Central Europe, *Environ. Health Perspect.*, **104** (3), 244-248.

CHALOUPKA K., STEINBERG M., SANTOSTEFANO M., RODRIGUEZ L.V., GOLDSTEIN L. & SAFE S. – 1995 – Induction of Cyp1a-1 and Cyp1a-2 gene expression by a reconstituted mixture of polynuclear aromatic hydrocarbons in B6C3F1 mice, *Chemico-biol. Interact.*, **96**, 207-221.

CIFONE M.G., NAPOLITANO T., FESTUCCIA C., CANTALINI M.G., DENUNTIIS G., SANTONI G., MARINELLI G. & SANTONI A. – 1991 – Effects of cadmium on cytotoxic functions of human natural killer cells, *Toxicol. in vitro*, **5** (5-6), 525-528.

CONNEY A.H. – 1967 – Pharmacological implications of microsomal enzyme induction, *Pharmacol. Rev.*, **19** (3), 317-366.

COOKE A.S. – 1973 – Shell thinning in avian eggs by environmental pollutants, *Environ. Pollut.*, (4), 85-152.

CROSS C.E., WATANABE T.T., HASEGAWA G.K., GORALNIK G.N., ROERTGEN K.E., KAIZU T., REISER K.M., GORIN A.B. & LAST J.A. – 1979 – Biochemical assays in lung homogenates: artefacts caused by trapped blood after perfusion, *Toxicol. appl. Pharmacol.*, **48**, 99-109.

D'SOUZA S.J., NARURKAR L.M. & NARURKAR M.V. – 1994 – Induction of xenobiotic metabolizing enzymes in rat lymphocytes, *Med. Sci. Res.*, **22**, 451-453.

DAVIS D. & SAFE S. – 1990 – Immunosuppressive activities of polychlorinated biphenyls in C57BL/6N mice: structure-activity relationships as Ah receptor agonists and partial antagonists, *Toxicology*, **63**, 97-111.

DE HEER C., SCHUURMAN H.J., VOS J.G. & LOVEREN H. – 1994 – Lymphodepletion of the thymus cortex in rats after single oral intubation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, *Chemosphere*, **29** (9/11), 2295-2299.

DE JONGH J., WONDERGEM F., SEINEN W. & VAN DEN BERG M. – 1993 – Toxicokinetic interactions between chlorinated aromatic hydrocarbons in the liver of the C57BL/6J mouse: I. Polychlorinated biphenyls (PCBs), *Arch. Toxicol.*, **67**, 453-460.

DE VITO M.J., MA X., BABISH J.G., MENACHE M. & BIRNBAUM L.S. – 1994 – Dose-response relationships in mice following subchronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: CYP1A1, CYP1A2, estrogen receptor, and protein tyrosine phosphorylation, *Toxicol. appl. Pharmacol.*, **124**, 82-90.

DEAN J.H., CORNACOFF J.B. & LUSTER M.I. – 1990 – Toxicity to the immune system: a review, *Immunopharmacol. Rev.*, **1** (6), 377-408.

DECAT G. & LEONARD A – 1985 – Analyse chromosomique des lymphocytes de rats sauvages vivant au voisinage d'un cours d'eau contaminé par des effluents d'installation nucléaires, *C.R. Soc. Biol.*, **179**, 480-486.

DENISON M.S. & WHITLOCK J.P. – 1995 – Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes, *J. biol. Chem.*, **270** (31), 18175-18178.

- DHAUNSI G.S., SINGH I. & HANEVOLD C.D. – 1993 – Peroxisomal participation in the cellular response to the oxidative stress of endotoxin, *Mol. cell. Biochem.*, **126**, 25-35.
- DICKERSON R., HOWIE L., DAVIS D. & SAFE S. – 1990 – The structure-dependent effects of hepatochlorodibenzofuran isomers in male C57BL/6 mice: immunotoxicity and monooxygenase enzyme induction, *Fundam. appl. Toxicol.*, **25**, 298-307.
- DICKERSON R.L., HOOPER M.J., GARD N.W., COBB G.P. & KENDALL R.J. – 1994 – Toxicological foundations of ecological risk assessment: biomarker development and interpretation based on laboratory and wildlife species, *Environ. Health Perspect. Suppl.*, **102** (12), 65-69.
- DIETER M.P., LUSTER M.I., BOORMAN G.A., JAMESON C.W., DEAN J.H. & COX J.W. – 1983 – Immunological and biochemical responses in mice treated with mercuric chloride, *Toxicol. appl. Pharmacol.*, **68**, 218-228.
- DING X. & COON M.J. – 1993 – Extrahepatic microsomal forms: olfactory cytochrome P450. In : *Cytochrome P450. Handb. Exp. Pharm.* **105**, Schenkman J.B. & Greim H. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Chap. 22, 351-361.
- DIX T.A. & MARNETT L.J. – 1984 – Detection of the metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives to ultimate carcinogens during lipid peroxidation, *Methods Enzymol.*, **105**, 347-352.
- DOGRA S., KHANNA A.K. & KAW J.L. – 1995 – Alterations in the pulmonary and systemic immune response in rats exposed to coal fly ash, *Immunopharmacology*, **29**, 103-109.
- DRABKIN D.L. & AUSTIN J.H. – 1935 – Spectrophotometric studies. preparations from washed blood cells, nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin, *J. Biol. Chem.*, **112**, 51-65.
- DRAGNEV K.H., BEEBE L., JONES C.R., FOX S.D., THOMAS P.E., NIMS R.W. & LUBET R.A. – 1994 – Subchronic dietary exposure to Aroclor 1254 in rats: accumulation of PCBs in liver, blood, and adipose tissue and its relationship to induction of various hepatic drug-metabolizing enzymes, *Toxicol. appl. Pharmacol.*, **125**, 111-122.
- DUBOIS M., PFOHL-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.
- DUNN B.P., BLACK J.J. & MACCUBIN A. – 1987 – ³²P postlabelling analysis of aromatic DNA adducts in fish from polluted areas, *Cancer Res.*, **47**, 6543-6548.
- ELANGBAM C.S., QUALLS C. & CONFER A.W. – 1991a – Evaluation of ultrastructural hepatic response to environmental toxicants in wild cotton rats (*Sigmodon hispidus*), *Bull. environ. Contam. Toxicol.*, **47**, 321-328.

- ELANGBAM C.S., QUALLS C.W. & LOCHMILLER R.L. – 1991b – *O*-dealkylation of resorufin ethers as an indicator of hepatic cytochrome P-450 isoenzyme induction in the cotton rat (*Sigmodon hispidus*): a method for monitoring environmental contamination, *Bull. environ. Contam. Toxicol.*, **47**, 23-28.
- ESSER C. – 1994 – Dioxins and the immune system: mechanisms of interference, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **104**, 126-130
- EVERETT J.J. & ANTHONY R.G. – 1976 – Heavy metal accumulation in muskrats in relation to water quality, *Trans. Northeastern Sect. Wildl. Soc.*, **33**, 105-108.
- EXON J.H., BUSSIERE J.L. & MATHER G.G. – 1990 – Immunotoxicity testing in the rat: an improved multiple assay model, *Int. J. Immunopharmacol.*, **12** (6), 699-701.
- EXON J.H., KERKVLIEET N.I. & TALCOTT P.A. – 1987 – Immunotoxicity of carcinogenic pesticides and related chemicals, *J. environ. Sci. Health*, **C5** (1), 73-120.
- FLETCHER C.L. & MCKAY W.A. – 1993 – Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) in the aquatic environment: a literature review, *Chemosphere*, **26** (6), 1041-1069.
- FLICKINGER E.L. & NICHOLS J.D. – 1990 – Small mammal populations at hazardous waste disposal sites near Houston, Texas, USA, *Environ. Pollut.*, **65**, 169-180.
- FLOWERS-GEARY L., BLECKZINSKI W., HARVEY R.G. & PENNING T.M. – 1996 – Cytotoxicity and mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbon *O*-quinones produced by dihydrodiol deshydrogenase, *Chemico-biol. Interact.*, **99**, 55-72.
- FLOWERS-GEARY L., HARVEY R.G. & PENNING T.M. – 1993 – Cytotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon *O*-quinones in rat and human hepatoma cells, *Chem. Res. Toxicol.*, **6** (3), 252-260.
- FORKERT P.G., VESSEY M.L., ELCE J.S., PARK S.S., GELBOIN H.V. & COLE S.P.C. – 1986 – Localization of phenobarbital- and 3-methylchloranthrene- inducible cytochromes P-450 in mouse lung with monoclonal antibodies, *Res. Commun. chem. Pathol. Pharmacol.*, **53** (2), 147-157.
- FOSTER J.R., ELCOMBE C.R., BOOBIS A.R., DAVIES D.S., SESARDIC D., McQUADE J., ROBSON R.T., HAYWARD C. & LOCK E.A. – 1986 – Immunochemical localization of cytochrome P-450 in hepatic and extra-hepatic tissues of the rat with a monoclonal antibody against cytochrome P-450 *c*, *Biochem. Pharmacol.*, **35** (24), 4543-4554.
- FOTH H. – 1995 – Role of the lung in accumulation and metabolism of xenobiotic compounds: implications for chemically induced toxicity, *Crit. Rev. Toxicol.*, **25** (2), 165-205.

FOUCHECOURT M.O. & RIVIERE J.L. – 1995 – Activities of cytochrome P-450 dependent monooxygenases and antioxidant enzymes in different organs of Norway rats (*Rattus norvegicus*) inhabiting reference and contaminated sites, *Chemosphere*, **31** (11-12), 4375-4386.

FOUCHECOURT M.O. & RIVIERE J.L. – 1996 – Activities of liver and lung cytochrome P450-dependent monooxygenases and antioxidant enzymes in laboratory and wild Norway rats exposed to reference and contaminated soils, *Arch. environ. Contam. Toxicol.*, **30**, 513-522.

FOWLE J.R. & SEXTON K. – 1992 – EPA priorities for biologic markers research in environmental health, *Environ. Health Perspect.*, **98**, 235-241.

FUCHS B.A. & SANDERS V.M. – 1994 – The role of brain-immune interactions in immunotoxicology, *Crit. Rev. Toxicol.*, **24** (2), 151-176.

FUNAE Y., SEO R. & IMAOKA S. – 1985– Multiple forms of cytochrome P-450 from microsomes of rat liver, kidney, and lung resolved by high-performance liquid chromatography, *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **11** (4), 523-531.

FÜRST P., KRAUSE G.H.M., HEIN D., DEISCHEN T. & WILMERS K. – 1993 – PCDD/PCDF in cow's milk in relation to their levels in grass and soil, *Chemosphere*, **27** (8), 1349-1357

GALLAGHER J.E., JACKSON M.A., GEORGE M.H. & LEWTAS J. – 1990 – Dose-related differences in DNA adduct levels in rodent tissues following skin application of complex mixtures from air pollution sources, *Carcinogenesis*, **11** (1), 63-68

GANDINI P., BOERSMA P.D., FRERE E., GANDINI M., HOLIK T. & LICHTSCHEIN V. – 1994 – Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) affected by chronic petroleum pollution along coast of Chubut, Argentina, *Auk*, **111** (1), 20-27.

GERMOLEC D.R., ADAMS N.H. & LUSTER M.I. – 1995 – Comparative assessment of metabolic enzyme levels in macrophage populations of the F344 rat, *Biochem. Pharmacol.*, **50** (9), 1495-1504.

GESCHWIND S.A., STOLWIJK J.A.J., BRACKEN M., FITZGERALD E., STARK A., OLSEN C. & MELIUS J. – 1992 – Risk of congenital malformations associated with proximity to hazardous waste sites, *Am. J. Epidemiol.*, **135** (11), 1197-1207.

GEYER H.J., SCHEUNERT I., RAPP K., GEBEFUGI I., STEINBERG C. & KETTRUP A. – 1993 – The relevance of fat content in toxicity of lipophilic chemicals to terrestrial animals with special reference to dieldrin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), *Ecotoxicol. environ. Saf.*, **26**, 45-60.

GILBERTSON M., KUBIAK T., LUDWIG J. & FOX G. – 1991 – Great Lakes embryo mortality, edema and deformities syndrome (glemeds) in colonial fish-eating birds: similarity to chick edema-disease, *J. Toxicol. environ. Health*, **33**, 455-520.

GOEPTAR A.R., SCHEERENS H. & VERMEULEN N.P.E. – 1995 – Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450, *Crit. Rev. Toxicol.*, **25** (1), 25-65.

GOLDSTEIN J.A. & FALETTO M.B. – 1993 – Advances in mechanisms of activation and deactivation of environmental chemicals, *Environ. Health Perspect.*, **100**, 169-176.

GONZALEZ M.J., JIMENEZ B., FERNANDEZ M. & HERNANDEZ L.M. – 1991 – PCBs, PCDDs and PCDFs in soil samples from uncontrolled burning of waste electrical material for metal reclamation, *Toxicol. environ. Chem.*, **33**, 169-179.

GØTZE P.P., LINDESKOG P. & TORNQUIST C.S.I. – 1994 – Effects of induction and age-dependent enzyme expression on lung bioavailability, metabolism, and DNA binding of urban air particulate-absorbed benzo[a]pyrene, 2-nitrofluorene, and 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyridol-(4,3)-indole, *Environ. Health Perspect. Suppl.*, **102** (4), 147-156.

GUT J., KAWATO S., CHERRY R.J., WINTERHALTER K.H. & RICHTER C. – 1985 – Lipid peroxidation decreases the rotational mobility of cytochrome P-450 in rat liver microsomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **817**, 217-228.

HALBROOK R.S., KIRKPATRICK R.L., BEVAN D.R. & DUNN B.P. – 1992 – DNA adducts detected in muskrats by ³²P-postlabeling analysis, *Environ. Toxicol. Chem.*, **11**, 1605-1613.

HALBROOK R.S., KIRKPATRICK R.L., SCANLON P.F., VAUGHAN M.R. & VEIT H.P. – 1993 – Muskrat populations in Virginia's Elizabeth river: physiological condition and accumulation of environmental contaminants, *Arch. environ. Contam. Toxicol.*, **25**, 438-445.

HALONEN I., TARHANEN J., OKSANEN J., VILOKKI H., VARTIAINEN T. & RUUSKANEN J. – 1993 – Formation of organic chlorinated compounds in incineration of pulp and paper mill biosludges, *Chemosphere*, **27** (7), 1253-1268.

HANIOKA N., JINNO H., TOYO'OKA T., NISHIMURA T. & ANDO M. – 1995 – Induction of rat liver drug-metabolizing enzymes by tetrachloroethylene, *Arch. environ. Contam. Toxicol.*, **28** (3), 273-280.

HÄNNINEN O., LINDSTROM-SEPPA P., PESONEN M. & HARRI M. – 1985 – Cytochrome P-450 and its implication in environmental problems. In : *Proceedings of the 5th international conference on "Cytochrome P-450, Biochemistry, Biophysics and Induction"*, Vereczkey L. & Magyar K. (Eds.), Budapest, August 21-24 1985, 549-555.

- HANSEN L.G. – 1987 –Environmental toxicology of polychlorinated biphenyl. In : *Polychlorinated biphenyls (PCBs) : mammalian and environmental toxicology, Environ. Toxin Ser.1*, Safe S. & Hutzinger O. (Eds.), Springer Verlag, Berlin, 1987, 15-48.
- HANSEN L.G., LI M.-H., SAEED A. & BUSH B. – 1995 – Environmental polychlorinated biphenyls: acute toxicity of landfill soil extract to female prepubertal rats, *Arch. environ. Contam. Toxicol.*, **29**, 334-343.
- HANSON C.D. & SMIALOWICZ R.J.– 1994 – Evaluation of the effect of low-level 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure on cell mediated immunity, *Toxicology*, **88**, 213-224.
- HARADA K., OHMORI S., NAGANO M. & MIURA H. – 1990 – Effects of lead on drug metabolizing enzymes, cytochrome P-450 and hemeoxygenase in rats, *Jpn. J. ind. Health*, **32**, 33-40.
- HARDIN J.A., HINOSHITA F. & SHERR D.H. – 1992 – Mechanisms by which benzo[a]pyrene, an environmental carcinogen, suppresses B cell lymphopoiesis, *Toxicol. appl. Pharmacol.*, **117** (2), 155-164.
- HARPER B.L., WARD J.B., RAMANUJAM V.M.S., AMMENHEUSER M.M., AU W.W., MOSLEN M.T. & LEGATOR M.S. – 1989 – A combined testing protocol for assessing genotoxicity in individual animals: application to environmental toxicology, *J. appl. Toxicol.*, **9** (2), 97-102.
- HARRAD S.J., SEWART A.P., ALCOCK R., BOUMPHREY R., BURNETT V., DUARTE-DAVIDSON R., HALSALL C., SANDERS G., WATERHOUSE K., WILD S.R. & JONES K.C. – 1994 – Polychlorinated biphenyls (PCBs) in the british environment: sinks, sources and temporal trends, *Environ. Pollut.*, **85**, 131-146.
- HARTREE E.F. – 1972 – Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response, *Anal. Biochem.*, **48**, 422-427.
- HASHIMOTO Y. & DEGAWA M. – 1995 – Induction of cytochrome P450 isoforms by carcinogenic aromatic amines and carcinogenic susceptibility of rodent animals, *Pharmacogenetics*, (5), S80-S83.
- HENNEMAN J.R., FOX S.D., LUBET R.A., WARD J.M. & NIMS R.W. – 1994 – Induction of cytochrome P-450 in *Sigmodon hispidus* (cotton rats) exposed to dietary aroclor 1254, *J. Toxicol. environ. Health*, **41**, 369-386.
- HOUK V.S. – 1992 – The genotoxicity of industrial wastes and effluents. A review, *Mutat. Res.*, **277**, 91-138.

IARC – 1987 – Methods, results and conclusions, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs columns 1 to 42, Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Lyon, march 10-18 1987, 38-55.

ILBÄCK N.G. – 1991 – Effects of methyl mercury exposure on spleen and blood natural killer (NK) cell activity in the mouse, *Toxicology*, **61** (1), 117-124.

INGELMAN-SUNDBERG M., JOHANSSON I., YIN H., TERELIUS Y., ELIASSON E., CLOT P. & ALBANO E. – 1993 – Ethanol-inducible cytochrome P4502E1: genetic polymorphism, regulation, and possible role in the etiology of alcohol-induced liver disease, *Alcohol*, **10**, 447-452.

JAMES R.C., BUSCH H., TAMBURRO C.H., ROBERTS S.M., SCHELL J.D. & HARBISON R.D. – 1993 – Polychlorinated biphenyl exposure and human exposure, *J. occup. Med.*, **35** (2), 136-148.

JAYYOSI Z., LIVERTOUX M.H., BATT A.M. & SIEST G. – 1991 – Inhibition des cytochromes P-450. Mécanismes biochimiques et conséquences thérapeutiques éventuelles. I. Inactivation par complexation réversible, *J. Toxicol. clin. exp.*, **11** (1), 9-30.

KADRY A.M., SKOWRONSKI G.A., TURKALL R.M. & ABDEL-RAHMAN M.S. – 1995 – Comparison between oral and dermal bioavailability of soil-adsorbed phenanthrene in female rats, *Toxicol. Lett.*, **78**, 153-163.

KAMRIN M.A. & RINGER R.K. – 1993 – PCB residues in mammals: a review, *Toxicol. environ. Chem.*, **41**, 63-84.

KAO J. & CARVER M.P. – 1990 – Cutaneous metabolism of xenobiotics, *Drug Metab. Rev.*, **22** (4), 363-410.

KAPPUS H. – 1985 – Lipid peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance. In : *Oxydative stress*, Sies H. (Ed.), Academic, London, 273-310.

KAPPUS H. – 1993 – Metabolic reactions: role of cytochrome P-450 in the formation of reactive oxygen species, In : *Cytochrome P450. Handbook of experimental pharmacology*. Vol.105, Schenkman J.B. & Greim H. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, 1993, Chap. 9, 145-154.

KEITH I.M., OLSON E.B., WILSON N.M. & JEFCOATE C.R. – 1987 – Immunological identification and effects of 3-methylcholanthrene and phenobarbital on rat pulmonary cytochrome P-450, *Cancer Res.*, **47**, 1878-1882.

KENDALL R.J. – 1992– Farming with agrochemicals, the response of wildlife, *Environ. Sci. Technol.*, **26** (2), 239-245.

KENDALL R.J., FUNSCH J.M. & BENS C.M. – 1990 – Use of wildlife for on-site evaluation of bioavailability and ecotoxicity of toxic substances found in hazardous waste sites. In : *In situ evaluations of biological hazards of environmental pollutants*, Sandhu S.S (Ed.), Plenum Press, New York, 241-255.

KERKVLIT N.I. & BRAUNER J.A. – 1990 – Flow cytometric analysis of lymphocyte subpopulations in the spleen and thymus of mice exposed to an acute immunosuppressive dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), *Environ. Res.*, **52**, 146-154.

KERKVLIT N.I., BAECHEER-STEPPAN L., SMITH B.B., YOUNGBERG J.A., HENDERSON M.C. & BUHLER D.R. – 1990 – Role of the *Ah* locus in suppression of cytotoxic T lymphocyte activity by halogenated aromatic hydrocarbons (PCBs and TCDD): structure-activity relationships and effects in C57BI/6 mice congenic at the *Ah* locus, *Fundam. appl. Toxicol.*, **14**, 532-541.

KIERDORF U., KIERDORF H., SEDLACEK F. & FEJERSKOV O. – 1996 – Structural changes in fluorosed dental enamel of red deer (*Cervus elaphus L.*) from a region with severe environmental pollution by fluorides, *J. Anat.*, **188**, 183-195.

KIKKAWA Y. – 1992 – Diverse role of pulmonary cytochrome P-450 monooxygenase, *Lab. Invest.*, **67** (5), 535-539.

KIM H., REDDY S. & NOVAK R.F. – 1995 – 3-methylcholanthrene and pyridine effects on CYP1A1 and CYP1A2 expression in rat renal tissue, *Drug Metab. Dispos.*, **23** (8), 818-824

KIMBER I. – 1991 – Toxicology and the immune system: a perspective, *Hum. exp. Toxicol.*, **10**, 445-449.

KIMURA S., KOZAK C.A. & GONZALES F.J. – 1989 – Identification of a novel P-450 expressed in rat lung: cDNA cloning and sequence, chromosome mapping, and induction by 3-methylcholanthrene, *Biochemistry*, **28**, 3798-3803.

KISSEBERTH W.C., SUNDBERG J.P., NYBOER R.W., REYNOLDS J.D., KASTEN S.C. & BEASLEY V.R. – 1984 – Industrial lead contamination of an Illinois wildlife refuge and indigenous small mammals, *J. am. vet. med. Assoc.*, **185** (11), 1309-1313.

KIZER D.E., CLOUSE J.A., RINGER D.P., HANSON-PAINTON O., VAZ A.D., PALAKODETY R.B. & GRIFFIN M.J. – 1985 – Assessment of rat liver microsomal epoxide hydrolase as a marker of hepatocarcinogenesis, *Biochem. Pharmacol.*, **34** (10), 1795-1800.

KOPPONEN P., TARHANEN J., RUUSKANEN J., TÖRRÖNEN R. & KÄRENLAMPI S. – 1993 – Peat induces cytochrome P450IA1 in hepa-1 cell line. Comparison with fly ashes from combustion of peat, coal, heavy fuel oil and hazardous waste, *Chemosphere*, **26** (8), 1499-1506.

KRAUTHACKER B. & REINER E. – 1994 – Intake of organochlorine compounds and levels in population groups. In : *Chemical safety. International reference manual*, Richardson M. (Ed.), New York USA, VCH-Publishers, 1994, 157-170.

KRZYSTYNIAK K., FOURNIER M., TROTTIER B., NADEAU D. & CHEVALIER G. – 1987 – Immunosuppression in mice after inhalation of cadmium aerosol, *Toxicol. Lett.*, **38**, 1-12.

KUBIAK T.J., HARRIS H.J., SMITH L.M., SCHWARTZ T.R., STALLING D.L., TRICK J.A., SILEO L., DOCHERTY D.E. & ERDMAN T.C. – 1989 – Microcontaminants and reproductive impairment of the Foster's tern on Green Bay, lake Michigan - 1983, *Arch. environ. Contam. Toxicol.*, **18**, 706-727.

KUDO S. – 1994 – Differentiation of Clara cells and pneumocytes of the rat by means of enzyme- and immunohistochemistry, *Anat. Rec.*, **238**, 49-56.

LANDIS W.G. & YU M-Ho – 1995 – Introduction to environmental toxicology impacts of chemicals upon toxicological systems, Lewis Publishers, Boca-Raton, ISBN 0-87371-515-2, 329 p.

LANG D.S., MEIER K. & LUSTER M. – 1993 – Comparative effects of immunotoxic chemicals on *in vitro* proliferative responses of human and rodent lymphocytes, *Fundam. appl. Toxicol.*, **21**, 535-545.

LAWRENCE D.A. – 1985 – Immunotoxicity of heavy metals. In : *Immunotoxicology and Immunopharmacology*, Dean J. (Ed.), Raven Press, New-York, 341-353.

LAWRENCE R.A. & BURK R.F. – 1976 – Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **71** (4), 952-958.

LEE M.J. & DINSDALE D. – 1995 – The subcellular distribution of NADPH-cytochrome P450 reductase and isoenzymes of cytochrome P450 in the lungs of rats and mice, *Biochem. Pharmacol.*, **49** (10), 1387-1394.

LEVIN W., LU A.Y.H., JACOBSON M. & KUNTZMAN R. – 1973 – Lipid peroxidation and the degradation of cytochrome P-450 heme, *Arch. Biochem.*, **158**, 842-852.

LEVIN W., WOOD A., CHANG R., RYAN D., THOMAS P., YAGI H., THAKKER D., VYAS K., BOYD C., CHU S-Y., CONNEY A. & JERINA D. – 1982 – Oxidative metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons to ultimate carcinogens, *Drug Metab. Rev.*, **13** (4), 555-580.

LIEBER C.S. & DE CARLI L.M. – 1968 – Ethanol oxidation by hepatic microsomes: adaptative increase after ethanol feeding, *Science*, **176**, 419-420.

- LIU P.T., IOANNIDES C., SHAVILA J., SYMONS A.M. & PARKE D.V. – 1993a – Effects of ether anaesthesia and fasting on various cytochromes P450 of rat liver and kidney, *Biochem. Pharmacol.*, **45** (4), 871-877.
- LIU P.T., KENTISH P.A., SYMONS A.M. & PARKE D.V. – 1993b – The effects of ether anaesthesia on oxidative stress in rats - dose response, *Toxicology*, **80**, 37-49.
- LLACUNA S., GORRIZ A., DURFORT M. & NADAL J. – 1993 – Effects of air pollution on passerine birds and small mammals, *Arch. environ. Contam. Toxicol.*, **24** (1), 59-66.
- LOGANATHAN B.G. & KANNAN K. – 1994 – Global organochlorine contamination trends: an overview, *Ambio*, **23** (3), 187-191.
- LORR N.A., GOLEMBOSKI K.A., HEMENDINGER R.A., DIETERT R.R. & BLOOM S.E. – 1992 – Distribution and inducibility of a P450I activity in cellular components of the avian immune system, *Arch. Toxicol.*, **60**, 560-566.
- LUBET R.A., GUENGERICH F.P. & NIMS R.W. – 1990 – The induction of alkoxyresorufin metabolism: a potential indicator of environmental contamination, *Arch. environ. Contam. Toxicol.*, **19**, 157-163.
- LUBET R.A., JONES C.R., STOCKUS D.L., FOX S.D. & NIMS R.W. – 1991 – Induction of cytochrome P-450 and other drug metabolizing enzymes in rat liver following dietary exposure to Aroclor 1254, *Toxicol. appl. Pharmacol.*, **108**, 355-365.
- LUBET R.A., MAYER R.T., CAMERON J.W., NIMS R.W., BURKE M.D., WOLFF T. & GUENGERICH F.P. – 1985 – Dealkylation of pentoxyresorufin: a rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome(s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat, *Arch. Biochem. Biophys.*, **238** (1), 43-48.
- LUBET R.A., NIMS R.W., FOX S.D., ISSAQ H.J., MCBEE K. & BEEBE L.E. – 1992 – Induction of hepatic CYPIA activity as a biomarker for environmental exposure to aroclor 1254 in feral rodents, *Arch. environ. Contam. Toxicol.*, **22**, 339-344.
- LUBET R.A., NIMS R.W., WARD J.M., RICE J.M. & DIWAN B.A. – 1989 – Induction of cytochrome P-450b and its relationship to liver tumor promotion, *J. am. Coll. Toxicol.*, **8** (2), 259-268.
- LUSTER M.I., BLANK J.A. & DEAN J.H. – 1987 – Molecular and cellular basis of chemically induced immunotoxicity, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **27**, 23-49.
- LUSTER M.I., MUNSON A.E., THOMAS P.T., HOLSAPPLE M.P., FENTERS J.D., WHITE K.L., LAUER L.D., GERMOLEC D.R., ROSENTHAL G.J. & DEAN J.H. – 1988 – Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National Toxicology Program's Guidelines for immunotoxicity evaluation in mice, *Fundam. appl. Toxicol.*, **10**, 2-19.

LUSTER M.I., PORTIER C., PAIT D.G. & GERMOLEC D.R. – 1994a – The use of animal tests in risk assessment for immunotoxicology, *Toxicol. in vitro*, **8** (5), 945-950.

LUSTER M.I., PORTIER C., PAIT D.G. & GERMOLEC D.R. – 1994b – Use of animal studies in risk assessment for immunotoxicology, *Toxicology*, **92**, 229-243.

LUSTER M.I., PORTIER C., PAIT D.G., ROSENTHAL G.J., GERMOLEC D.R., CORSINI E., BLAYLOCK P., KOUCHI Y., CRAIG W., WHITE K.L., MUNSON A.E. & COMMENT C.E. – 1993 – Risk assessment in immunotoxicology. II. Relationships between immune and host resistance tests, *Fundam. appl. Toxicol.*, **21**, 71-82.

LUSTER M.I., PORTIER C., PAIT D.G., WHITE K.L., GENNINGS C., MUNSON A.E. & ROSENTHAL G.J. – 1992a – Risk assessment in immunotoxicology. 1. Sensitivity and predictability of immune tests, *Fundam. appl. Toxicol.*, **18**, 200-210.

LUSTER M.I., PAIT D.G., PORTIER C., ROSENTHAL G.J., GERMOLEC D.R., COMMENT C.E., MUNSON A.E., WHITE K. & POLLOCK P. – 1992b – Qualitative and quantitative experimental models to aid in risk assessment for immunotoxicology, *Toxicol. Lett.*, **64/65**, 71-78.

MA T.H. & HARRIS M.M. – 1985 – *In situ* monitoring of environmental mutagens, *Hazard assessment of chemicals, Current Development*, **4**, 77-106.

MA W.C., DENNEMAN W. & FABER J. – 1991 – Hazardous exposure of ground-living small mammals to cadmium and lead in contaminated terrestrial ecosystems, *Arch. environ. Toxicol.*, **20**, 266-270.

MADRA S., MANN F., FRANCIS J.E., MANSON M.M. & SMITH A.G. – 1996 – Modulation by iron of hepatic microsomal and nuclear cytochrome P450, and cytosolic glutathione *S*-transferase and peroxidase in C57BL/10ScSn mice induced with polychlorinated biphenyls (Arocolor 1254), *Toxicol appl. Pharmacol.*, **136**, 79-86.

MALY M.S. – 1984 – Survivorship of meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*, from sewage sludge-treated fields, *Bull. environ. Contam. Toxicol.*, **32**, 724-731.

MÄNTYLÄ E. & AHOTUPA M. – 1993 – Polychlorinated biphenyls and naphthalenes: long-lasting induction of oxidative stress in the rat, *Chemosphere*, **27** (1-3), 383-390.

MÄNTYLÄ E., AITIO A. & AHOTUPA M. – 1983 – Effect of polychlorinated naphthalenes and biphenyls on polysubstrate monooxygenase and UDPglucuronosyltransferase activities in rat lung, In : *Extrahepatic drug metabolism and chemical carcinogenesis*, Rydstrom J., Montelius J. & Bengtsson (Eds.), Elsevier, 223-224.

MARKLUND S. & MARKLUND G. – 1974 – Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur. J. Biochem.*, **47**, 469-474.

MARTINEAU D., LAGACE A., BELAND P., HIGGINS R., ARMSTRONG D. & SHUGART L.R. – 1988 – Pathology of stranded belluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St Lawrence Estuary, Quebec, Canada, *J. comp. Pathol.*, **98**, 287-311.

MASCANZONI D., VON BOTHMER S., MATTEI T. & CRISTALDI M. – 1990 – Small mammals as biological indicators of radioactive contamination of the environment, *Sci. total Environ.*, **99**, 61-66.

MASFARAUD J.F. - 1992 - Les activités enzymatiques à cytochrome P450 comme marqueur biologique de pollution : relation entre l'activité 7-éthoxyrésorufine O-dééthylase et la formation d'adduits à l'ADN chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) exposée au benzo(a)pyrene, Thèse de Docteur d'Université en Analyse et Modélisation des Systèmes Biologiques, Université Claude Bernard - Lyon I, 166 p.

MASON C.F. & WEBER D. – 1990 – Organochlorine residues and heavy metals in kidneys of polecats (*Mustela putorius*) from Switzerland, *Bull. environ. Contam. Toxicol.*, **45**, 689-696.

MATSUBARA T., KOIKE M., TOUCHI A., TOCHINO Y. & SUGENO K. – 1976 – Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate, *Anal. Biochem.*, **75**, 596-603.

McBEE K. - 1991 - Chromosomal aberrations in native small mammals (*Peromyscus leucopus*) at a petrochemical waste disposal site : II. Cryptic and inherited aberrations detected by G-band analysis, *Environ. Toxicol. Chem.*, **10**, 1321-1329.

McBEE K. & BICKHAM J.W. – 1988 – Petrochemical-related DNA damage in wild rodents detected by flow cytometry, *Bull. environ. Contam. Toxicol.*, **40**, 343-349.

McBEE K. & BICKHAM J.W. – 1990 – Mammals as bioindicators of environmental toxicity, *Curr. Mammal.*, **2**, 37-88.

McBEE K., BICKHAM J.W., BROWN K.W. & DONNELLY K.C. – 1987 – Chromosomal aberrations in native small mammals (*Peromyscus leucopus* and *Sigmodon hispidus*) at a petrochemical waste site: I. standard karyology, *Arch. environ. Contam. Toxicol.*, **16**, 681-688.

McLEAN M.R., BAUER U., AMARO A.R. & ROBERTSON L.W. – 1996b – Identification of catechol and hydroquinone metabolites of 4-monochlorobiphenyl, *Chem. Res. Toxicol.*, **9** (1), 158-164.

McLEAN M.R., ROBERTSON L.W. & GUPTA R.C. – 1996a – Detection of PCB adducts by the ³²P-postlabeling technique, *Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 165-171.

- McMURRY S.T., LOCHMILLER R.L., CHANDRA S.A.M. & QUALIS C.W. – 1995 – Sensitivity of selected immunological, hematological, and reproductive parameters in the cotton rat (*Sigmodon hispidus*) to subchronic lead exposure, *J. Wildl. Dis.*, **31** (2), 193-204.
- McMURRY S.T., LOCHMILLER R.L., VESTEY M.R., QUALLS C.W. & ELANGBAM C.S. – 1991 – Acute effects of benzene and cyclophosphamide exposure on cellular and humoral immunity of cotton rats, *Sigmodon hispidus*, *Bull. environ. Contam. Toxicol.*, **46**, 937-945.
- MILLER J.K., BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA E. & MADSEN F.C. – 1993 – Symposium: Antioxidants, immune response, and animal function. Oxidative stress, antioxidants, and animal function, *J. dairy Sci.*, **76** (9), 2812-2823.
- MINCHIN R.F. & BOYD M.R. – 1983 – Localization of metabolic activation and deactivation systems in the lung: significance to the pulmonary toxicity of xenobiotics, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **23**, 217-238.
- MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT – 1994 – Recensement des sites et sols pollués, état au 30 septembre 1994, Direction de la prévention des pollutions et des risques, Service de l'environnement industriel.
- MITCHELL C.E., FISCHER J.P. & DAHL A.R. – 1987 – Differential induction of cytochrome P-450 catalyzed activities by polychlorinated biphenyls and benzo[a]pyrene in B6C3F1 mouse liver and lung, *Toxicology*, **43**, 315-323.
- MORI T., KITADA M., IMAOKA S., FUNAE Y. & KAMATAKI T. – 1991 – The *in vitro* effects of lipid peroxidation on the content of individual forms of cytochrome P-450 in liver microsomes of guinea pigs, *Pharmacol. Res.*, **24** (2), 143-148.
- MUKHTAR H., ASOKAN P., DAS M., SANTELLA R.M. & BICKERS D.R. – 1986 – Benzo(a)pyrene diol epoxide-I-DNA adduct formation in the epiderms and lung of SENCAR mice following topical application of crude coal tar, *Cancer Lett.*, **33**, 287-294.
- MUKHTAR H., LINK C.M., CHERNIACK E., KUSHNER D.M. & BICKERS D.R. – 1982 – Effect of topical application of defined constituents of coal tar on skin and liver aryl hydrocarbon hydroxylase and 7-ethoxycoumarin deethylase activities, *Toxicol. appl. Pharmacol.*, **64**, 541-549.
- MURRAY G.I. & BURKE M.D. – 1995 – Immunohistochemistry of drug-metabolizing enzymes, *Biochem. Pharmacol.*, **50** (7), 895-903.
- NAKAJIMA T. & WANG R.S. – 1994 – Induction of cytochrome P450 by toluene, *Int. J. Biochem.*, **26** (12), 1333-1340.

NAKAJIMA T., WANG R.S., ELOVAARA E., GONZALEZ F.J., GELBOIN H.V., VAINIO H. & AOYAMA T. – 1994 – CYP2C11 and CYP2B1 are major cytochrome P450 forms involved in styrene oxidation in liver and lung microsomes from untreated rats, respectively, *Biochem. Pharmacol.*, **48** (4), 637-642.

NAKATSURU S., OOHASHI J., NOZAKI H., NAKADA S. & IMURA N. – 1985 – Effect of mercurials on lymphocyte functions *in vitro*, *Toxicology*, **36**, 297-305.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – 1989 – Biologic markers in reproductive toxicology, National Academy Press, Washington, 1989, 2-28.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – 1991 – Animals as sentinels of environmental health hazards, National Academy Press, Washington, 160 pp.

NAYAK B.N. & PETRAS M.L. – 1985 – Environmental monitoring for genotoxicity: *in vivo* sister chromatid exchange in the house mouse (*Mus musculus*), *Can. J. Genet. Cytol.*, **27**, 351-356.

NEBERT D.W. – 1989 – The *Ah* locus: genetic differences in toxicity, cancer, mutation, and birth defects, *Crit. Rev. Toxicol.*, **20** (3), 153-174.

NEBERT D.W. – 1991 – Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk, *Mutat. Res.*, **247**, 267-281.

NEBERT D.W., ADESNIK M., COON M.J., ESTABROOK R.W., GONZALEZ F.J., GUENGERICH P., GUNSALUS I.C., JOHNSON E.F., KEMPER B., LEVIN W., PHILLIPS I.R., SATO R. & WATERMAN M.R. – 1987 – The P450 gene superfamily: recommended nomenclature, *DNA*, **6** (1), 1-11.

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

NEDELICHEVA V. & GUT I. – 1994 – P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer, *Xenobiotica*, **24** (12), 1151-1175.

NELSON D.R., KOYMANS L., KAMATAKI T., STEGEMAN J.J., FEYEREISEN R., WAXMAN D.J., WATERMAN M.R., GOTOH O., COON M.J., ESTABROOK R.W., GUNSALUS I.C. & NEBERT D.W. – 1996 – P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature, *Pharmacogenetics*, **6** (1), 1-42.

- NERURKAR P.V., PARK S.S., THOMAS P.E., NIMS R.W. & LUBET R.A. – 1993 – Methoxyresorufin and benzyloxyresorufin: substrates preferentially metabolized by cytochromes P4501A2 and 2B, respectively, in the rat and mouse, *Biochem. Pharmacol.*, **46** (5), 933-943.
- NESSEL C.S., AMORUSO M.A., UMBREIT T.H., MEEKER R.J. & GALLO M.A. – 1992 – Pulmonary bioavailability and fine particle enrichment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in respirable soil particles, *Fundam. appl. Toxicol.*, **19**, 279-285.
- NEWTON I., WYLLIE I. & ASHER A. – 1993 – Long-term trends in organochlorine and mercury residues in some predatory birds in Britain, *Environ. Pollut.*, **79**, 143-151.
- NICOTERA T.M., BLOCK A.W., GIBAS Z. & SANDBERG A.A. – 1985 – Induction of superoxide dismutase, chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges by paraquat in Chinese hamster fibroblasts, *Mutat. Res.*, **151**, 263-268.
- NIMS R.W., BEEBE L.E., DRAGNEV K.H., THOMAS P.E., FOX S.D., ISSAQ H.J., JONES C.R. & LUBET R.A. – 1992 – Induction of hepatic CYP1A in male F344/NCr rats by dietary exposure to aroclor 1254: examination of immunochemical, RNA, catalytic, and pharmacokinetic endpoints, *Environ. Res.*, **59** (2), 447-466.
- NIMS R.W. & LUBET R.A. – 1995 – Induction of cytochrome P-450 in the norway rat, *Rattus norvegicus*, following exposure to potential environmental contaminants, *J. Toxicol. environ. Health*, **46** (3), 271-292.
- NOHL H. – 1993 – Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence, *Br. med. Bull.*, **49** (3), 653-667.
- O'BRIEN D.J., KANEENE J.B. & POPPENGA R.H. – 1993 – The use of mammals as sentinels for human exposure to toxic contaminants in the environment, *Environ. Health Perspect.*, **99**, 351-368.
- OAKLEY G.G., ROBERTSON L.W. & GUPTA R. – 1996 – Analysis of polychlorinated biphenyl-DNA adducts by ³²P-postlabeling, *Carcinogenesis*, **17** (1), 109-114.
- OKEY A.B. – 1990 – Enzyme induction in the cytochrome P-450 system, *Pharmacol. Ther.*, **45**, 241-298.
- OMURA T. & SATO R. – 1964 – The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes, *J. biol. Chem.*, **239** (7), 2370-2378.
- ORRENIUS S., McCONKEY D.J., BELLOMO G. & NICOTERA P. – 1989 – Role of Ca² in toxic cell killing, *Trends pharmacol. Sci.*, **10**, 281-285.
- OWEN R.D. & McBEE K. – 1990 – Analysis of asymetry and morphometric variation in natural populations of chromosome-damaged mice, *Texas J. Sci.*, **42** (4), 319-331.

- PAGLIA D.E. & VALENTINE W.N. – 1967 – Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase, *J. Lab. Clin. Med.*, **276**, 368-374.
- PAIRON J.C., TRABELSI N., BUARD A., FLEURY-FEITH J., BACHELET C.M., PORON F., BEAUNE P., BROCHARD P. & LAURENT P. – 1994 – Cell localization and regulation of expression of cytochrome P450 1A1 and 2B1 in rat lung after induction with 3-methylcholanthrene using mRNA hybridization and immunohistochemistry, *Am. J. Respir. Cell mol. Biol.*, **11**, 386-396.
- PAN B.J, HONG Y.J., CHANG G.C., WANG M., CINKOTAI FF. & KO Y.C. – 1994 – Excess cancer mortality among children and adolescents in residential districts polluted by petrochemical manufacturing plants in Taiwan, *J. Toxicol. environ. Health*, **43**, 117-129.
- PARADA R. & JASZCZAK K. – 1993 – A cytogenetic study of cows from a highly industrial or an agricultural region, *Mutat. Res.*, **300**, 259-263.
- PARANJPE M.G., CHANDRA A.M.S., QUALLS C.W. Jr, McMURRY S.T., ROHRER M.D., WHALEY M.M., LOCHMILLER R.L. & McBEE K. – 1994 – Fluorosis in a wild cotton rat (*Sigmodon hispidus*) population inhabiting a petrochemical waste site, *Toxicol. Pathol.*, **22** (6), 569-578.
- PARK J.Y.K., SHIGENAGA M.K. & AMES B.N. – 1996 – Induction of cytochrome P-4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo(3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 93 : 6, 2322-2327.
- PARKE D.V. & IOANNIDES C. – 1994 – The effects of nutrition on chemical toxicity, *Drug Metab. Rev.*, **26** (4), 739-765.
- PASCOE G.A., BLANCHET R.J. & LINDER G. – 1994 – Bioavailability of metals and arsenic to small mammals at a mining waste-contaminated wetland, *Arch. environ. Contam. Toxicol.*, **27**, 44-50.
- PAYNE J.F. – 1984 – Mixed-function oxygenases in biological monitoring programs: review of potential usage in different phyla of aquatic animals. In : *Ecotoxicological testing for the marine environment*, Persoone G., Jaspers E. & Claus C. (Eds.), **1**, 625-655.
- PAYNE J.F., FANCEY L.L., RAHIMTULA A.D. & PORTER E.L. – 1987 – Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring, *Comp. Biochem. Physiol.*, **86C** (2), 233-245.
- PEHLIVAN M., PEHLIVAN E. & KARA H. - 1994 - Analysis of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) in fly ash from a waste incineration plant, *J. anal. Toxicol.*, **18**, 397-401.

PERERA F. - 1993 - Biomarkers and molecular epidemiology of occupationally related cancer, *J. Toxicol. environ. Health*, **40**, 203-215.

PIRKLE J.L., SAMPSON E.J., NEEDHAM L.L., PATTERSON D.G. & ASHLEY D.L. – 1995 – Using biological monitoring to assess human exposure to priority toxicants, *Environ. Health Perspect. Suppl.*, **103** (3), 45-48.

POELS C.L.M. & VEERKAMP W. – 1992 – Hazard assessment of chemical contaminants in soil, *Toxicol. Lett.*, **64/65**, 503-510.

POLAND A. & GLOVER E. – 1974 – Comparison of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, a potent inducer of aryl hydrocarbon hydroxylase, with 3-methylcholanthrene, *Mol. Pharmacol.*, **10**, 349-359.

POLAND A., GLOVER E. & KENDE A.S. – 1976 – Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin by hepatic cytosol, *J. biol. Chem*, **251** (16), 4936-4946.

POLI G. – 1993 – Liver damage due to free radicals, *Br. med. Bull.*, **49** (3), 604-620.

PRUETT S.B., ENSLEY D.K. & CRITTENDEN P.L. – 1993 – The role of chemical-induced stress responses in immunosuppression: a review of quantitative associations and cause-effect relationships between chemical-induced stress responses and immunosuppression, *J. Toxicol. environ. Health*, **39**, 163-192.

QUIÑONES L. & GIL L. – 1995 – Induction of rat hepatic P4501A1 by organic extracts from airborne particulate matter in Santiago, Chile, *Xenobiotica*, **25** (1), 81-89.

RAMPERSAUD A. & WALTZ F.G.Jr – 1987- Polymorphisms of four hepatic cytochrome P-450 in twenty-eight inbred strains of rat, *Biochem. Genet.*, **25**, 527-534.

RANDERATH K., VIJAYARAJ REDDY M. & GUPTA R.C. – 1981 – ³²P-labeling test for DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78** (10), 6126-6129.

RANDERATH K., YANG P.F., DANNA T.F., REDDY R., WATSON W.P. & RANDERATH E. – 1991 – Bulky adducts detected by ³²P-postlabelling in DNA modified by oxidative damage *in vitro*. Comparison with rat lung I-compounds, *Mutat. Res.*, **250**, 135-144.

RAPPE C. – 1991 – Sources of and human exposure to PCDDs and PCDFs. In : *Biological basis for risk assessment of dioxins and related compounds*, Gallo M.A., Scheuplein R.J., Van der Heijden K.A. (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991, (35), 121-132.

RATTNER B.A., FLICKINGER E.L. & HOFFMAN D.J. – 1993 – Morphological, biochemical, and histopathological indices and contaminant burdens of cotton rats (*Sigmodon hispidus*) at three hazardous waste sites near Houston, Texas, USA, *Environ. Pollut.*, **79**, 85-93.

RATTNER B.A., HOFFMAN D.J. & MARN C.M. – 1989 – Use of mixed-function oxygenases to monitor contaminant exposure in wildlife, *Environ. Toxicol. Chem.*, **8**, 1093-1102.

REDDY M.V. & RANDEKATH K. – 1986 – Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of ³²Ppostlabelling test for structurally diverse DNA adducts, *Carcinogenesis*, **7** (9), 1543-1551.

REINKE L.A. & MOYER M.J. – 1985 – A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol, *Drug Metab. Dispos.*, **13** (5), 548-552.

REMMER H. & MERKER H.J. – 1963 – Drug-induced changes in liver endoplasmic reticulum. Associations with drug-metabolizing enzymes, *Science*, **142**, 1657-1658.

RETTIE A.E., WILLIAMS F.M. & RAWLINS M.D. – 1986 – Substrate specificity of the mouse skin mixed-function oxidase system, *Xenobiotica*, **16** (3), 205-211.

RIFKIND A.B. & MUSCHICK H. – 1983 – Benzoxaprofen suppression of polychlorinated biphenyl toxicity without alteration of mixed function oxidase function, *Nature*, **303**, 524-526.

RIVIERE J.L. – 1993 – Les animaux sentinelles, *Courr. Environ. INRA*, (20), 59-67.

RIVIERE J.L., FOUCHECOURT M.O. & WALKER C.H., Biomarqueurs d'exposition des animaux terrestres aux polluants. In : *Utilisation de biomarqueurs en écotoxicologie*, Lagadic L., Amiard J.C., Caquet T. & Ramade F. (Eds.), Collection Sciences de l'Environnement, Masson, Paris (à paraître).

ROITT Y., BROSTOFF J. & MALE D. – 1985 – Immunologie fondamentale et appliquée, Médecine et Sciences Internationales, Paris.

ROITT Y., BROSTOFF J. & MALE D. – 1994 – Immunologie, 3^e édition, De Boeck Université, Bruxelles.

ROOS P.H., VAN AFFERDEN M., STROTKAMP D., TAPPE D. & HANSTEIN W.G. – 1996 – Liver microsomal levels of cytochrome P450IA1 as biomarker for exposure and bioavailability of soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons, *Arch. environ. Contam. Toxicol.*, **30**, 107-113.

ROSS J., NELSON G., HOLDEN K., EREXSON G., EARLEY K., BEACH A., KLIGERMAN A., GUPTA R.C. & NESNOW S. – 1993 – Comparative analysis of the formation and persistence of DNA adducts of benzo[b]fluoranthene and benzo[a]pyrene in rat tissues. In : *Polycyclic aromatic compounds - synthesis, properties, analytical measurements, occurrence and biological effects - PAH XIII. Proceedings of the thirteenth international symposium on polynuclear aromatic hydrocarbons*, Bordeaux October 1-4 1991, 929-936.

- ROTHWELL C.J., HAMILTON C.B. & LEAVERTON P.E. – 1991 – Identification of sentinel health events as indicators of environmental contamination, *Environ. Health Perspect.*, **94**, 261-263.
- ROWLEY M.H., CHRISTIAN J.J., BASU D.K., PAWLIKOWSKI M.A. & PAIGEN B. – 1983 – Use of small mammals (voles) to assess a hazardous waste site at Love canal, Niagara Falls, New York, *Arch. environ. Contam. Toxicol.*, **12**, 383-397.
- RUOKOJÄRVI P., ETTALA M., RAHKONEN P., TARHANEN J. & RUUSKANEN J. – 1995 – Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and -furans (PCDDs and PCDFs) in municipal waste landfill fires, *Chemosphere*, **30** (9), 1697-1708.
- RYRFELDT A., BANNENBERG G. & MOLDEUS P. – 1993 – Free radicals and lung disease, *Br. med. Bull.*, **49** (3), 588-603.
- SAFE S. – 1994 – Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment, *Crit. Rev. Toxicol.*, **24** (2), 87-149.
- SAFE S.S. – 1990 – Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs), *Crit. Rev. Toxicol.*, **21** (1), 51-88.
- SAFE S., SAFE L. & MULLIN M. – 1987 – Polychlorinated biphenyls: environmental occurrence and analysis. In: *Polychlorinated biphenyls (PCBs): mammalian and environmental toxicology. Exp. Tox. Ser. 1*, Safe S. & Hutzinger O. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, 1987, 1-13.
- SANDELL E., LEVINEN R. & KIVIRANTA A. – 1993 – The content of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in municipal sludges from different cities in Finland, In : *Polycyclic aromatic compounds - synthesis, properties, analytical measurements, occurrence and biological effects - PAH XIII. Proceedings of the thirteenth international symposium on polynuclear aromatic hydrocarbons*, Bordeaux, October 1-4 1991, 415-425.
- SANDERSON J.T., ELLIOTT J.E., NORSTROM R.J., WHITEHEAD P.E., HART L.E., CHENG K.M. & BELLWARD G.D. – 1994 – Monitoring biological effects of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in great blue heron chicks (*Ardea herodias*) in British Columbia, *J. Toxicol. environ. Health*, **41**, 435-450.
- SAVANNE D., JAUZEIN M., VASSEUR P., FERRIER V., BOUCHE M., CROUAU Y., MARTINET P., MENCH M., MANCEAU A., RETHER B., CABRIDENC R. & PERRODIN Y. – 1995 – French research programme on methods for investigating the ecotoxicity of contaminated soils and wastes, In : *Contaminated Soil 95. Proceedings of the fifth international FZK/TNO conference on contaminated soil*, Maastricht, october 30-november 3 1995, n.p.

- SCHECTER A., PAPKE O., BALL M., LIS A. & BRANDT-RAUF P. – 1995– Dioxin concentrations in the blood of workers at municipal waste incinerators, *Occup. environ. Med.*, **52** (6), 385-387.
- SCHECTER A., STARTIN J., WRIGHT C., KELLY M., PAPKE O., LIS A., BALL M. & OLSON J. – 1994 – Dioxins in U.S. food and estimated daily intake, *Chemosphere*, **29** (9/11), 2261-2265.
- SCHOKET B., HEWER A., GROVER P.L. & PHILLIPS D.H. – 1988 – Covalent binding components of coal-tar, creosote and bitumen to the DNA of the skin and lungs of mice following topical application, *Carcinogenesis*, **9** (7), 1253-1258.
- SCHRENK D., LIPP H.P., BRUNNER H., WIESMULLER T., HAGENMAIER H. & BOCK K.W. – 1991 – Induction of hepatic P450-dependent monooxygenase in feral mice from a PCDD/PCDF-contaminated area, *Chemosphere*, **22** (11), 1011-1018.
- SCHRENK D., STUVEN T., GOHL G., VIEBAHN R. & BOCK K.W. – 1995 – Induction of CYP1A and glutathione S-transferase activities by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in human hepatocyte cultures, *Carcinogenesis*, **16** (4), 943-946.
- SCHUURMAN H.J., KUPER C.F. & VOS J.G. – 1994 – Histopathology of the immune system as a tool to assess immunotoxicity, *Toxicology*, **86**, 187-212.
- SHAW G., CONNELL D. & BARRON W. – 1995 – The use of *in vitro* DNA adduct formation to estimate the genotoxicity of residues at contaminated sites, *Chemosphere*, **30** (10), 1957-1968.
- SHAW I.C. & JONES H.B. – 1994 – Mechanisms of non-genotoxic carcinogenesis, *Trends pharmacol. Sci.*, **15**, 89-93.
- SHAW P.M., ADESNIK M., WEISS M.C. & CORCOS L. – 1993 – The phenobarbital-induced transcriptional activation of cytochrome P-450 genes is blocked by the glucocorticoid-progesterone antagonist RU486, *Mol. Pharmacol.*, **44** (4), 775-783.
- SHAW-ALLEN P.L. & McBEE K. – 1993 – Chromosome damage in wild rodents inhabiting a site contaminated with aroclor 1254, *Environ. Toxicol. Chem.*, **12** (4), 677-684.
- SHORE R.F. & DOUBEN P.E.T. – 1994a – Predicting ecotoxicological impacts of environmental contaminants on terrestrial small mammals, *Rev. environ. Contam. Toxicol.*, **134**, 49-89.
- SHORE R.F. & DOUBEN P.E.T. – 1994b – The ecotoxicological significance of cadmium intake and residues in terrestrial small mammals, *Ecotoxicol. environ. Saf.*, **29**, 101-112.

SHUGART L.R., ADAMS S.M., JIMINEZ B.D., TALMAGE S.S. & McCARTHY J.F. – 1989 – Biological markers to study exposure in animals and bioavailability of environmental contaminants. In : *Biological monitoring for pesticide exposure: measurement, estimation, and risk reduction*, ACS Symp. Series n°382, Wang R.G.M., Franklin C.A., Honeycutt R.C. & Reinert J.C. (Eds.), American Chemical Society Publisher, Chap. 7, 86-97.

SILKWORTH J.B., ANTRIM L. & KAMINSKY L.S. – 1984 – Correlations between polychlorinated biphenyl immunotoxicity, the aromatic hydrocarbon locus, and liver microsomal enzyme induction in C57BL/6 and DBA/2 mice, *Toxicol. appl. Pharmacol.*, **75**, 156-165.

SIMMONDS P.L., LUCKHURST C.L. & WOODS J.S. – 1995 – Quantitative evaluation of heme biosynthetic pathway parameters as biomarkers of low-level lead exposure in rats, *J. Toxicol. environ. Health*, **44** (3), 351-367.

SIMMONS G.J. & McKEE M.J. – 1992 – Alkoxyresorufin metabolism in white-footed mice at relevant environmental concentrations of Aroclor 1254, *Fundam. appl. Toxicol.*, **19**, 446-452.

SIMONATO L. & SARRACI R. – 1983 – Encyclopaedia of Occupational Health and Safety, International labour Office, Geneva, 369-375.

SMIALOWICZ R.J., ANDREWS J.E., RIDDLE M.M., ROGERS R.R., LUEBKE R.W. & COPELAND C.B. – 1989 – Evaluation of the immunotoxicity of low level PCB exposure in the rat, *Toxicology*, **56**, 197-211.

SMIALOWICZ R.J., RIDDLE M.M., WILLIAMS W.C., & DILIBERTO J.J. – 1994 – Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on humoral immunity and lymphocyte subpopulations: differences between mice and rats, *Toxicol. appl. Pharmacol.*, **124**, 248-256.

SMIALOWICZ R.J., ROGERS R.R., ROWE D.G., RIDDLE M.M. & LUEBKE R.W. – 1987 – The effects of nickel on immune function in the rat, *Toxicology*, **44**, 271-281.

SOUCEK P., FILICOVA B. & GUT I. – 1994 – Cytochrome P450 destruction and radical scavenging by benzene and its metabolites. Evidence for the key role of quinones, *Biochem. Pharmacol.*, **47** (12), 2233-2242.

STADMAN T.C. – 1983 – New biologic functions - selenium dependent nucleic acids and proteins, *Fundam. appl. Toxicol.*, **3**, 420-423.

STOHS S.J. – 1990 – Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), *Free radic. Biol. Med.*, **9**, 79-90.

STROBEL H.W., STRALKA D.J., HAMMOND D.K. & WHITE T. – 1993 – Extrahepatic microsomal forms: gastrointestinal cytochromes P450, assessment and evaluation. In : *Cytochrome P450. Handbook of experimental pharmacology*. 105 Schenkman J.B. & Greim H. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, 1993, Chap. 23, 363-372.

SULLIVAN J.B. – 1989 – Immunological alterations and chemical exposure, *Clin. Toxicol.*, **27** (6), 311-343.

TALMAGE S.S. & WALTON B.T. – 1991 – Small mammals as monitors of environmental contaminants, *Rev. environ. Contam. Toxicol.*, **119**, 47-145.

THEELEN R.M.C. & LIEM A.K.D. – 1994 – Exposure to 2,3,7,8-chlorine substituted dioxins, furans and planar PCBs from food by dutch turks: relevance of mutton, *Chemosphere*, **28** (4), 675-682.

THOMPSON R.A., SCHRODER G.D. & CONNOR T.H. – 1988 – Chromosomal aberrations in the cotton rat, *Sigmodon hispidus*, exposed to hazardous waste, *Environ. mol. Mutagen.*, **11**, 359-367.

TOMITA M. & OKUYAMA T. – 1994 – Effect of paraquat on the malondialdehyde level in rat liver microsomes (*in vitro*), *Arch. Toxicol.*, **68**, 187-192.

TOUSSAINT O., HOUBION A. & REMACLE J. – 1993 – Relationship between the critical level of oxidative stresses and the glutathione peroxidase activity, *Toxicology*, **81**, 89-101.

TRAVIS C.C. & HATTEMAYER-FREY H.A. – 1990 – Concentration of TCDD in fish and the potential for human exposure, *Environ. Internat.*, **16**, 155-162.

TRITSCHER A.M., LUCIER G.W. & HUFF J.E. – 1994 – Carcinogenicity of TCDD in animals and in humans. In : *Dioxin 94 extended abstract, 14th international symposium on chlorinated dioxins, PCB and related compounds*, Kyoto, November 21-25 1994.

TRYPHONAS H. – 1994 – Immunotoxicity of polychlorinated biphenyls : present status and future considerations, *Exp. clin. Immunogenet.*, **11**, 149-162.

TSUTSUMI M., MATSUDA Y. & TAKADA A. – 1993 – Role of ethanol-inducible cytochrome P-450 2E1 in the development of hepatocellular carcinoma by the chemical carcinogen, N-nitrosodimethylamine, *Hepatology*, **18**, 1483-1489.

TU Y.Y. & YANG C.S. – 1983 – High-affinity nitrosamine dealkylase sytemic rat liver microsomes and its induction by fasting, *Cancer Res.*, **43**, 623-629.

TYSKLIND M., FANGMARK I., MARKLUND S., LINDSKOG A., THANING L. & RAPPE C. – 1993 – Atmospheric transport and transformation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins ans dibenzofurans, *Environ. Sci. Technol.*, **27** (10), 2190-2197.

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) – 1988 – Environmental progress and challenges: EPA's update. Office of policy planning evaluation, EPA-230-07-88-033, Washigton, DC, August, 140p.

VAN BIRGELEN A.P.J.M., SMIT E.A., KAMPEN I.M., GROENEVELD C.N., FASE K.M., VAN DER KOLK J., POIGER H., VAN DEN BERG M., KOEMAN J.H. & BROUWER A. – 1995 – Subchronic effects of 2,3,7,8-TCDD or PCBs on thyroid hormone metabolism: use in risk assessment, *Eur. J. Pharmacol. environ. Toxicol. Pharmacol. Sect.*, **293**, 77-85.

VAN BRUMMELEN T.C., VERWEIJ R.A., WEDZINGA S.S & VAN GESTEL C.A.M. – 1996 – Polycyclic aromatic hydrocarbons in earthworms and isopods from contaminated forest soils, *Chemosphere*, **32** (2), 315-341.

VAN DER OOST R., VAB 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** (6), 859-870.

VAN STRAALLEN N.M. & VAN GESTEL C.A.M. – 1993 – Ecotoxicological test methods using terrestrial arthropods. Discussion paper for the OECD test guidelines programme. Department of ecology and ecotoxicology, Vrije Universiteit, Amsterdam, 1-63.

VAN WAUWE J.P., & JANSSEN P.A.J. – 1989 – Is there a case for P-450 inhibitors in cancer treatment?, *J. med. Chem.*, **32** (10), 2231-2239.

VECCHI A., SIRONI M., SFREDDO-GALLOTTA E., GRAZIANI A. & CANTONI L. – 1986 – Effect of inducers of P-450 cytochrome isoenzymes on TCDD immunosuppressive activity, *Chemosphere*, **15** (9-12), 1707-1714.

VINCENT R., BOUDREAU J., NADEAU D., FOURNIER M., KRZYSTYNIAK K., TROTTIER B. & CHEVALIER G. – 1989 – Lipid peroxidation in rat lungs following an acute inhalation exposure to cadmium chloride, *J. Aerosol Med.*, **2** (4), 349-363.

VODICNIK M.J., FRANKLIN R.B., ELCOMBE C.R. & LECH J.J. – 1981 – Sex steroids and drugs metabolism. A sex-related difference in hepatic microsomal ethoxyresorufin-O-deethylation in Sprague-Dawley rats, *Biochem. Pharmacol.*, **30** (10), 1091-1097.

VOS J., VAN LOVEREN H., WESTER P. & VETHAAK D. – 1989 – Toxic effects of environmental chemicals on the immune system, *Trends pharmacol. Sci.*, **10**, 289-292.

VOS J.G. & VAN LOVEREN H. – 1994 – Developments of immunotoxicology methods in the rat and applications to the study of environmental pollutants, *Toxicol. in vitro*, **8** (5), 951-956.

VOS J.G. & VAN LOVEREN H. – 1995 – Markers for immunotoxic effects in rodents and man, *Toxicol. Lett.*, **82/83**, 385-394.

WALSH P., EL ADLOUNI C., MUKHOPADHYAY M.J., VIEL G., NADEAU D. & POIRIER G.G. – 1995– P-32-postlabeling determination of DNA adducts in the earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to PAH-contaminated soils, *Bull. environ. Contam. Toxicol.*, **54** (5), 654-661.

WANG W.C. & FREEMARK K. – 1995 – The use of plants for environmental monitoring and assessment, *Ecotoxicol. environ. Saf.*, **30** (3), 289-301.

WANG X., YU X. & BARTHA R. – 1990 – Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbon residues in soil, *Environ. Sci. Technol.*, **24**, 1086-1089.

WARD E.C., MURRAY M.J. & DEAN J.H. – 1985 – Immunotoxicity of nonhalogenated polycyclic aromatic hydrocarbons, In : *Immunotoxicology and immunopharmacology.*, Dean J. *et al.* (Eds.), Raven Press, New York, 291-302.

WAY C.A. & SCHRODER G.D. – 1982 – Accumulation of lead and cadmium in wild populations of the commensal rat, *Rattus norvegicus*, *Arch. environ. Contam. Toxicol.*, **11**, 407-417

WESTER R.C., MAIBACH H.I., BUCKS D.A.W., SEDIK L., MELENDRES J., LIAO C. & DIZIO S. – 1990 – Percutaneous absorption of [14-C]DDT and [14-C]benzo(a)pyrene from soil, *Fundam. appl. Toxicol.*, **15**, 510-516.

WEYAND E.H., WU Y., PATEL S. & GOLDSTEIN L. – 1994 – Biochemical effects of manufactured gas plant residue following ingestion by B6C3F1 mice, *J. Toxicol. environ. Health*, **42**, 89-107.

WEYAND E.H., WU Y., PATEL S., TAYLOR B.P. & MAURO D.M. – 1991 – Urinary excretion and DNA binding of coal tar components in B6C3F1 mice following ingestion, *Chem. Res. Toxicol.*, **4** (4), 466-473

WHONG W.Z., STEWART J.D., CUTLER D. & ONG T. – 1994 – Induction of *in vivo* DNA adducts by 4 industrial by-products in the rat-lung-cell system, *Mutat. Res.*, **312**, 165-172.

WUTHE J., PIECHOTOWSKI I., PÄPKE O., ZIER B., GABRIO T., KRÄMER D., KOUROS B., SCHWENK M. & PFAFF G. – 1996 – First data on background levels of non-ortho and mono-ortho PCBs in blood of residents from southern germany, *Chemosphere*, **32** (3), 567-574.

WUTHE J., HAGENMAIER H., PÄPKE O., KETTMANN C., FROMMBERGER R. & LILLICH W. – 1992 – Dioxin and furan (PCDD/PCDF) levels in human blood and human milk of people living in a PCDD/PCDF contaminated area, *Chemosphere*, **25** (27/10), 1135-1140.

YANG J.J., ROY T.A., KRUEGER A.J., NEIL W. & MACKERER C.R. – 1989 – *In vitro* and *in vivo* percutaneous absorption of benzo[a]pyrene from petroleum crude-fortified soil in the rat, *Bull. environ. Contam. Toxicol.*, **43**, 207-214.

YANG Y.G., LEBREC H. & BURLESON G.R. – 1994 – Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on pulmonary influenza virus titer and natural killer (NK) activity in rats, *Fundam. appl. Toxicol.*, **23**, 125-131.

YEN T.C., KING K.L., LEE H.C., YEH S.H. & WEI Y.H. – 1994 – Age-dependent increase of mitochondrial DNA deletions together with lipid peroxides and superoxide dismutase in human liver mitochondria, *Free radic. Biol. Med.*, **16** (2), 207-214.

YOSHIKAWA K. – 1996 – Anomalous nonidentity between *Salmonella* genotoxicants and rodent carcinogens: nongenotoxic carcinogens and genotoxic noncarcinogens, *Environ. Health Perspect.*, **104** (1), 40-46.

ZELIKOFF J.T., SMIALOWICZ R., BIGAZZI P.E., GOYER R.A., LAWRENCE D.A., MAIBACH H.I. & GARDNER D. – 1994 – Immunomodulation by metals, *Fundam. appl. Toxicol.*, **22**, 1-7.

ANNEXE I

Structure et numéros IUPAC des PCB

(selon Ballschmitter & Zell, 1980)

no	structure	no	structure	no	structure	no	structure	no	structure
1	2	43 ²	2,2',3,5	85	2,2',3,4,4'	127 ²	3,3',4,5,5'	169	3,3',4,4',5,5'
2	3	44	2,2',3,5'	86 ²	2,2',3,4,5	128	2,2',3,3',4,4'	170	2,2',3,3',4,4',5
3	4	45	2,2',3,6	87	2,2',3,4,5'	129	2,2',3,3',4,5	171	2,2',3,3',4,4',6
4	2,2'	46	2,2',3,6'	88	2,2',3,4,6	130	2,2',3,3',4,5'	172	2,2',3,3',4,5,5'
5	2,3	47	2,2',4,4'	89 ²	2,2',3,4,6'	131	2,2',3,3',4,6	173	2,2',3,3',4,5,6
6	2,3'	48	2,2',4,5	90	2,2',3,4',5	132	2,2',3,3',4,6'	174	2,2',3,3',4,5,6'
7	2,4	49	2,2',4,5'	91	2,2',3,4',6	133 ²	2,2',3,3',5,5'	175	2,2',3,3',4,5',6
8	2,4'	50 ²	2,2',4,6	92	2,2',3,5,5'	134	2,2',3,3',5,6	176	2,2',3,3',4,6,6'
9	2,5	51	2,2',4,6'	93 ²	2,2',3,5,6	135	2,2',3,3',5,6'	177	2,2',3,3',4',5,6
10	2,6	52	2,2',5,5'	94 ²	2,2',3,5,6'	136	2,2',3,3',6,6'	178	2,2',3,3',5,5',6
11 ²	3,3'	53	2,2',5,6'	95	2,2',3,5',6	137	2,2',3,4,4',5	179	2,2',3,3',5,6,6'
12 ²	3,4	54 ²	2,2',6,6'	96	2,2',3,6,6'	138	2,2',3,4,4',5'	180	2,2',3,4,4',5,5'
13 ²	3,4'	55 ²	2,3,3',4	97	2,2',3',4,5	139 ²	2,2',3,4,4',6	181 ²	2,2',3,4,4',5,6
14 ²	3,5	56	2,3,3',4'	98 ²	2,2',3',4,6	140 ²	2,2',3,4,4',6'	182 ²	2,2',3,4,4',5,6'
15	4,4'	57 ²	2,3,3',5	99	2,2',4,4',5	141	2,2',3,4,5,5'	183	2,2',3,4,4',5',6
16	2,2',3	58 ²	2,3,3',5'	100	2,2',4,4',6	142 ²	2,2',3,4,5,6	184 ²	2,2',3,4,4',6,6'
17	2,2',4	59	2,3,3',6	101	2,2',4,5,5'	143 ²	2,2',3,4,5,6'	185	2,2',3,4,5,5',6
18	2,2',5	60	2,3,4,4'	102 ²	2,2',4,5,6'	144 ²	2,2',3,4,5',6	186 ²	2,2',3,4,5,6,6'
19	2,2',6	61 ²	2,3,4,5	103 ²	2,2',4,5',6	145 ²	2,2',3,4,6,6'	187	2,2',3,4',5,5',6
20	2,3,3'	62 ²	2,3,4,6	104 ²	2,2',4,6,6'	146	2,2',3,4',5,5'	188 ²	2,2',3,4',5,6,6'
21 ²	2,3,4	63	2,3,4',5	105	2,3,3',4,4'	147 ²	2,2',3,4',5,6	189	2,3,3',4,4',5,5'
22	2,3,4'	64	2,3,4',6	106 ²	2,3,3',4,5	148 ²	2,2',3,4',5,6'	190	2,3,3',4,4',5,6
23 ²	2,3,5	65 ²	2,3,5,6	107	2,3,3',4',5	149	2,2',3,4',5',6	191	2,3,3',4,4',5',6
24	2,3,6	66	2,3',4,4'	108 ²	2,3,3',4,5'	150 ²	2,2',3,4',6,6'	192 ²	2,3,3',4,5,5',6
25	2,3',4	67	2,3',4,5	109 ²	2,3,3',4,6	151	2,2',3,5,5',6	193	2,3,3',4',5,5',6
26	2,3',5	68 ²	2,3',4,5'	110	2,3,3',4',6	152 ²	2,2',3,5,6,6'	194	2,2',3,3',4,4',5,5'
27	2,3',6	69	2,3',5,6	111 ²	2,3,3',5,5'	153	2,2',4,4',5,5'	195	2,2',3,3',4,4',5,6
28	2,4,4'	70	2,3',4',5	112 ²	2,3,3',5,6	154 ²	2,2',4,4',5,6'	196	2,2',3,3',4,4',5,6'
29	2,4,5	71 ²	2,3',4',6	113 ²	2,2',3',5',6	155 ²	2,2',4,4',6,6'	197	2,2',3,3',4,4',6,6'
30 ²	2,4,6	72 ²	2,3',5,5'	114	2,3,4,4',5	156	2,3,3',4,4',5	198	2,2',3,3',4,5,5',6
31	2,4',5	73 ²	2,3',5',6	115	2,3,4,4',6	157	2,3,3',4,4',5'	199	2,2',3,3',4,5,6,6'
32	2,4',6	74	2,4,4',5	116 ²	2,3,4,5,6	158	2,3,3',4,4',6	200	2,2',3,3',4,5',6,6'
33	2',3',4	75	2,4,4',6	117 ²	2,3,4',5,6	159 ²	2,3,3',4,5,5'	201	2,2',3,3',4,5,5',6'
34	2',3',5	76 ²	2',3,4,5	118	2,3',4,4',5	160	2,3,3',4,5,6	202	2,2',3,3',5,5',6,6'
35	3,3',4	77	3,3',4,4'	119	2,3',4,4',6	161 ²	2,3,3',4,5',6	203	2,2',3,4,4',5,5',6
36 ²	3,3',5	78 ²	3,3',4,5	120 ²	2,3',4,5,5'	162 ²	2,3,3',4',5,5'	204 ²	2,2',3,4,4',5,6,6'
37	3,4,4'	79 ²	3,3',4,5'	121 ²	2,3',4,5',6	163 ²	2,3,3',4',5,6	205	2,3,3',4,4',5,5',6
38 ²	3,4,5	80 ²	3,3',5,5'	122	2',3,3',4,5	164 ²	2,3,3',4',5',6	206	2,2',3,3',4,4',5,5',6
39 ²	3,4',5	81 ²	3,4,4',5	123	2',3,4,4',5	165 ²	2,3,3',5,5',6	207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'
40	2,2',3,3'	82	2,2',3,3',4	124 ²	2',3,4,5,5'	166 ²	2,3,4,4',5,6	208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'
41	2,2',3,4	83	2,2',3,3',5	125 ²	2',3,4,5,6'	167	2,3',4,4',5,5'	209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'
42	2,2',3,4'	84	2,2',3,3',6	126	3,3',4,4',5	168 ²	2,3',4,4',5',6		

ANNEXE II

Caractéristiques du site de Replonges

Renseignements extraits du rapport BURGEAP, 1993 :

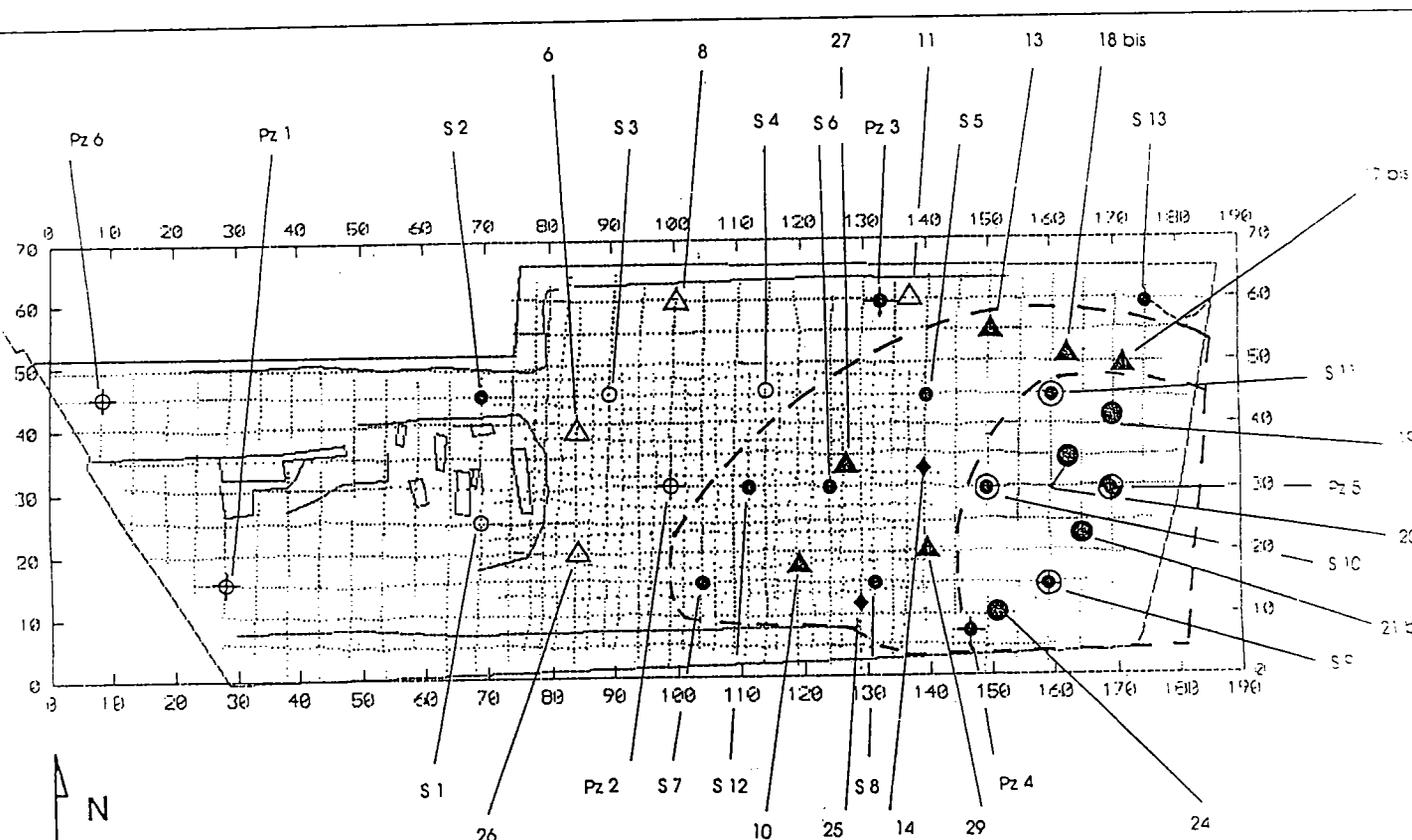
Annexe IIa : Implantation des ouvrages de reconnaissance

Annexe IIb : Récapitulatif des observations faites sur les ouvrages de reconnaissance

Annexe IIc : Récapitulatif de l'état de pollution du site

Annexe IId : Récapitulatif des analyses de laboratoire effectuées sur différents échantillons de sol

Annexe IIa



<p>BURGÉAP - Agence de Lyon 27 Bd du 11 Novembre 1918 - B.P. 2132 69603 VILLEURBANNE CEDEX TEL : 78 93 55 35 FAX : 78 89 35 33</p>	<p>A. 3561 REPLONGES - Diagnostic-environnement</p>	<p>LEGENDE 0 20 m</p>
	<p>Implantation des ouvrages de reconnaissance Sept 93</p>	<p>Voir Légende détaillée (Annexe IIb)</p>

Annexe IIb

Récapitulatif des observations faites sur les ouvrages de reconnaissance

Nature	Dénomination	Prof. (m)	Observations	Degré de pollution	Ep (m) (*)
Fossa à la pelle mécanique	Anomalie n° 6	2,6	Quelques traces d'HCH de 0 à 1,4 m - Cuve métallique écrasée entre 1 et 2 m Odeur faible	1	-
•	Anomalie n° 8	3,0	Aucune trace visuelle ou olfactive de pollution	1	-
•	Anomalie n° 10	3,0	De 1 à 2,5 m : Sables et graviers noirs pollués, Imprégnés d'HCH Forte odeur de type ammoniacale	2	1,5
•	Anomalie n° 11	2,4	3 petits Fûts écrasés de 0 à 1,9 m - Pas de traces d'HCH Très forte odeur "Indéterminée"	1	-
•	Anomalie n° 13	3,3	A 3, 3 m : couche peu épaisse et discontinue de sables et graviers noirs Imprégnés d'HCH - Très fortes odeurs d'HCH et "Indéterminée"	2	0,3
•	Anomalie n° 14	1,0	De 0 à 1 m : remblais argileux et HCH visqueux - 1 Fût en surface	2	> 1,0
•	Anomalie n° 17 bis	2,0	De 0,5 à 1,8 m : Sables et graviers noirs pollués, Imprégnés d'HCH - 1 Fût écrasé Odeurs d'HCH et "Indéterminée"	2	1,3
•	Anomalie n° 18 bis	3,1	De 2 à 3,1 : Sables et graviers noirs, Imprégnés d'HCH Odeurs d'HCH et "Indéterminée"	2	1,1
•	Anomalie n° 19	4,5	De 0,5 à 4 m : Remblais divers noirs, totalement Imprégnés d'HCH - Présence d'HCH liquides ou plus ou moins visqueux - Très forte odeur d'HCH	3	3,5
•	Anomalie n° 20	1,5	De 0,5 à 1,5 m : Remblais divers, totalement Imprégnés d'HCH - Présence importante d'HCH visqueux - Très fortes odeurs d'HCH et "Indéterminée"	3	> 1,0
•	Anomalie n° 21 bis	1,5	De 0,8 à 1,5 m : Remblais divers totalement Imprégnés d'HCH - Présence importante d'HCH visqueux - Fûts écrasés - Très fortes odeurs d'HCH et "Indéterminée"	3	> 0,9
•	Anomalie n° 24	1,2	De 0,5 à 1,2 m : Remblais divers totalement Imprégnés d'HCH - Présence importante d'HCH visqueux - Très fortes odeurs d'HCH et "Indéterminée"	3	> 0,7
•	Anomalie n° 25	1,0	A 0,8 m : 5 Fûts pleins (de 60 à 200 litres) dans un terrain argileux ne présentant pas d'indice visuel ou olfactif de pollution	2	-
•	Anomalie n° 26	2,5	Aucune trace visuelle ou olfactive de pollution	1	-
•	Anomalie n° 27	3,0	De 1,4 à 1,8 m et de 2,4 à 2,8 m : HCH visqueux	2	0,8
•	Anomalie n° 29	3,1	De 2,5 à 3 m : Sables et graviers noirs Imprégnés d'HCH - Forte odeur d'HCH	2	0,5

La localisation des ouvrages est présentée Figure 3

LEGENDE de la Figure 3 et Définition des degrés de pollution

	Degré 1 :	Piézomètre, sondage ou fosse n'ayant pas rencontré de traces visuelles évidentes de pollution Présence possible d'odeurs d'origine Indéterminée
	Degré 2 :	Piézomètre, sondage ou fosse ayant rencontré une pollution importante : Présence d'une couche de sable et graviers noirs Imprégnés d'hydrocarbures - Pas d'hydrocarbures liquides Fortes odeurs d'HCH et d'origine Indéterminée
	Degré 3 :	Piézomètre, sondage ou fosse ayant rencontré une pollution massive : Terrains totalement souillés Présence d'hydrocarbures liquides ou visqueux Fortes odeurs d'HCH et d'origine Indéterminée
		Fosse ayant rencontré des Fûts pleins

(*) : Epaisseur des terrains pollués de manière évidente

Récapitulatif des observations faites sur les ouvrages de reconnaissance (suite)

Nature	Dénomination	Prof. (m)	Observations	Degré de pollution
Sondage	S 1	5,0	Quelques traces d'HCH de 0 à 0,5 m - Odeur faible	1
	S 2	5,0	De 0 à 0,5 m : Traces et odeurs d'HCH - Forte odeur d'HCH de 0 à 2,5 m	2
	S 3	5,0	Peu de traces visuelles de pollution - Forte odeur "indéterminée" de 4 à 5 m	1
	S 4	5,0	Peu de traces visuelles de pollution - Forte odeur indéterminée de 2,5 à 5 m	1
	S 5	5,0	De 1 à 2,5 m : Argile brune grasse Imprégnée d'HCH - Forte odeur d'HCH Forte odeur "indéterminée" de 2,5 à 5,0 m	2
	S 6	5,0	De 1,2 à 2,2 m : Argile brune Imprégnée d'HCH - Forte odeur d'HCH Forte odeur "indéterminée" de 2,2 à 5,0 m	2
	S 7	5,0	De 0,6 à 2,5 m : Argile et sable Imprégnés d'HCH - Dépôt d'HCH pateux - Forte odeur d'HCH de 0,6 à 3,5 m - Forte odeur "indéterminée" de 3,5 à 5,0 m	2
	S 8	5,0	De 2,4 à 3,2 m : Argile et sable noirâtre Imprégnés d'HCH - Forte odeur d'HCH de 2,4 à 4,4 m - Odeur "indéterminée" de 4,4 à 5,0 m	2
	S 9	5,8	De 0,8 à 3,5 m : Remblais et limons noirs totalement Imprégnés d'HCH - Forte odeur d'HCH de 0 à 4,7 m - Odeur "indéterminée" de 4,7 à 5,8 m	3
	S 10	5,0	De 1 à 3,0 m : Argile et sable noirs totalement Imprégnés d'HCH - Forte odeur d'HCH de 0,3 à 3,0 m - Odeur "indéterminée" de 3 à 5,0 m	3
	S 11	6,0	De 1,1 à 3,3 m : Argile, sable et gravier noirs très Imprégnés d'HCH - Forte odeur d'HCH de 0,2 à 3,8 m - Odeur "indéterminée" de 3,8 à 6,0 m	3
	S 12	5,0	De 1,1 à 1,8 m : Argile gris - noir très Imprégnée d'HCH (en particulier de 1,6 à 1,8 m) Forte odeur d'HCH de 1,1 à 2,1 m - Odeur "indéterminée" de 2,1 à 5,0 m	2
	S 13	5,0	De 0 à 2,2 m : Argile brune dégageant une forte odeur d'HCH Légère odeur "indéterminée" de 2,2 à 5,0 m	1 - 2
Piézomètre	Pz 1	10,0	Aucune trace visuelle ou olfactive de pollution	1
	Pz 2	10,0	Quelques traces d'HCH de 0 à 0,8 m - Odeur "indéterminée" de 3,5 à 6,0 m	1
	Pz 3	10,0	De 1,2 à 3,2 : Argile sable et gravier dégageant une forte odeur d'HCH Odeur "indéterminée" de 3,2 à 7,0 m	1 - 2
	Pz 4	6,0	De 1 à 3,5 m : Argile sable et gravier brun à noirs Imprégnés d'HCH, en particulier de 2,4 à 2,8 m - Forte odeur d'HCH - Légère odeur "indéterminée" de 3,5 à 6,0 m	2 - 3
	Pz 5	10,0	De 1 à 2,8 m : Argile, sable et gravier noirs, totalement Imprégnés d'HCH Nombreuses traces d'HCH de 2,8 à 4,0 m - Forte odeur "indéterminée" de 4 à 6,0 m	3
	Pz 6	6,0	Aucune trace visuelle ou olfactive de pollution	1

La localisation des ouvrages est présentée Figure 3

Définition des degrés de pollution

- Degré 1 : Pas de traces visuelles de pollution
Présence possible d'odeurs d'origine indéterminée
- Degré 2 : Pollution importante - Présence d'une couche de sable et graviers noirs Imprégnés d'hydrocarbures
Pas d'hydrocarbures liquides
Fortes odeurs d'HCH et d'origine indéterminée
- Degré 3 : Pollution massive - Terrains totalement souillés - Présence d'hydrocarbures liquides ou visqueux
Fortes odeurs d'HCH et d'origine indéterminée

(*) : Epaisseur des terrains pollués de manière évidente

Récapitulatif de l'état de pollution du site

Zone	Surface approximative (m ²)	Degré de pollution des sols	Epaisseur moyenne pollution (m)	Estimation volume pollué (m ³)	Epaisseur moyenne recouvrement (m)	Présence de fûts	Pollution de la nappe
1	5 550 à 5 750	Terrains non pollués à l'exception de quelques traces noires d'hydrocarbures	-	-	-	Peu probable	Oui (faible odeur)
2	2 150 à 2 250	Existence d'une couche de sables et graviers noirs imprégnés d'hydrocarbures Présence de produits purs très visqueux (goudron) Pas d'hydrocarbures liquides	1,25 à 1,40	2 600 à 3 200	environ 1,0 m (limons et sables argileux)	Oui (existence possible de quelques fûts pleins en assez bon état)	Oui (forte odeur)
3	1400 à 1500	Pollution massive : remblais, sables et graviers noirs totalement imprégnés d'hydrocarbures Présence d'hydrocarbures liquides	1,5 à 1,8	2 100 à 2 700	0,4 à 0,8 m (remblais hétérogènes)	Oui (à priori en très mauvais état)	Oui (forte odeur)
		Sables et graviers gras, plus ou moins imprégnés d'hydrocarbures	1,4 à 1,7	2 000 à 2 500			

Echantillons de terres

Teneurs supérieures au seuil C de la norme hollandaise.

Echantillons (prof.)	Seuil C norme NL	Pz 2 4,5 m	Ano. 10 2,0 m	S 6 2,0 m	S 6 3,5 m	Pz 3 2,7 m	Pz 3 4,8 m	Ano. 19 3,0 m	Pz 5 2,2 m	Pz 5 3,3 m	Pz 5 5,5 m
-------------------------	---------------------	---------------	------------------	--------------	--------------	---------------	---------------	------------------	---------------	---------------	---------------

Hydrocarbures légers	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Benzène	1	< 0,03	2,91	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	1,01	1,71	< 0,03	< 0,03
Toluène	130	< 0,03	11,32	< 0,03	< 0,03	0,06	< 0,03	0,53	0,84	< 0,03	< 0,03
Xylène	25	< 0,03	17,56	< 0,03	< 0,03	2,02	< 0,03	0,46	2,47	< 0,03	< 0,03
Ethylbenzène	50	< 0,1	2,33	< 0,1	< 0,1	0,08	< 0,1	0,27	1,26	< 0,1	< 0,1
1,2,4 Triméthylbenzène		< 0,1	2,72	< 0,1	< 0,1	3,99	< 0,1	0,1	0,35	< 0,1	< 0,1
1,3,5 Triméthylbenzène		< 0,1	14,47	< 0,1	< 0,1	0,82	< 0,1	< 0,1	1,98	< 0,1	< 0,1
Aliphatiques légers		< 0,1	172,2	< 0,1	< 0,1	66,92	< 0,1	9,35	32,98	< 0,1	< 0,1

Hydrocarbures lourds	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Equivalent Gasoil	800 (1)	< 0,2	23140	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	2810	3870	1541	< 0,2
Equivalent Huile	5000	324	13300	3455	159	1478	81,7	1250	2221	1048	54

PCB (mg/Kg)	1	-	< 5	-	-	-	-	-	< 5	-	-
-------------	---	---	-----	---	---	---	---	---	-----	---	---

Organo-Halogénés volatils	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
Chloroforme		<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
1,1,1 Trichloroéthane		<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
Trichloroéthylène	60 000	<	216	<	<	<	<	<	<	<	<
Tétrachloroéthylène	4 000	<	65	<	<	<	<	<	<	<	<
Tétrachlorure de carbone		<	<	<	<	<	<	<	<	<	<

Métaux	mg/kg	mg/kg	mg/kg								
Arsenic	55	-	18,4	-	-	-	-	-	5,38	-	-
Mercure	10	-	0,95	-	-	-	-	-	< 0,1	-	-
Zinc	720	-	236	-	-	-	-	-	233	-	-
Cuivre	190	-	85,3	-	-	-	-	-	28,5	-	-
Nickel	210	-	4,48	-	-	-	-	-	2,67	-	-
Chrome	380	-	11,8	-	-	-	-	-	1,69	-	-
Plomb	530	-	29,3	-	-	-	-	-	13,6	-	-
Cadmium	12	-	0,37	-	-	-	-	-	< 0,05	-	-
Étain		-	34,2	-	-	-	-	-	27,52	-	-

Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Fluoranthène	40 (2)	0,011	< 0,1	< 0,1	0,019	< 0,1	0,017	< 0,1	6,76	2,20	0,017
Pyréne	40 (2)	0,007	< 0,1	< 0,1	0,024	< 0,1	0,016	< 0,1	5,80	1,75	0,015
Naphtalène	40 (2)	<	<	<	<	<	<	57	<	<	<
Diméthylnaphtalène	40 (2)	<	<	<	<	<	<	85	<	<	<
Anthracène	40 (2)	<	<	<	<	<	<	162	<	<	<

(1) : essence < 800 mg/kg

(2) : somme des HAP < 40 mg/kg

< : inférieur au seuil de détection
(voir annexe 5)

- : dosage non effectué

ANNEXE III

Caractéristiques des sols S0, SIII et SIV

Résultats fournis par l'IRH :

Annexe IIIa : Caractéristiques physico-chimique des sols S0, SIII et SIV

Annexe IIIb : Analyse chimique du sol S0

Annexe IIIc : Analyse chimique des sols SIII et SIV

Annexe IIIa

Caractéristiques physico-chimiques des sols S0, SIII et SIV

Nom de la matrice	S0 (La Bouzule)	SIII	SIV
Origine	Sol agricole, brun, lessivé, limono-argileux, caractéristique des régions tempérées d'Europe. Classification FAO : Luvisol	Sol pollué par des solvants organiques et des culots de régénération de solvants	Sol contaminé par des résidus de cokerie
Date de prélèvement	Décembre 1994	Juin 1994	Juin 1994
Échantillonnage	En bordure de champ, décapage de la partie végétale, prélèvement des 15 premiers cm à la pelle	Prélèvement dans une lagune de stockage à la pelle mécanique (milieu bâché). Prélèvement en 6 points de la lagune sur 1 m ² à une profondeur max. de 2,5 m. Pas de couvert végétal	Prélèvement à la pelle mécanique dans d'anciennes cuves de cokerie comblées par des matériaux de démolition. Prélèvement en un point à 20m ² , prof. max. 2,5 m
Préparation			
<i>Humidité départ</i>	15%	35%	15%
<i>Séchage</i>	A +40°C	Air ambiant, humidité ramenée à 10%	Aucun
<i>Broyage</i>	Broyeur à mâchoires		-
<i>Tamisage</i>	A 2 mm sur rouleaux	Sol épierré manuellement, broyeur à mâchoires	A 5 mm sur grille
<i>Homogénéisation</i>	En bétonnière		
Caractéristiques physiques			
<i>Granulométrie</i>	0 à 0,05 mm : 813 g/kg >0,05 : 187 g/kg	Tamisé à 5 mm	
<i>Rétention en eau</i>	560 à 614 ml/kg	240 ml/kg	200 ml/kg
<i>Volatilité (en équivalents benzène)</i>	Non décelée	11 à 15 mg/sol humidifié 23 à 28 mg/kg sol sec	1,6 mg naphthalène/kg sol
Contamination	Aucune	Voir Annexe IIIc	Voir Annexe IIIc
Conservation avant expédition	Stockage en masse en bidons plastiques opaques étanches de 120 l		
Conditions de transport	Conditionnement en sachets plastiques scellés, transport express		
Précautions d'utilisations	Masque à poussières	Masque avec filtre à solvants Gants résistants aux solvants	
Stockage à la réception	Chambre froide (+4°C)		

Annexe IIIb

Analyse chimique de la Bouzule

Perte au feu à 1.100°C	g/kg	109
pH eau		6,0
Sodium échangeable à l'acétate d'ammonium	g/kg	0,011
Magnésium échangeable à l'acétate d'amonium	g/kg	0,171
Potassium échangeable à l'acétate d'ammonium	g/kg	0,369
Carbone organique total	g/kg	16,53
Azote organique total	g/kg	1,65
Cuivre total extraction HF	mg/kg	24,5
Fer total extraction HF	g/100g	6,44
Manganèse total extraction HF	mg/kg	1.740
Zinc total extraction HF	mg/kg	131
Chrome total extraction HF	mg/kg	88,6
Plomb total extraction HF	mg/kg	49,5
Cadmium total extraction HF	mg/kg	0,377
Soufre total extraction HF	mg/kg	373
Azote nitrique (N de NO ₃)	mg/kg	17,85

Annexe IIIc
Analyse des sols SIII et SIV

Paramètre	SIII	SIV
Humidité brute	10,4%	43,3%
Fraction minérale (% de MS)	90,2	88,4
Fraction organique	9,8	11,6
Indice phénol (mg/kg sol brut)	<1	<1
Métaux lourds et cyanures (mg/kg de MS)		
Hg	2,24	12,56
Cd	29,6	<5
As	12,03	68,1
Cu	201	66,6
Ni	50,3	70,6
Cr	342	134
Pb	1.200	n.d.
Zn	2.270	2.080
Cyanures totaux	<1	<1
Hydrocarbures aromatiques (µg/kg de MS)		
Benzène	<500	n.d.
Toluène	<500	n.d.
Xylène	<500	n.d.
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (mg/kg de MS)		
Fluoranthène	1,21	96
Benzo(b)fluoranthène	0,43	35,5
Benzo(k)fluoranthène	0,21	21,1
Benzo(a)pyrène	0,25	32,5
Benzo(g,h,i)pérylène	0,22	25,5
Indéno-(,2,3)pyrène	0,33	27,6
Somme des 6 HAP	2,65	238,2
Polychlorobiphényles (mg/kg de MS)^a		
Aroclor 1242	4,5	<1
Aroclor 1254	204	<1
Aroclor 1260	13,7	<1
#28	0,8	<0,1
#52	12,9	<0,1
#101	17,1	<0,1
#138	17,5	<0,1
#153	14,5	<0,1
#180	3,9	<0,1

^a Les résultats exprimés en Aroclor sont additifs

(suite)

Hydrocarbures aromatiques chlorés ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de MS)		
Dichlorobenzène 1-2	<10	<10
Dichlorobenzène 1-3	<10	113
Dichlorobenzène 1-4	<10	207
Trichlorobenzène 1-2-3	221	<2
Trichlorobenzène 1-2-4	558	81
Trichlorobenzène 1-3-5	<2	<2
Organohalogénés volatils ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de MS)		
Bromoforme	<100	n.d.
Dibromométhane	<50	n.d.
Dichlorobromométhane	<50	n.d.
1-2 dichloroéthane	<500	n.d.
1-1 dichloroéthylène	<100	n.d.
Dichlorométhane	<1.000	n.d.
Chloroforme	<20	n.d.
Tétrachlorure de carbone	<10	n.d.
1,1,1-trichloroéthane	<10	n.d.
Trichloroéthylène	<20	n.d.
Tétrachloroéthylène	<10	n.d.