



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>

B 434285

~~S/MZ~~

~~98/24~~

~~0489~~

UNIVERSITE DE METZ

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Mention « Toxicologie de l'Environnement »

soutenue le 10 Juillet 1998

**ETUDE DE LA LIPOPEROXYDATION ET DE LA
8-HYDROXY-2'-DEOXYGUANOSINE EN TANT QUE
BIOMARQUEURS DE TOXICITE CHEZ *UNIO TUMIDUS*, BIVALVE
DULCAQUICOLE, EXPOSES *IN SITU* A DES SEDIMENTS
CONTAMINES ET EN CONDITIONS DE STRESS CHIMIQUE**

Aurélie DOYOTTE

MEMBRES DU JURY :

Professeur **P. VASSEUR**, Université de Metz, Directeur de thèse
Professeur **J.K. CHIPMAN**, Université de Birmingham, rapporteur
Professeur **J.F. NARBONNE**, Université de Bordeaux I, rapporteur
Professeur **B. RETHER**, Université de Strasbourg, rapporteur
Profes ne, rapporteur
Profes itz

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ

T



022 234128 6

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce aux financements des Agences de l'Eau françaises et de la Société Elf-Atochem.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Professeur Paule VASSEUR pour m'avoir permis d'effectuer ce travail de recherche et l'avoir suivi avec attention au cours de ces trois années. Je la remercie chaleureusement pour m'avoir fait partager son expérience, pour ses conseils et ses encouragements.

Mes remerciements s'adressent à Monsieur J.K. CHIPMAN, Monsieur J.F. NARBONNE, Monsieur B. RETHER et Madame M. SOLE qui ont accepté d'être les rapporteurs de travail malgré le court délai qui leur était imparti pour réaliser cette tâche.

Je suis reconnaissante à Monsieur J.F. FERARD pour avoir accepté de faire partie de ce jury et pour le temps qu'il consacrera à lire ce mémoire.

Que Monsieur REBILLARD et Monsieur POISSON soient remerciés pour leur gentillesse et leur aide à la mise en place des études du Lot et Garonne.

Je remercie également Stéphane FISCHER pour avoir réalisé l'analyse en composantes principales.

Merci à Carole, sans qui le MDA et la 8OHdG se seraient sentis bien seuls au cours de toutes ces études. Je n'oublie pas Marie-Cécile, qui a fait également partie du « trio des biomarqueurs » et a participé aux premières « expéditions » sur le terrain.

A toute l'équipe du CSE, merci pour votre patience, votre humour, pour les discussions constructives et pour toutes ces dégustations de spécialités régionales, de scones, de tartes, de gâteaux, de brioches...qui ont fait que rarement j'ai manipulé le ventre vide !

Je remercie enfin ma sœur et mon frère pour leur soutien aux moments de doute et leurs encouragements.

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	1998/1455
Cote	S/M ₃ 98/13
Loc	Magasin TEC

A mes parents

A Αγγελο

Travaux publiés ou soumis :

Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.C., Babut, M. et Vasseur, P., (1997) : Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat. Toxicol.*, **39**, 93-110.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A. et Vasseur, P., (1997) : Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **38**, 122-131.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C. et Vasseur, P., (1997) : Mécanismes de formation et effets des espèces réactives de l'oxygène. In *Biomarqueurs en Ecotoxicologie-Aspects fondamentaux*, Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C et. Ramade, F, (ed.), Masson, Paris, p125-147.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Vasseur, P., (1997) : Biomarqueurs du stress oxydant chez les organismes aquatiques. In *Biomarqueurs en Ecotoxicologie-Aspects fondamentaux*, Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C et. Ramade, F, (ed.), Masson, Paris, p149-163.

Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A. et Vasseur, P., (1997) : Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (soumis).

Table des matières

1 Introduction	1
2 Etude bibliographique	3
2.1 Formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS)	3
2.1.1 Introduction	3
2.1.2 L'oxygène moléculaire	4
2.1.3 L'anion superoxyde	4
2.1.4 Le peroxyde d'hydrogène	4
2.1.5 Le radical hydroxyl	5
2.1.6 L'oxygène singulet	6
2.1.7 Les radicaux peroxy	6
2.2 La lipoperoxydation	7
2.2.1 Introduction	7
2.2.2 La lipoperoxydation spontanée : une réaction en chaîne	7
2.2.3 Rôle du fer dans le processus de lipoperoxydation	9
2.3 Les ROS comme espèces utiles	10
2.4 Protection contre la lipoperoxydation	10
2.5 Conséquences endommageantes de la lipoperoxydation	14
2.5.1 Introduction	14
2.5.2 Cytotoxicité des espèces radicalaires	14
2.5.3 Cytotoxicité des aldéhydes	16
2.6 Mécanismes de réparation des lésions induites par la peroxydation lipidique	17
2.7 Induction de la lipoperoxydation chez les mammifères	18
2.8 Formation chez les mammifères, mutagénéicité et réparation de la 8OHdG	20
2.9 Induction de la lipoperoxydation et de la formation de la 8OHdG chez les organismes aquatiques	24
2.9.1 Introduction	24
2.9.2 Niveaux endogènes de lipoperoxydation	24
2.9.3 Induction de la lipoperoxydation par l'exposition à des xénobiotiques	25
2.9.4 Induction de la 8OHdG chez les organismes aquatiques	29
2.10 Méthodes d'évaluation de la lipoperoxydation et de la 8OHdG	30
2.10.1 Détermination de la lipoperoxydation	30
2.10.2 Mesure de la 8OHdG	33

3	Matériel biologique, méthodes et optimisations	37
3.1	Matériel biologique	37
3.1.1	Présentation	37
3.1.2	Echantillonnage, conservation et préparation des tissus	38
3.1.2.1	Echantillonnage et conservation	38
3.1.2.2	Préparation des homogénats de glandes digestives et de branchies pour le dosage du MDA	39
3.1.2.3	Isolement des fractions microsomales de glande digestive et de branchies	39
3.1.2.4	Dosage des protéines	40
3.2	Choix et optimisation des méthodes de dosage	41
3.2.1	Evaluation de la lipoperoxydation	41
3.2.1.1	Choix de la méthode	41
3.2.1.2	Détermination du MDA par le test TBA	41
3.2.1.3	Détermination du MDA par la méthode CLHP (Behrens et Madere, 1991)	42
3.2.1.3a	Protocole de la technique CLHP (Behrens et Madere, 1991)	42
3.2.1.3b	Validation et optimisation de la technique de Behrens et Madere (1991)	43
3.2.1.4	Essais de lipoperoxydation <i>in vitro</i> sur fractions microsomales	45
3.2.2	Optimisation de la méthode de détermination de la 8OHdG	46
3.2.2.1	Choix de la méthode de détermination	46
3.2.2.2	Protocole de la méthode de Shigenaga <i>et al.</i> (1994)	46
3.2.2.3	Validation et optimisation de la méthode de Shigenaga <i>et al.</i> (1994)	48
3.2.2.3.a	Séparation chromatographique et détection de la 8OHdG	48
3.2.2.3.b	Optimisation des étapes d'isolement de l'ADN	50
3.2.2.3.c	Optimisation des étapes d'hydrolyse de l'ADN isolé	54
3.2.2.3.d	Filtration des hydrolysats d'ADN avant injection en CLHP	55
3.2.2.3.e	Isolement et hydrolyse de l'ADN sous atmosphère d'azote	55
3.2.2.3.f	Utilité de l'ajout de DFAM au cours de la préparation des échantillons	56
3.2.2.3.g	Validation de la technique de dosage de la 8OHdG par des essais d'intoxication <i>in vitro</i>	57
3.3	Protocoles expérimentaux optimisés	60
3.3.1	Protocoles pour la détermination du MDA	60
3.3.1.1	Test TBA	60
3.3.1.2	Technique CLHP	60
3.3.2	Protocole pour la détermination de la 8OHdG	61
4	Résultats	63
4.1	Introduction	63

4.2 Etudes de terrain	63
4.2.1 Principe et protocole des études de transfert	63
4.2.2 Présentation des différents sites	64
4.2.2.1 Site de la Fensch (rivière : la Fensch)	64
4.2.2.2 Site des Vosges (rivière : la Moselle)	65
4.2.2.3 Site du Lot et Garonne (rivière : le Lot)	65
4.2.2.4 Site de la Sarthe (rivière : affluent de l'Orne Saosnoise)	65
4.2.3 Niveaux de contamination des sédiments prélevés sur les différents sites	66
4.2.3.1 Comparaison des profils de contamination des différents sites	66
4.2.3.2 Site de la Fensch	66
4.2.3.3 Site des Vosges	67
4.2.3.4 Site du Lot et Garonne	68
4.2.3.5 Site de la Sarthe	69
4.2.4 Réponses des organismes transférés en terme de cytotoxicité et de génotoxicité	70
4.2.4.1 Site de la Fensch	70
4.2.4.2 Site des Vosges	73
4.2.4.3 Site du Lot et Garonne	74
4.2.4.4 Site de la Sarthe	77
4.2.5 Analyse statistique : analyse en composantes principales (ACP)	78
4.3 Intoxications au laboratoire	80
4.3.1 Protocole expérimental	80
4.3.2 Résultats	80
5 Discussion	84
5.1 Niveaux de base de malonaldéhyde	84
5.2 Niveaux de base de 8OHdG	86
5.3 Etudes de terrain : réponses des paramètres biologiques	88
5.4 Relation entre l'induction de la lipoperoxydation et de la formation de la 8OHdG	90
5.5 Relation entre les variations des taux de MDA et de 8OHdG et les modifications des paramètres antioxydants	91
5.6 Relations entre les réponses biologiques observées et les niveaux de contamination des sites étudiés	93
6 Conclusion	95
7 Références bibliographiques	97

Annexes

Liste des abréviations.

A _n	Absorbance à (n) nm
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADP	Adénosine 5'-diphosphate
AGPI	Acide gras polyinsaturé
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
B(a)P	Benzo(a)pyrène
BHT	Hydroxytoluène butylé
Br	Branchies
Cat	Catalase
CCM	Chromatographie couche mince
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CLHP-EC	Chromatographie liquide haute performance avec détection électrochimique
CG	Chromatographie gazeuse
CG-SM	Chromatographie gazeuse - spectrométrie de masse
CG-SM-SMI	Chromatographie gazeuse - spectrométrie de masse avec détection selected ion monitoring
CHD	1,3-cyclohexanedione
CuZnSOD	Superoxyde dismutase à cuivre et à zinc
dA	Désoxyadénosine
dAMP	Désoxyadénosine-5'-monophosphate
dCMP	Désoxycytidine-5'-monophosphate
DDT	Dichlorodibenzotrithloréthane
DFAM	Déféroxamine mésylate
dG	Désoxyguanosine
dGMP	Désoxyguanosine-5'-monophosphate
dGTP	Désoxyguanosine-5'-triphosphate
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DNPH	Dinitrophénylhydrazine
dNTP	Désoxynucléosides-5'-triphosphate
DTD	DT diaphorase
ECOD	Ethoxycoumarin <i>O</i> -dééthylase
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EROD	Ethoxyresorufin <i>O</i> -dééthylase
FapyAde	4,6-diamino-5-formamidopyrimidine
FapyGua	2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine
Fe-NTA	Nitrilotriacétate ferrique
FeSOD	Superoxyde dismutase à fer
Fpg	Formamidopyrimidine ADN glycosylase

G6PDH	Glucose-6-phosphate deshydrogénase
GD	Glande digestive
GPx	Glutathion peroxydase
GRd	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion-S-transférases
HAP	Hydrocarbures polycycliques aromatiques
HNE	4-hydroxynonéal
MDA	Malonaldéhyde
MnSOD	Superoxyde dismutase à manganèse
NADH	β -nicotinamide-adénine dinucléotide (réduit)
NADPH	β -nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate (réduit)
8OHdA	8-hydroxy-2'-déoxyadénosine
8OHdG	8-hydroxy-2'-déoxyguanosine
8OHG	8-hydroxyguanine
PLGPx	Phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase
PBCs	Polychlorobiphényles
PCP	Pentachlorophénol
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SeGPx	Glutathion peroxydase sélénium dépendante
Se ind.GPx	Glutathion peroxydase sélénium indépendante
Site AP	Site apurinique/apyrimidinique
SOD	Superoxyde dismutase
TBA	Acide thiobarbiturique
TBARS	Substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique
tBOOH	<i>tert</i> -butylhydroperoxyde
TCA	Acide trichloroacétique
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine
TPA	Tetradeconylphorbolacétate
Tris	Tris-(hydroxyméthyl)amino-méthane
UV	ultraviolet

1 Introduction

1 Introduction

Au cours de ces dernières années, la nécessité d'évaluer l'impact des polluants sur la qualité des écosystèmes environnementaux a conduit à l'étude et au développement de marqueurs biologiques capables de traduire les effets des contaminants sur les biocénoses. Les biomarqueurs sont définis comme des indicateurs biochimiques, physiologiques, histologiques voire comportementaux, dont les changements peuvent révéler de manière précoce, un stress résultant des conditions environnementales ou de l'exposition à des xénobiotiques. Il est apparu nécessaire de développer séparément des biomarqueurs d'exposition, tel que l'induction des cytochromes P450, ainsi que des marqueurs de toxicité qui permettent d'exprimer un état pathologique et d'évaluer le degré d'altération des organismes exposés.

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la recherche de biomarqueurs de toxicité pour l'évaluation de l'état des populations vivant au sein des écosystèmes hydriques dulçaquicoles. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux marqueurs de stress oxydant en étudiant la lipoperoxydation et ses effets sur l'ADN.

Les radicaux libres qu'il s'agisse des espèces réactives de l'oxygène ou d'intermédiaires radicalaires issus du métabolisme de certains xénobiotiques, sont capables d'altérer les constituants cellulaires - lipides membranaires, protéines et acides nucléiques - lors de défaillances et/ou de débordements des systèmes de défense antioxydante. La lipoperoxydation ou peroxydation des lipides membranaires est un processus extrêmement destructif qui endommage les cellules directement en attaquant les structures membranaires et indirectement par la libération de produits réactifs - espèces radicalaires et aldéhydes -. La lipoperoxydation est étroitement liée aux phénomènes d'inflammation, cytotoxicité, vieillissement cellulaire, nécrose et cancérogénèse.

Les produits et intermédiaires issus du processus de peroxydation lipidique peuvent induire des altérations de l'ADN qui incluent la formation d'adduits et les cassures à l'ADN ; il nous a semblé important de disposer d'un marqueur qui puisse refléter les répercussions d'une induction de la lipoperoxydation sur l'intégrité de l'ADN. Bien que les lésions oxydatives à l'ADN soient multiples, l'oxydation en C8 de la guanine conduisant à la formation de la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8OHdG), est l'une des plus abondantes. Cette base oxydée en raison de sa détection aisée, de son potentiel mutagène reconnu et de son abondance, représente un paramètre de choix pour l'évaluation des dommages à l'ADN.

L'étude de la lipoperoxydation et de la 8OHdG a été conduite sur *Unio tumidus*, bivalve dulçaquicole autochtone. Vivant enfoui dans les sédiments, *Unio tumidus* représente un

organisme approprié pour l'étude de l'impact des polluants présents dans ce compartiment et dans l'eau intersticielle, à l'équilibre entre la phase aqueuse et la phase solide. Les bivalves sont considérés comme des organismes sentinelles en raison de leur capacité à accumuler dans leurs tissus de forts taux de contaminants environnementaux. Leur mobilité réduite rend, par ailleurs, ces organismes intéressants pour les études d'impact et les transferts *in situ* vers des sites pollués.

Nous nous sommes attachés dans un premier temps, à choisir et à optimiser les méthodes de dosage du malonaldéhyde (MDA), retenu comme indicateur de la lipoperoxydation, et de la 8OHdG afin de mesurer le taux de base de ces paramètres au niveau des branchies et des glandes digestives d'*Unio tumidus*.

Une intoxication au laboratoire a été menée afin d'estimer la sensibilité du MDA en tant qu'indicateur de toxicité chez des bivalves soumis à un stress chimique.

Nous avons ensuite suivi le MDA et la 8OHdG au cours d'études de terrain dans le but d'évaluer la toxicité des polluants sur les organismes considérés : des opérations de transfert ont mises en œuvre visant à (i) étudier les réponses des paramètres analysés chez des individus transférés en amont et en aval d'une source de pollution définie et à examiner l'influence de la durée d'exposition sur les éventuels changements observés (ii) comparer les réponses obtenues chez des bivalves engagés au sein de sites caractérisés par différents types de contamination.

2 Etude bibliographique

2 Etude bibliographique

2.1 Formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

2.1.1 Introduction

La vie a commencé en absence d'oxygène. Pourtant, environ un billion d'années après l'apparition des organismes unicellulaires, l'oxygène est apparu, produit de l'activité photosynthétique. L'adaptation du monde vivant à ces conditions aérobies a été telle que de nombreux systèmes biologiques sont devenus totalement dépendants de l'oxygène. Cette dépendance peut s'expliquer par l'efficacité de la respiration aérobie avec O_2 comme accepteur d'électrons, à produire l'ATP. L'oxygène et les espèces réactives qui en dérivent, sont paradoxalement toxiques pour les êtres vivants (Floyd, 1990a). Le fait que la vie aérobie doive se mesurer à la toxicité de l'oxygène, a été prédit en 1771 par Priestley qui a affirmé que « l'oxygène pur a des effets nocifs sur la santé » (Hippeli et Elstner, 1991). La toxicité de l'oxygène est liée à sa forte affinité électronique, produisant une variété d'intermédiaires potentiellement endommageants que sont les espèces réactives de l'oxygène. Le terme d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est un terme collectif qui décrit à la fois les radicaux de l'oxygène (O_2^- , OH , ROO , RO) et ses dérivés non radicalaires (H_2O_2 , $HOCl$, O_2 singulet, ozone). Les ROS sont constamment produites chez les organismes vivants au cours du métabolisme normal et en particulier au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale où un à deux pour-cents de l'oxygène métabolisé est converti en O_2^- (Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Pré, 1991 ; Rice-Evans *et al.*, 1991). Des sources exogènes telles que les radiations ionisantes et les xénobiotiques, peuvent également générer ces ROS et imposer un stress oxydant supplémentaire aux systèmes biologiques. Le stress oxydant a été décrit par Sies (1991) comme une perturbation de la balance prooxydant-antioxydant en faveur de l'oxydation, conduisant à des lésions potentielles. Les ROS échappant aux systèmes de défense, sont capables de causer des dommages, permanents ou transitoires, aux protéines, lipides et acides nucléiques. Ces lésions, si elles ne sont pas réparées peuvent conduire à la désorganisation membranaire, à l'inactivation enzymatique, à la fixation de mutations et/ou à la mort cellulaire.

Un radical est défini comme toute espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons non appariés. Cette large définition inclut l'atome d'hydrogène, la plupart des métaux de transition et la molécule d'oxygène elle-même.

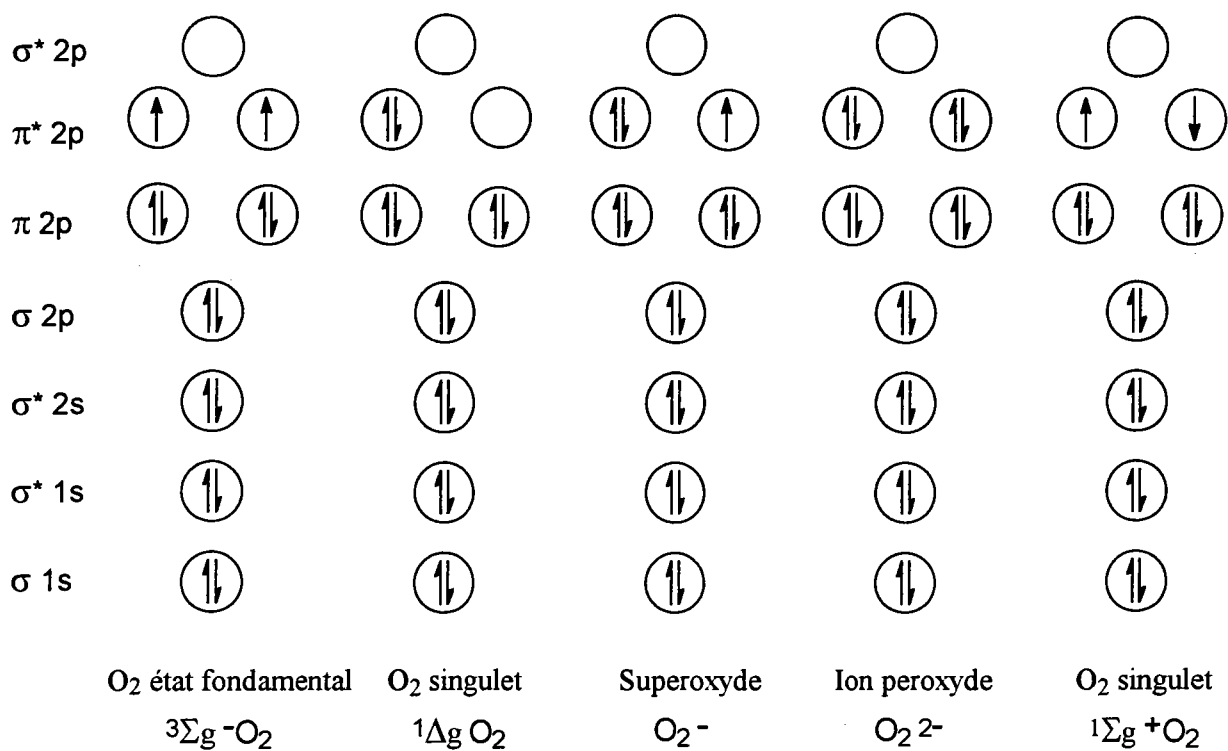


Figure 1 : Liaison dans la molécule d'oxygène diatomique.

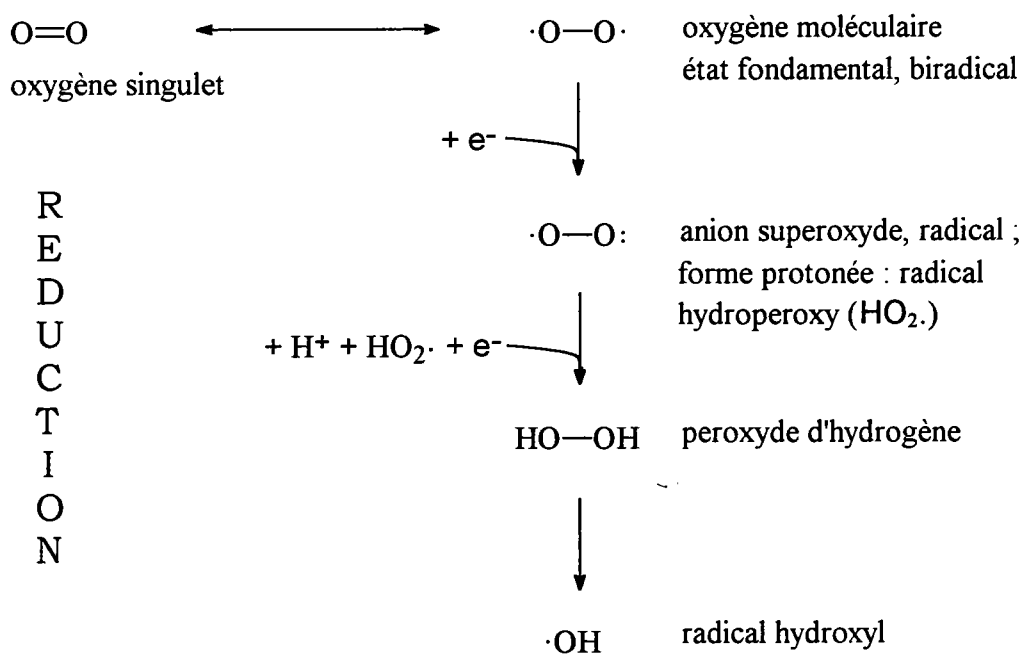


Figure 2 : Réduction séquentielle de l'oxygène moléculaire.

2.1.2 L'oxygène moléculaire

L'oxygène moléculaire est un biradical puisqu'il possède deux électrons non appariés (figure 1). C'est l'état le plus stable de la molécule. Les spins de ces électrons non appariés sont parallèles diminuant ainsi la réactivité de la molécule et justifiant son faible pouvoir oxydant. En effet, si l'oxygène tente d'oxyder un autre atome ou molécule en acceptant une paire d'électrons, ces électrons reçus devront être aussi de spins parallèles, imposant une contrainte cinétique majeure aux oxydations par O_2 . Cette restriction tend à faire accepter les électrons un à la fois par O_2 : cette réduction séquentielle de l'oxygène moléculaire produit des intermédiaires réactifs réduits par un, deux, trois électrons ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot}) (figure 2) (Halliwell et Gutteridge, 1984 ; Horton et Fairhurst, 1987).

2.1.3 L'anion superoxyde

L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est formé après addition d'un électron à la molécule d'oxygène. Il est produit de façon majoritaire *in vivo* au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (cytochrome oxydase) et du transport électronique microsomal (cytochrome P450). Il est formé également comme intermédiaire au cours la phagocytose active des leucocytes, du catabolisme peroxysomal et d'autres réactions enzymatiques impliquant la xanthine oxydase (ischémie-reperfusion), la tryptophane dioxygénase, la diamine oxydase (Di Giulio *et al.*, 1989 ; Stegeman *et al.*, 1992). Diverses molécules biologiquement importantes (glycéraldéhyde, les formes dérivées de la riboflavine, l'adrénaline, les thiols comme la cystéine) peuvent s'autooxyder et produire l'anion superoxyde (Halliwell et Gutteridge, 1989). Sa formation se fait essentiellement au niveau des membranes biologiques, compte-tenu de la solubilité beaucoup plus élevée de l'oxygène en milieu hydrophobe. L'anion superoxyde est relativement peu réactif mais il est à l'origine des deux principaux initiateurs de la lipoperoxydation que sont les radicaux hydroxyl formés à partir de H_2O_2 et hydroperoxyl (Pré, 1991). Il est considéré comme réducteur possible dans la réaction d'Haber-Weiss produisant le radical hydroxyl hautement réactif (Meneghini et Martins, 1993). L'anion superoxyde, en raison de sa charge qui l'empêche d'atteindre l'intérieur hydrophobe des membranes, ne traverse pas les membranes biologiques.

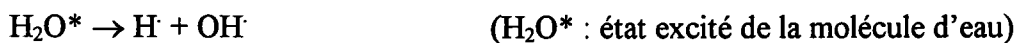
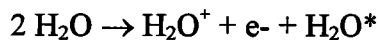
2.1.4 Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut être formé à partir de $O_2^{\cdot-}$ en solutions aqueuses par dismutation spontanée ou catalysée par la superoxyde dismutase. Il est ainsi généré pendant l'autooxydation intracellulaire de nombreux xénobiotiques réduits ou après la formation

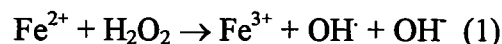
enzymatique de $O_2^{\cdot -}$. Diverses oxydases produisent H_2O_2 sans l'intervention de $O_2^{\cdot -}$ (glycolate oxydase, D-aminoacide oxydase, urate oxydase) (Gutteridge et Halliwell, 1989 ; Meneghini et Martins, 1993). H_2O_2 n'est pas un radical et il est généralement modérément réactif : c'est un faible agent oxydant n'inactivant directement que peu d'enzymes, habituellement par oxydation des groupes -SH. Très diffusible, H_2O_2 traverse rapidement les membranes cellulaires. Parmi les ROS produits par les neutrophiles activés, H_2O_2 est certainement celui qui pénètre dans les cellules cibles pour atteindre le noyau (Meneghini et Martins, 1993). Sa cytotoxicité résulte essentiellement de sa conversion en OH^{\cdot} dépendante des ions de métaux de transition (Fe, Cu) selon la réaction de Fenton.

2.1.5 Le radical hydroxyl

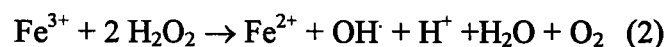
Le radical hydroxyl (OH^{\cdot}) peut être formé suite à la radiolyse de l'eau par les radiations ionisantes (rayons X et γ) selon les réactions détaillées ci-dessous :



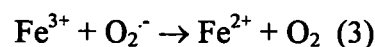
Le mode le plus important de génération de OH^{\cdot} se fait à partir H_2O_2 par la fission homolytique de la liaison O-O catalysée par la chaleur, les UV ou par les ions de métaux de transition (Fe, Cu) selon la réaction décrite par Fenton (1894) (Halliwell et Gutteridge, 1984) :



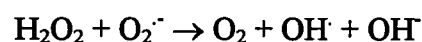
Des traces de Fe^{3+} peuvent réagir ensuite avec H_2O_2 mais cette réaction est très lente à pH physiologique :



La réaction de Fenton peut se poursuivre par la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} en présence de l'anion superoxyde :



La résultante des réactions (1) et (3) est définie sous le nom de réaction Haber-Weiss catalysée par le fer (1934) (Halliwell et Gutteridge, 1984):



ROS	Demi-vie (secondes) à 37 °C
OH	10^{-9}
RO	10^{-6}
ROO	7
L	10^{-8}
H ₂ O ₂	e
O ₂ ⁻	e
¹ O ₂	10^{-6}
NO	1 - 10

Table 1 : Demi-vies estimées des espèces réactives de l'oxygène(ROS). e :enzymatique, L : radical d'acide gras polyinsaturé.

Les sels de cuivre (Cu I) réagissent également avec H_2O_2 pour produire $OH\cdot$.

Le radical $OH\cdot$ est l'espèce chimique la plus réactive de celles connues réagissant à des constantes de vitesse extrêmement élevées avec presque tous les types de constituants cellulaires : sucres, acides aminés, lipides, nucléotides et acides organiques (table 1). $OH\cdot$ réagit par abstraction d'atomes d'hydrogène, par addition et par transfert d'électrons. *In vivo* il attaque immédiatement les macromolécules au niveau ou à proximité de son site de formation. Sa faible durée de vie prévient sa diffusion d'un compartiment cellulaire à un autre où, par contre, il peut être généré à partir de H_2O_2 plus diffusible.

2.1.6 L'oxygène singulet

L'oxygène singulet n'est pas un radical mais une espèce en état d'excitation. Deux états singulet de l'oxygène existent dans lesquels la restriction de spin est supprimée ce qui entraîne une réactivité accrue. L'état $^1\Sigma_g^+$ est extrêmement énergétique et est rapidement décomposé en état $^1\Delta_g$, le plus important dans les systèmes biologiques. Il est produit par décomposition des peroxydes lipidiques ou par dismutation spontanée de $O_2^{\cdot-}$. Il est formé également au cours de réactions de photosensibilisation (type II). Plusieurs constituants cellulaires (les chlorophylles, le rétinol, les flavines, les porphyrines) et de nombreux colorants (acridines, bleu de méthylène, rouge neutre) agissent comme des photosensibilisateurs dans la cellule produisant 1O_2 et $O_2^{\cdot-}$ en présence de O_2 (Epe, 1993a). L'oxygène singulet peut être produit également pendant la phagocytose. Sa réactivité est suffisamment forte pour modifier directement l'ADN, les protéines et les lipides. Il est capable, en particulier, de réagir directement avec les doubles liaisons carbone-carbone des acides gras polyinsaturés des lipides membranaires générant des hydroperoxydes impliqués dans le processus de lipoperoxydation (Halliwell et Gutteridge, 1989).

2.1.7 Les radicaux peroxy

Les radicaux peroxy ($ROO\cdot$) sont formés par couplage de l'oxygène moléculaire avec les radicaux libres centrés sur le carbone. Il s'agit d'une réaction extrêmement rapide qui se produit aux tensions en oxygène auxquelles la plupart des cellules sont exposées. Le couplage de O_2 aux radicaux carbone est la première étape de propagation dans l'autooxydation des acides gras polyinsaturés des phospholipides, des triglycérides et du cholestérol (cf. 2.2). La formation de radicaux peroxy peut être induite par la réaction de $OH\cdot$ avec les protéines et les acides nucléiques. Une autre voie de production des $ROO\cdot$ implique la réduction catalysée par les métaux des hydroperoxydes lipidiques en radicaux alkoxy ($RO\cdot$) insaturés qui réagissent avec O_2 pour former les $ROO\cdot$. Les radicaux peroxy sont beaucoup plus stables que les autres

radicaux de l'oxygène et ont la capacité de diffuser relativement loin de leur site de génération avant de réagir avec une molécule cible (Morrero et Marnett, 1993). La plupart des ROO[•] biologiques sont neutres et fortement lipophiles, leur procurant la propriété de pénétrer les cellules et les organites subcellulaires. De plus à la différence des autres ROS, ils sont capables de produire des epoxydes et des radicaux alkoxy par des réactions d'addition.

L'ensemble de ces espèces réactives de l'oxygène est impliqué directement ou indirectement dans l'initiation du processus de la lipoperoxydation.

2.2 La lipoperoxydation

2.2.1 Introduction

L'oxydation des lipides, amenant au rancissement, fut reconnue dès l'Antiquité comme un problème de conservation des huiles et des graisses. Les mécanismes par lesquels les lipides insaturés réagissent avec l'oxygène moléculaire pour subir « l'autooxydation » ou « la peroxydation » ont été établis dans les années 1940 par Farmer et ses collaborateurs (Gutteridge et Halliwell, 1990). Les réactions de peroxydation ont été longuement étudiées par les scientifiques de l'industrie alimentaire, de la chimie des polymères, ainsi que par les conservateurs de musée concernés par la dégradation oxydative de tableaux de valeur. Ce n'est seulement que depuis les années 1950 que le rapport de la lipoperoxydation avec la biologie et la médecine a été exploré (Gutteridge et Halliwell, 1990).

2.2.2 La lipoperoxydation spontanée : une réaction en chaîne

Une des premières descriptions des différentes étapes de la lipoperoxydation a été donné dans les années 1820 par de Saussure. La peroxydation lipidique ou lipoperoxydation réfère communément à la destruction oxydative des acides gras polyinsaturés (AGPI) par un processus autocatalytique incontrôlé conduisant à la formation d'hydroperoxydes d'acides gras et de produits secondaires incluant une large variété d'aldéhydes. Les membranes biologiques et les lipoprotéines sont sensibles à la peroxydation lipidique car elles contiennent les substrats nécessaires à ce processus endommageant. Ainsi les acides gras les plus couramment présents dans les cellules animales, l'acide linoléique (18 : 2), l'acide arachidonique (20 : 4), et l'acide docosahexaénoïque (22 : 6) sont des cibles potentielles et leur susceptibilité augmente avec le degré d'insaturation. Les acides gras à une double liaison tel que l'acide oléique (18 : 1) sont

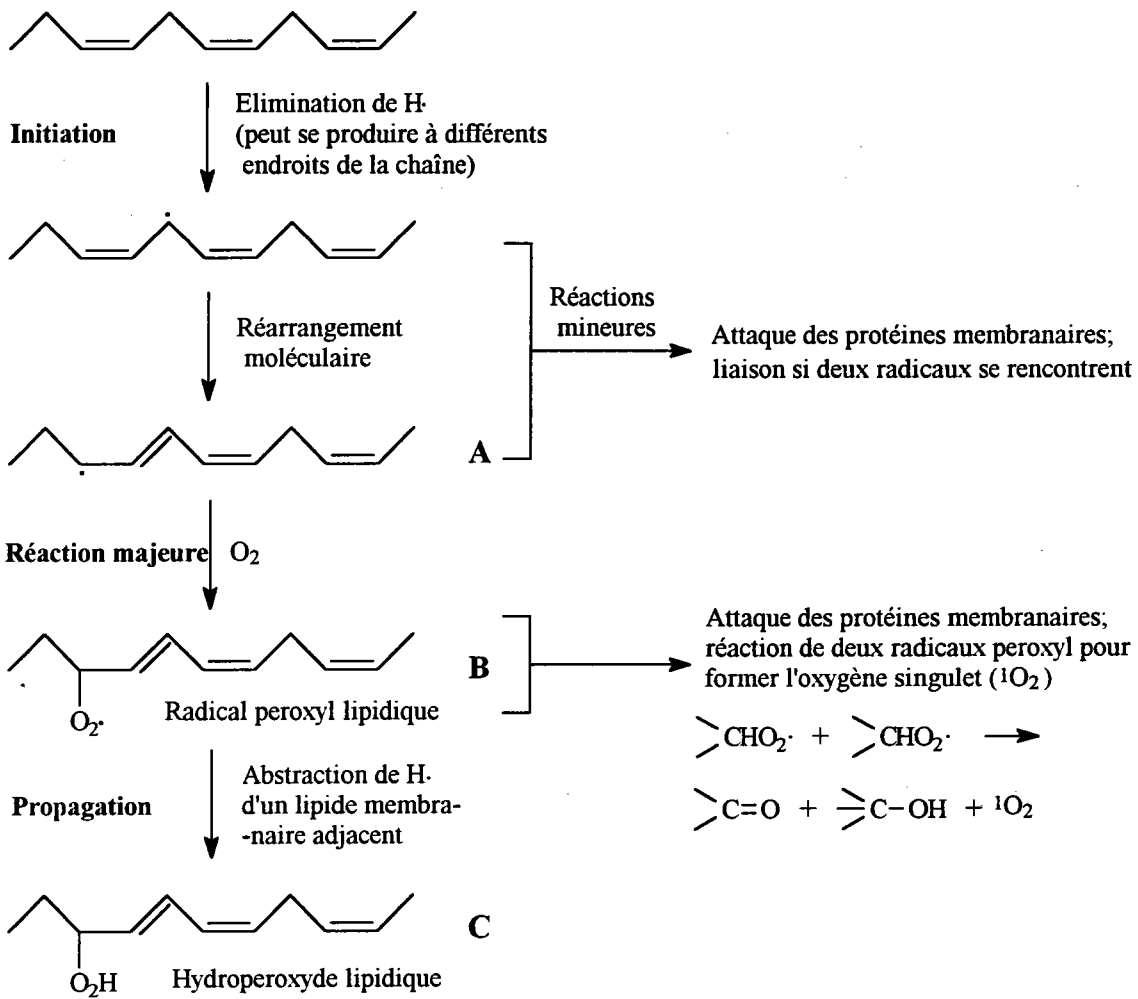


Figure 3 : Mécanisme de la lipoperoxydation. L'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir d'un acide gras à 3 doubles liaisons est représentée. A, B, C possèdent des structures *double liaison diène conjugué* qui absorbent la lumière UV ou aux environs de 234 nm.

relativement résistants et les acides gras saturés ne s'oxydent que dans des conditions extrêmes (Cheeseman, 1993).

La lipoperoxydation est classiquement décrite comme un processus s'organisant en trois phases : initiation, propagation et terminaison (figure 3).

L'initiation de la lipoperoxydation correspond à la création d'un radical d'AGPI (L \cdot) par l'abstraction d'un atome d'hydrogène de l'acide gras cible (LH) par une espèce radicalaire. Le radical initiateur peut être une quelconque espèce suffisamment oxydante pour réagir avec l'AGPI : le radical hydroxyl, la plupart des radicaux peroxy et alkoxy sont capables d'initier la lipoperoxydation. L'anion superoxyde n'est pas suffisamment oxydant pour réagir avec les AGPI ; sa forme protonée, le radical perhydroxyl (HO $_2\cdot$) en est capable, mais sa concentration reste néanmoins très faible à pH physiologique. Certains complexes du fer peuvent initier la lipoperoxydation et sont largement utilisés dans les systèmes expérimentaux *in vitro* (e.g., ADP-Fe). L'espèce arrachant l'atome d'hydrogène de l'AGPI peut également être une molécule radicalaire de l'environnement (oxyde d'azote, ozone) ou le métabolite radicalaire d'un xénobiotique. La cible pour la réaction d'abstraction de l'atome d'hydrogène est un groupe méthylène entouré par deux doubles liaisons. Le radical formé est spontanément stabilisé par réarrangement moléculaire pour produire un radical diène conjugué. En conditions aérobies, le radical d'acide gras réagit avec l'oxygène moléculaire pour former un radical peroxy lipidique (LOO \cdot). Les radicaux peroxy peuvent se combiner entre eux ou attaquer les protéines membranaires ; mais ils sont capables également de soustraire un atome d'hydrogène à un acide gras adjacent au niveau de la membrane et ainsi de déclencher une nouvelle chaîne d'oxydation, formant un hydroperoxyde lipidique (LOOH) et générant un nouveau radical d'acide gras. C'est l'étape de propagation de la lipoperoxydation. Une unique étape d'initiation peut par conséquent être à l'origine de la conversion de centaines de chaînes d'acides gras en hydroperoxydes lipidiques. Ces hydroperoxydes sont des composés instables, leur décomposition est accélérée, en particulier, en présence de formes ionisées de métaux de transition (fer, cuivre) mais également de structures hémiques (hème, méthémoglobine, cytochromes). Le processus complexe de décomposition des hydroperoxydes lipidiques aboutit d'une part à la formation de radicaux alkoxy et peroxy capables d'initier de nouvelles chaînes de lipoperoxydation, et d'autre part à des espèces dites de coupure par rupture covalente, en particulier les aldéhydes (table 2). La longueur de la phase de propagation dépend de nombreux facteurs incluant le rapport lipide / protéine dans la membrane, la composition en acides gras, la concentration en oxygène et la présence d'antioxydants membranaires (Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Gutteridge et Halliwell, 1990 ; Cheeseman, 1993).

<i>n</i> -Alcanals	2-Alcénals	4-Hydroxyalcénals	Autres
Propanal	Acroléine	4-Hydroxynonéal	Malonaldéhyde
Butanal	Penténal	4-Hydroxyhénal	2,4-Heptadiénal
Pentanal	Hénal	4-Hydroxy-2,5-nonadiénal	2,4-Decadiénal
Hénal	Octénal	4,5-Dihydroxydécénal	5-Hydroxyoctanal
Nonanal	Nonénal		Butanone

Table 2 : Produits carbonyles typiques issus de la décomposition des hydroperoxydes lipidiques dans les membranes de cellules animales.

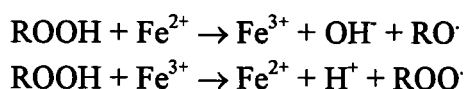
La lipoperoxydation est une réaction en chaîne autocatalytique qui, si elle n'est pas stoppée, peut détruire tous les AGPI dans un système biologique. La terminaison consiste en la formation de composés stables issus de l'association de deux espèces radicalaires. La probabilité de rencontre des radicaux libres étant beaucoup plus faible que celle de la rencontre avec les acides gras, la phase de terminaison ne peut survenir que plus tardivement. Il est à noter que la réaction de deux radicaux peroxy peut générer l'oxygène singulet, lui-même espèce réactive.

2.2.3 Rôle du fer dans le processus de lipoperoxydation

Le rôle exact joué par les ions fer dans l'accélération de la lipoperoxydation est encore à présent confus. Les sels ou les complexes de fer sont en général décrits comme initiateurs de la lipoperoxydation mais dans la plupart des cas, ils ne catalysent que la décomposition des hydroperoxydes lipidiques préformés. Les sels de cuivre stimulent aussi la lipoperoxydation, probablement par un mécanisme similaire. Il est par conséquent extrêmement difficile de distinguer l'initiation par les complexes du fer des réactions de propagation.

Le fer (II) peut générer l'anion superoxyde par autooxydation avec l'oxygène moléculaire. Il catalyse également la réaction de Fenton produisant à partir de H_2O_2 le radical $OH\cdot$ capable d'initier la chaîne de peroxydation. Il a été proposé cependant, qu'un complexe fer-oxygène puisse se substituer à $OH\cdot$ dans l'initiation de la lipoperoxydation. Les candidats possibles incluent les espèces ferryl et perferryl ($Fe^{2+} - O_2 \leftrightarrow Fe^{3+} - O_2^{\cdot-}$) et des complexes Fe^{2+} - oxygène - Fe^{3+} (Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Minotti et Aust, 1992 ; Minotti, 1993).

Le fer peut également stimuler la propagation de la lipoperoxydation en décomposant les hydroperoxydes lipidiques produisant les radicaux alkoxy et peroxy capables d'initier de nouvelles chaînes d'oxydation. Les sels ferreux sont plus actifs pour stimuler la lipoperoxydation que les sels ferriques car ils sont plus solubles, réagissent plus rapidement avec les hydroperoxydes qui génèrent les radicaux alkoxy très réactifs :



La présence d'agents réducteurs (ascorbate, NAD(P)H, $O_2^{\cdot-}$ produits par le système xanthine-oxydase) augmente souvent le taux de lipoperoxydation car ils maintiennent le fer sous forme ferreux (Gutteridge, 1984 ; Halliwell et Gutteridge, 1984 ; Cheeseman, 1993).

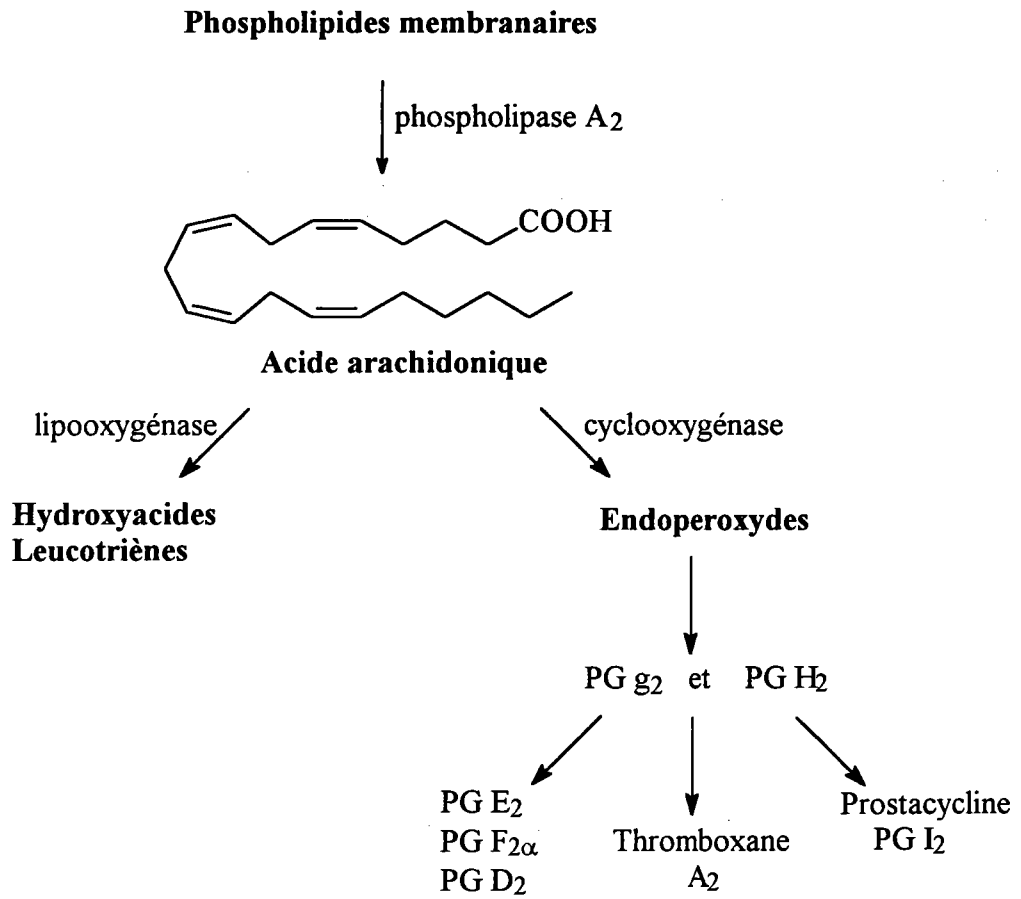


Figure 4 : Le métabolisme de l'acide arachidonique.

2.3 Les ROS comme espèces utiles

Les ROS sont essentielles à de nombreux processus biologiques normaux : elles sont impliquées entre autre dans le métabolisme des eicosanoïdes et exercent un pouvoir bactéricide contre les foyers infectieux (Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Rice-Evans *et al.*, 1991 ; Pré, 1991).

Les eicosanoïdes représentent une famille complexe de lipides biologiquement actifs dérivant des acides gras polyinsaturés par insertion d'oxygène moléculaire via des réactions enzymatiques. L'insertion de l'oxygène se produit par des mécanismes radicalaires au niveau des sites actifs des enzymes. Les eicosanoïdes sont classés en prostaglandines, prostacycline, thromboxanes et leucotriènes. Ils sont formés à partir de l'acide arachidonique par deux voies métaboliques distinctes (figure 4):

- celle de la lipooxygénase conduisant à des acides gras hydroxylés insaturés et leurs dérivés : les leucotriènes (triènes conjugués), agents de l'inflammation et contracturants des fibres lisses
- celle de la cyclooxygénase conduisant à des endoperoxydes puis aux prostaglandines, aux thromboxanes et à la prostacycline. Les prostaglandines possèdent des propriétés hypotensives, contracturantes des fibres lisses, anticonceptionnelles. Elles agissent sur l'agrégation plaquettaire et sur le tonus vasculaire.

Les cellules phagocytaires actives - macrophages et neutrophiles - augmentent de façon marquée leur consommation en oxygène lorsqu'elles rencontrent des particules étrangères par l'activation d'un complexe enzymatique associé à leur membrane plasmique : le complexe NADPH-oxydase. Ce système oxyde au niveau cytosolique le NADPH en NADP⁺, et les électrons ainsi libérés sont utilisés pour réduire l'oxygène en anion superoxyde O₂⁻. Les particules étrangères englobées dans une vésicule de la membrane plasmique, sont alors exposées à un flux intense de O₂⁻ dans le cytoplasme du phagocyte. L'agressivité de l'anion superoxyde est probablement liée à sa conversion en radical OH. Une fois la vacuole phagocytaire formée, la fusion avec d'autres granules dans le cytoplasme du neutrophile libère la myéloperoxydase qui utilise le peroxyde d'hydrogène comme substrat et oxyde les chlorures en hypochlorite (ClO⁻) dont le pouvoir bactéricide est supérieur à ceux de O₂⁻ et de Cl₂.

2.4 Protection contre la lipoperoxydation

Les sources endogènes de production des ROS, impliquées dans l'initiation de la réaction en chaîne de lipoperoxydation sont multiples. Tous les organismes aérobies possèdent par conséquent des systèmes de défense antioxydante ayant pour rôle de contrebalancer cette production endogène de radicaux.

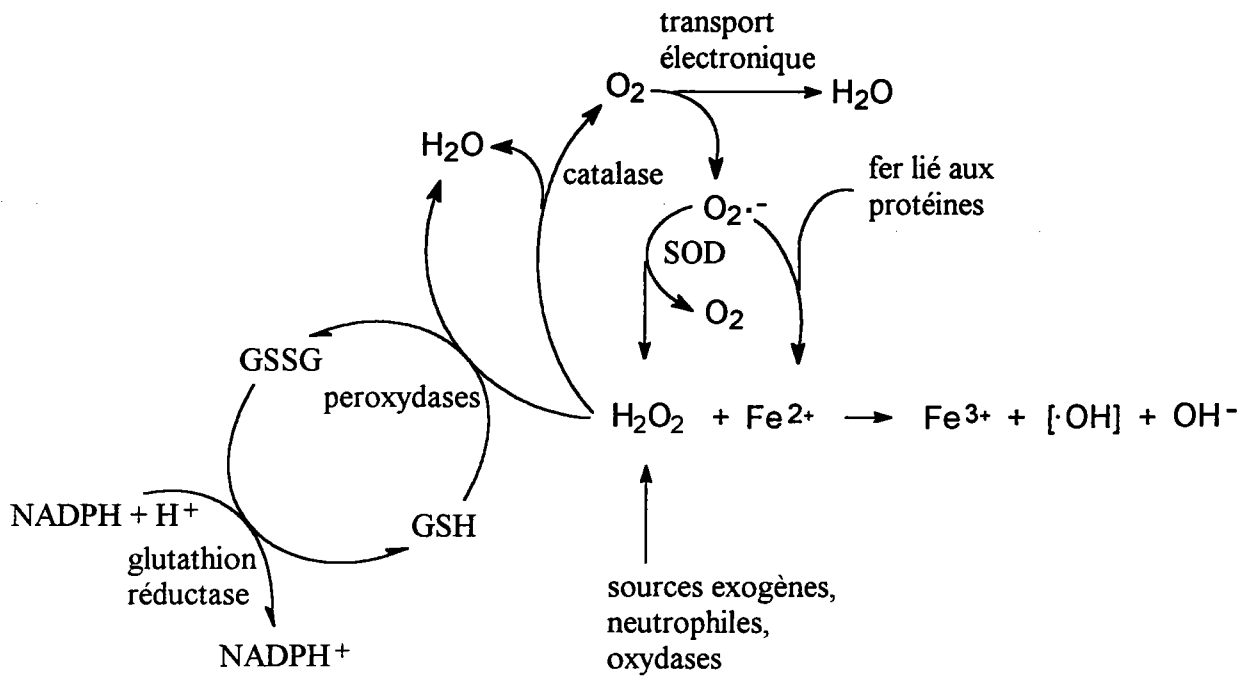


Figure 5 : Enzymes antioxydantes impliquées dans l'élimination des ROS.

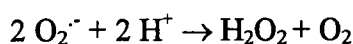
La vaste diversité dans leurs demi-vies, de la nanosecondes pour OH^\cdot aux secondes pour les ROO^\cdot , sous-entend plusieurs niveaux de défense : prévention, interception et réparation (Sies, 1991). La défense contre le très réactif radical hydroxyl ne peut être que la prévention car un agent devrait être présent à de très fortes concentrations pour l'intercepter. L'interception est dévolue aux antioxydants comme les tocophérols qui brisent les chaînes de peroxydation et réagissent avec les radicaux peroxy. Les défenses spécifiques contre la lipoperoxydation consistent en :

1. la prévention de l'initiation de la lipoperoxydation en neutralisant les radicaux initiateurs
2. la séquestration des ions de métaux qui peuvent générer des espèces initiateurs
3. la prévention de la décomposition des hydroperoxydes lipidiques afin d'inhiber la génération d'espèces propageantes
4. le piégeage des radicaux libres impliqués dans la propagation du processus.

Le développement par les cellules de multiples lignes de défense contre la lipoperoxydation témoigne de la nécessité de prévenir son occurrence et de limiter ses effets.

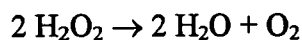
- Trois enzymes contribuent à neutraliser les espèces capables d'initier directement ou indirectement le processus de lipoperoxydation : les superoxydes dismutases, la catalase et les glutathion peroxydases (figure 5). Une de leurs caractéristiques importantes est leur inductibilité sous des conditions de stress oxydatif, l'induction pouvant conduire à une adaptation à ces conditions (Di Giulio *et al.*, 1989).

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloenzymes qui catalysent la réaction par laquelle l'anion superoxyde est dismuté en H_2O_2 :



Trois types distincts de SOD, avec des centres métalliques différents, ont été identifiés : la CuZnSOD typiquement associée au cytosol des eucaryotes et aux chloroplastes des plantes supérieures découverte par Mc Cord et Fridovich (1969), la MnSOD retrouvée chez les bactéries et dans les mitochondries et les peroxysomes des organismes supérieurs, la FeSOD présente chez les bactéries et chez quelques plantes supérieures.

La catalase est localisée pratiquement exclusivement dans les peroxysomes et elle est responsable, grâce à sa puissante activité peroxydasique, de la décomposition du peroxyde d'hydrogène à l'intérieur de ces organites :



C'est une enzyme homotétramérique constituée de quatre groupements prosthétiques héminiques au sein desquels le fer est sous forme ferrique. L'activité catalasique est présente chez les mammifères, les vertébrés et invertébrés aquatiques et les procaryotes.

Les peroxydases catalysent la réduction des hydroperoxydes en leurs alcools correspondants moins réactifs en utilisant le glutathion comme cofacteur, à la différence de la catalase qui ne décompose que H_2O_2 :



Une glutathion peroxydase sélénium dépendante (SeGPx) a été décrite pour la première fois dans des tissus animaux par Mills (1957). Elle utilise le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes organiques comme substrats. Elle est active contre les hydroperoxydes d'acides gras libres et mais pas contre ceux restés attachés aux phospholipides membranaires : ces derniers doivent être préalablement libérés par la phospholipase A_2 pour qu'elle puisse agir. Ursini *et al.* (1982) ont identifié une enzyme contenant du sélénium et dépendante du glutathion qui réduit les hydroperoxydes phospholipidiques dans les membranes cellulaires sans intervention préalable de la phospholipase A_2 : il s'agit de la phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase (PLGPx) (Ursini *et al.*, 1991 ; Cheeseman, 1993). La PLGPx est active également dans les membranes subcellulaires des microsomes et des mitochondries.

Certaines isoformes des glutathion transférases catalysent aussi la décomposition des hydroperoxydes lipidiques et leur activité est alors qualifiée d'activité « glutathion peroxydase sélénium indépendante » (Ketterer et Coles, 1991).

La contribution précise de ces diverses voies enzymatiques de décomposition des hydroperoxydes lipidiques n'est pas encore parfaitement élucidée dans tous les tissus et dans toutes les circonstances. Plusieurs voies opèrent sans doute en parallèle (Cheeseman, 1993).

- Une partie de la stratégie préventive de la défense antioxydante consiste en la séquestration des métaux de telle façon qu'ils ne soient plus disponibles pour catalyser la décomposition des hydroperoxydes lipidiques. La transferrine, la ferritine et l'hémosidérine sont des protéines qui sont utilisées par les cellules pour garder le fer libre fortement lié sous une forme non réactive (Halliwell et Gutteridge, 1989). La céruléoplasmine joue aussi un rôle important, non seulement en liant le cuivre mais aussi en oxydant le fer pour le maintenir sous la forme ferrique moins réactive.

- Les antioxydants interrompant les réactions en chaîne sont particulièrement importants dans la prévention de la lipoperoxydation. La fonction de ces molécules est de piéger les radicaux

peroxyl et alkoxy lipidiques propageant la peroxydation. Les piègeurs de radicaux sont par définition liposolubles et sont représentés dans les systèmes biologiques par les tocophérols, les carotènes et l'ubiquinone.

L' α -tocophérol, forme prédominante la plus active des tocophérols, est présent dans les membranes cellulaires dans des proportions d'une molécule pour plusieurs centaines de molécules d'AGPI. En interceptant les radicaux (ROO \cdot , OH \cdot et RO \cdot), il devient lui-même un radical qui est incapable cependant d'initier de nouvelles réactions en chaîne en raison de sa stabilité. La molécule d' α -tocophérol peut être alors régénérée par la vitamine C.

Les carotènes et le β -carotène, au sein de la membrane, sont généralement considérés comme des capteurs des radicaux hydroxyl et peroxyl ainsi que des états singulet de l'oxygène (Horton et Fairhurst, 1987 ; Pré, 1991 ; Rice-Evans *et al.*, 1991).

L'ubiquinone joue un rôle majeur dans la défense des lipoprotéines plasmatiques et des membranes mitochondriales (Cheeseman, 1993).

- L'action de ces antioxydants membranaires est relayée au niveau cytosolique par des réducteurs ou des capteurs de radicaux tels que le glutathion (GSH), l'acide ascorbique et l'acide urique, prévenant l'initiation et/ou la propagation de la lipoperoxydation.

Le GSH est le thiol non protéique le plus abondant dans les organismes vivants. Il possède deux rôles principaux dans la détoxification : celui d'un conjuguant clé d'intermédiaires électrophiles et celui d'un important antioxydant. Il peut, en plus de son rôle de cofacteur des enzymes antioxydantes, agir comme un piègeur direct des oxyradicaux (OH \cdot et $^1\text{O}_2$) et réducteur de H₂O₂ et des hydroperoxydes lipidiques (Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Stegeman *et al.*, 1992).

L'ascorbate (vitamine C) est un antioxydant majeur intervenant dans tous les organes (Pré, 1991). Il peut directement capter $^1\text{O}_2$ et réduit rapidement avec les radicaux ROO \cdot , OH \cdot , O₂ $^{\cdot-}$ et HO₂ \cdot . Son action semble néanmoins plus complexe car il peut se comporter paradoxalement comme un antioxydant ou un prooxydant (Horton et Fairhurst, 1987 ; Halliwell et Gutteridge, 1989).

L'urate, en plus de sa capacité à lier fortement le fer et le cuivre, agit comme un puissant piègeur des radicaux peroxyl, alkoxy, du HOCl et de l'oxygène singulet (Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Rice-Evans *et al.*, 1991).

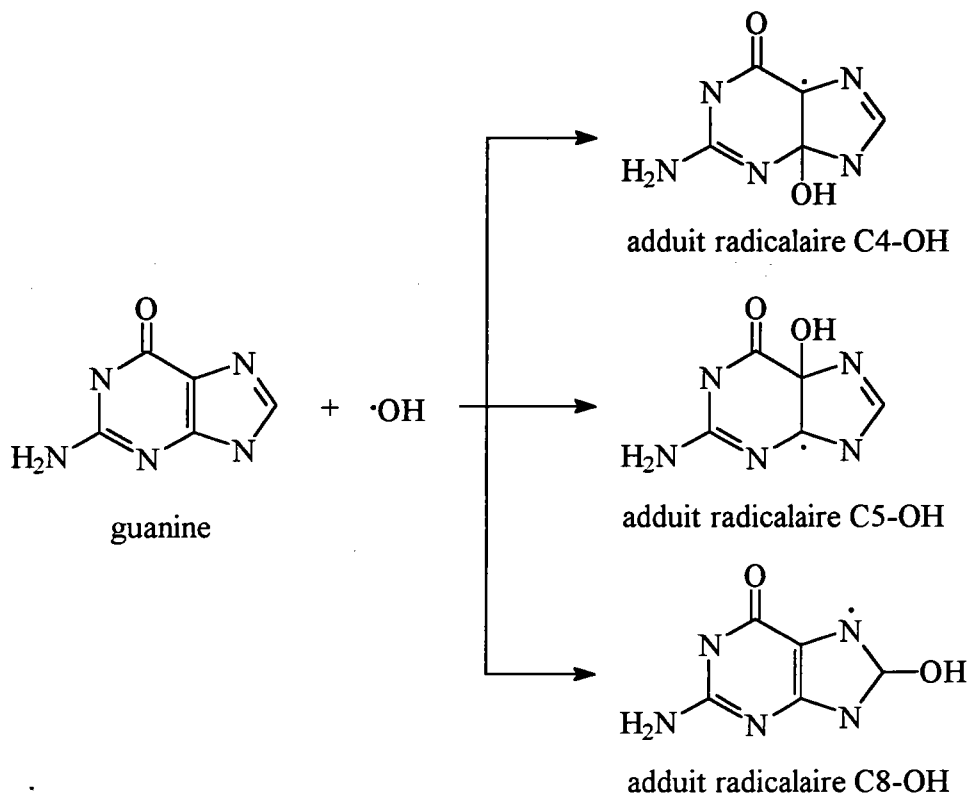


Figure 6 : Réactions du radical hydroxyl avec la guanine (d'autres formes mésomériques des radicaux que celles représentées peuvent également exister).

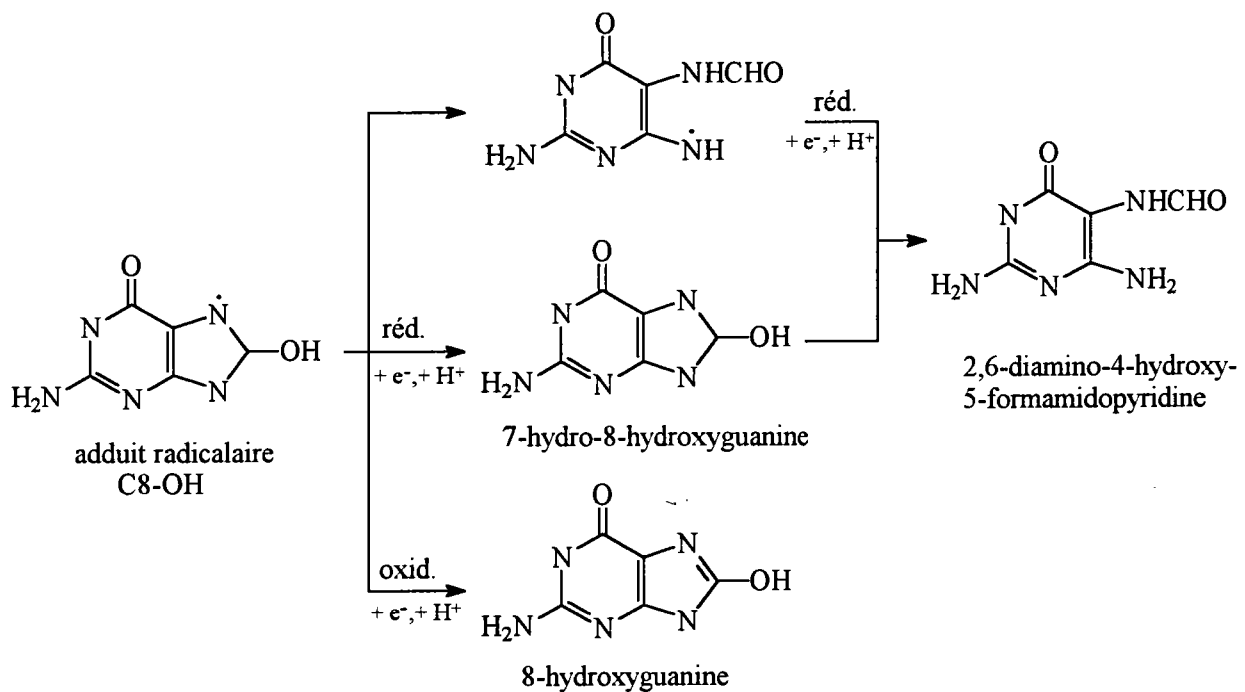


Figure 7 : Réactions de l'adduit radicalaire C8-OH de la guanine (d'autres formes mésomériques des radicaux que celles représentées peuvent également exister).

2.5 Conséquences endommageantes de la lipoperoxydation

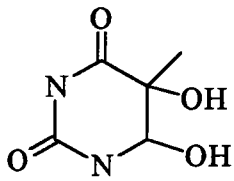
2.5.1 Introduction

La lipoperoxydation est un processus extrêmement destructif pour les systèmes biologiques si elle n'est pas rapidement maîtrisée par les systèmes antioxydants. Dans les conditions physiologiques normales, du fait de l'efficacité de la défense antioxydante, la lipoperoxydation présente des conséquences réduites. Par contre, l'exposition à certains xénobiotiques prooxydants et/ou certains dérèglements physiologiques peuvent générer d'importantes quantités de radicaux libres, débordant les possibilités de protection enzymatique et épuisant le pool de piègeurs d'espèces réactives : des effets toxiques et irréversibles peuvent alors apparaître. La cytotoxicité de la lipoperoxydation est imputable aux espèces radicalaires produites et aux aldéhydes qui en sont issus.

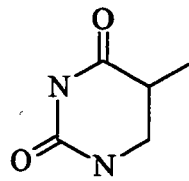
2.5.2 Cytotoxicité des espèces radicalaires

- Les radicaux exercent leur toxicité simultanément sur l'ensemble des membranes cellulaires, et des biomolécules telles que les acides nucléiques et les protéines dont ils perturbent l'état redox. La peroxydation des acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires est à l'origine d'une déficience du fonctionnement membranaire, par la diminution de la fluidité membranaire, l'inactivation des récepteurs liés à la membrane et des enzymes qui y sont associées (glucose-6-phosphate et cytochrome P450) et l'augmentation de la perméabilité non spécifique aux ions comme le Ca^{2+} (Gutteridge et Halliwell, 1990). Dans les mitochondries, la peroxydation se traduit par un gonflement puis une lyse de ces organites ; il en est de même pour les lysosomes dont la rupture peut s'accompagner de la libération d'enzymes catalysant l'hydrolyse des protéines, des acides nucléiques et des polysaccharides cellulaires (Horton et Fairhurst, 1987 ; Snell et Mullock, 1987 ; Pré, 1991).

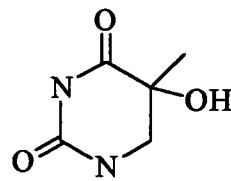
- Les protéines intracellulaires et extracellulaires sont des cibles critiques de l'attaque des radicaux libres en raison de leurs activités catalytiques. Plusieurs constituants amino-acyl (cystéine, méthionine, tryptophane) cruciaux pour leurs fonctions sont particulièrement vulnérables aux dommages induits par les espèces radicalaires. Les ROS peuvent agir directement et simultanément sur plusieurs de ces sites, et ce préférentiellement au niveau des groupements -SH et -NH₂ (Halliwell et Gutteridge, 1989). Les conséquences de ces attaques consistent en des agrégations et des pontages, des fragmentations et des cassures, et des modifications des groupements thiols (Horton et Fairhurst, 1987 ; Pré, 1991 ; Rice-Evans *et al.*, 1991).



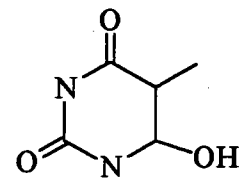
thymine glycol



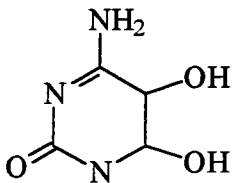
5,6-dihydrothymine



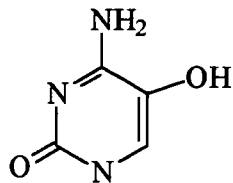
5-hydroxy-6-hydroxythymine



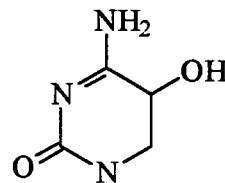
6-hydroxy-5-hydroxythymine



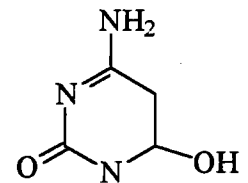
cytosine glycol



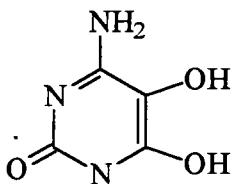
5-hydroxycytosine



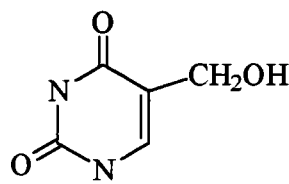
5-hydroxy-6-hydroxycytosine



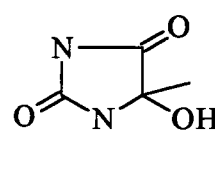
6-hydroxy-5-hydroxycytosine



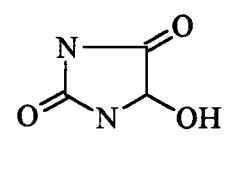
5,6-dihydroxycytosine



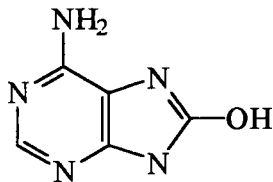
5-(hydroxymethyl)uracile



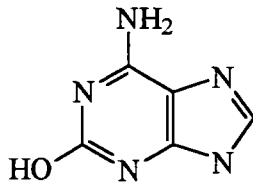
5-hydroxy-5-méthylhydantoïne



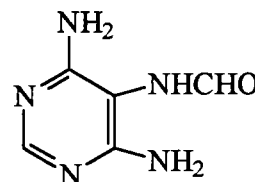
5-hydroxyhydantoïne



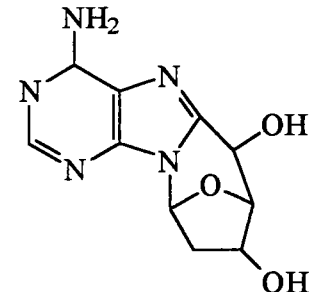
8-hydroxyadénine



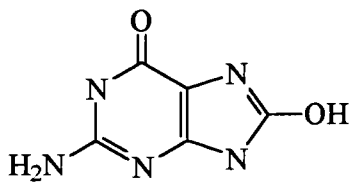
2-hydroxyadénine



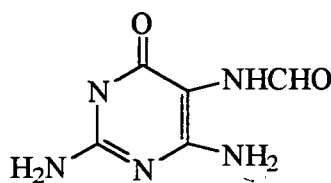
4,6-diamino-5-formamidopyrimidine



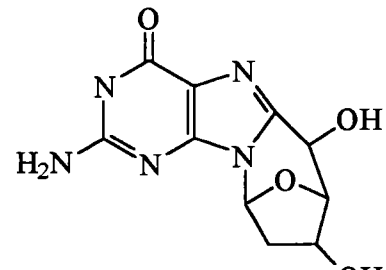
8,5'-cyclo-2'-déoxyadénosine



8-hydroxyguanine



2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine



8,5'-cyclo-2'-déoxyguanosine

Figure 8 : Structures des produits modifiés des bases de l'ADN.

- Les espèces réactives de l'oxygène peuvent produire de multiples lésions à l'ADN et aux nucléoprotéines telles que des modifications des bases et des sucres, des cassures simple brin, des sites abasiques et des pontages ADN-protéines. Il est bien établi que l'anion superoxyde, les peroxydes lipidiques et le peroxyde d'hydrogène sont insuffisamment réactifs *per se* pour attaquer l'ADN (Halliwell *et al.*, 1992 ; Breimer, 1990 ; Halliwell et Aruoma, 1993 ; Dizdaroglu, 1993). Leur toxicité *in vivo* résulte de leur conversion en espèces hautement réactives : étant relativement stables, H₂O₂ et les peroxydes lipidiques peuvent traverser facilement les membranes et atteindre le noyau où ils réagissent avec le Fe (II) ou le Cu (I) nucléaires pour former le radical hydroxyl et les radicaux alkoxy respectivement (Halliwell et Aruoma, 1991 ; Meneghini et Martins, 1993 ; Takeuchi *et al.*, 1996). Le radical hydroxyl est tellement réactif qu'il peut attaquer tous les constituants de l'ADN par des réactions dites « site spécifique » : en raison de sa faible distance de diffusion (~ 2 nm), les lésions vont se produire où il a été généré (Pryor, 1988 ; Halliwell et Aruoma, 1991 ; Zastawny *et al.*, 1995).

Les radicaux hydroxyl réagissent avec les bases de l'ADN par des réactions d'addition. L'addition de OH[•] se fait au niveau de la double liaison C5-C6 pour les pyrimidines et en positions C5, C6 et C8 des purines, produisant des adduits radicalaires oxydants et/ou réducteurs. L'abstraction par OH[•] d'un atome d'hydrogène du groupement méthyle de la thymine peut aussi se produire. La figure 6 illustre les structures des adduits radicalaires de la guanine. Les radicaux peuvent être oxydés ou réduits selon leurs propriétés redox. La thymine glycol est produite par l'oxydation du radical 5-hydroxy-6-yl. L'oxydation à un électron des adduits radicalaires C8-OH des purines conduit à la formation de 8-hydroxypurines, tandis que les formamidopyrimidines sont formées par une réduction des formes imidazole à cycle ouvert. Ces réactions pour la guanine sont illustrées sur la figure 7. Les 8-hydroxypurines et les formamidopyrimidines peuvent être produites à la fois en présence et en absence d'oxygène. Les structures de certains produits dérivés des bases de l'ADN sont représentées sur la figure 8.

Une faible fraction des radicaux hydroxyl (jusqu'à 25%) réagit avec le déoxyribose de l'ADN par abstraction des atomes d'hydrogène pouvant résulter en des fragmentations (Dizdaroglu, 1993). Les réactions des radicaux dérivés du déoxyribose peuvent conduire à la libération de bases purines et pyrimidiques de l'ADN produisant des sites abasiques et à des cassures de brin. Certains sucres altérés restent attachés à l'ADN et peuvent bloquer sa synthèse.

En plus de leur capacité à altérer les bases et les sucres de l'ADN, les radicaux libres sont impliqués dans la formation de pontages ADN-protéines dans les nucléoprotéines. L'implication de OH[•] est évidente dans la formation des pontages induits par les radiations ionisantes ou H₂O₂ et les ions métalliques. Des pontages thymine-tyrosine ont ainsi été

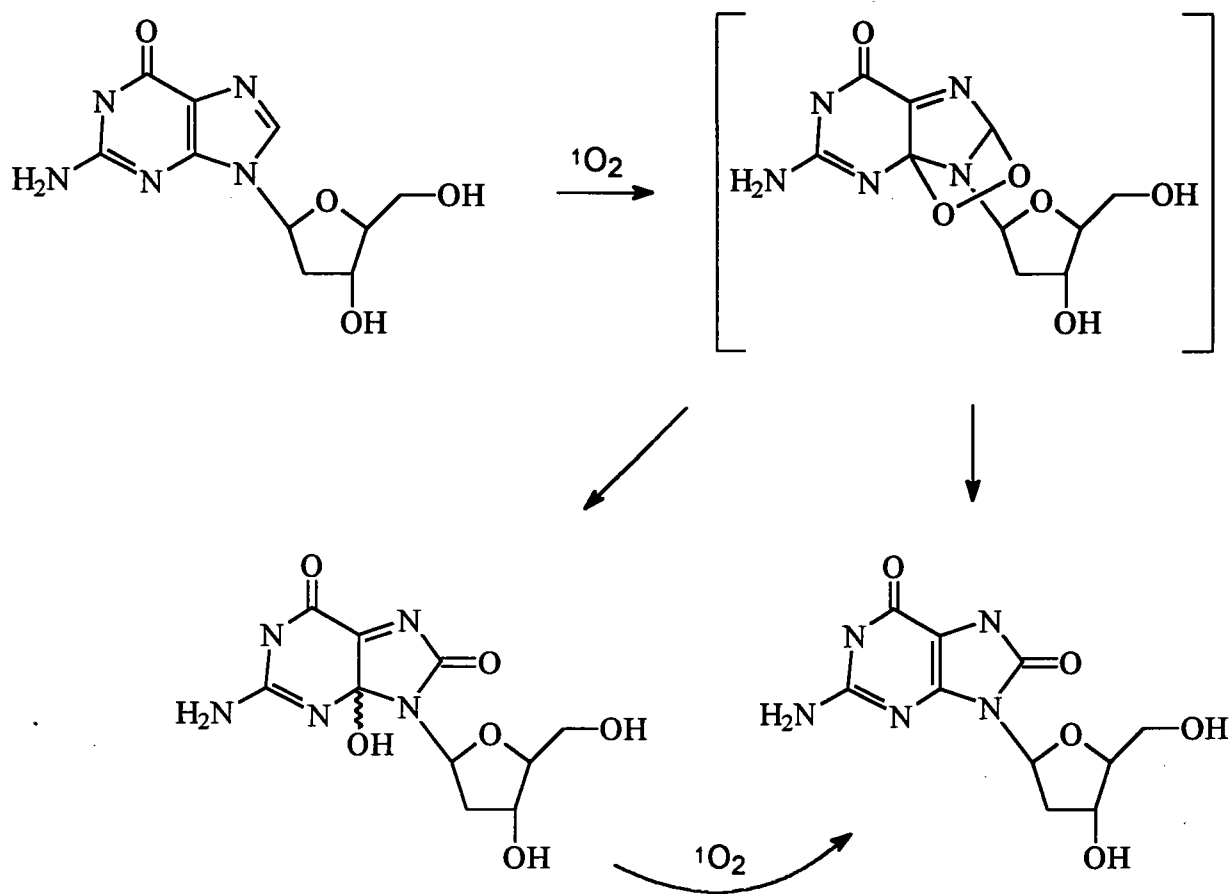


Figure 9 : Principaux produits d'oxydation de l'oxygène singlet avec le 2'-déoxyguanosine incluant la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine et les diastéréoisomères 4R* et 4S* du 7,8-dihydro-4-hydroxy-8-oxo-2'-déoxyguanosine.

identifiés dans des nucléoprotéines exposées à des radiations ionisantes en présence d'oxygène (Dizdaroglu, 1993).

Comme OH \cdot , l'oxygène singulet est capable de modifier directement l'ADN produisant des cassures de brin, des pontages ADN-protéines et modifiant les bases de l'ADN mais de manière plus spécifique et limitée (Halliwell, 1993 ; Epe, 1993a). L'oxygène singulet réagit sélectivement avec les résidus guanine formant de manière prédominante la 8-hydroxyguanine (figure 9) (Devasagayam *et al.*, 1991 ; Cadet *et al.*, 1994 ; Cooke *et al.*, 1996).

2.5.3 Cytotoxicité des aldéhydes

La cytotoxicité résultant de la lipoperoxydation est aussi, pour une large part, liée à la présence des différents aldéhydes issus de la décomposition des hydroperoxydes lipidiques. Les 4-hydroxycénals, les plus importants quantitativement, sont certainement parmi les produits terminaux les plus réactifs et toxiques, formés *in situ* pendant la peroxydation lipidique : puissants alkylants, ils réagissent spontanément en formant des composés d'addition avec les résidus cystéinyl des protéines et du glutathion ainsi que des bases de Schiff avec les groupements aminés des protéines. Les 4-hydroxycénals inhibent les enzymes de réparation de l'ADN (Esterbauer et Zollner, 1989 ; Esterbauer *et al.*, 1991 ; Cheeseman, 1993). 95% des 4-hydroxycénals sont représentés par le 4-hydroxynonéal biologiquement très actif : cet aldéhyde est fortement cytotoxique, génotoxique, et bloque la prolifération cellulaire ; à des concentrations supérieures à 100 μ M, il induit aussi une déplétion du glutathion, une perturbation de l'homéostasie calcique, une inhibition de la respiration, de la synthèse des acides nucléiques et des protéines, et l'initiation de la lipoperoxydation (Benedetti *et al.*, 1982 ; Benedetti *et al.*, 1986 ; Esterbauer et Cheeseman, 1990 ; Esterbauer, 1993 ; Zollner *et al.*, 1991). De même le malonaldéhyde, aldéhyde résultant de la lipoperoxydation, le plus abondant individuellement, peut altérer *in vitro* les protéines, l'ADN, l'ARN et beaucoup d'autres biomolécules (Esterbauer et Cheeseman, 1990). Les aldéhydes de coupure issus des hydroperoxydes lipidiques, en raison de leur longue durée de vie et de leur capacité à diffuser dans le cytosol et dans l'espace extracellulaire, doivent être considérés plutôt comme des « messagers toxiques secondaires », que comme de simples produits terminaux du processus de lipoperoxydation (Esterbauer et Zollner, 1989).

Les conséquences cliniques des effets directs ou indirects de la lipoperoxydation ne sont souvent pas claires et dépendent largement de variables telles que les tissus cibles et les espèces (Stegeman *et al.*, 1992). Les radicaux sont impliqués dans de nombreux états pathologiques (table 3), la question est de savoir s'ils sont la cause des atteintes tissulaires ou s'ils en sont la conséquence (Cerutti, 1985 ; Halliwell *et al.*, 1992 ; Cheeseman, 1993 ; Gutteridge, 1993 ; Halliwell, 1994 ; Toyokuni *et al.*, 1995 ; Klaunig *et al.*, 1998).

Pathologies chroniques	Pathologies aiguës
Arthérosclérose	Lésions de reperfusion post-ischémique
Cancer	Hyperoxygénation (O ₂ hyperbare)
Emphysème	Brûlures étendues
Cirrhose éthylique	Choc septique
Diabète	Inflammation
Cataracte	Allergie
Dystrophie musculaire	Arthrite
Trisomie 21	Fibroplasie rétrolentale
Maladie de Crohn	Trauma
Arthrose	
Maladie d'Alzheimer	
Maladie de Parkinson	
Syndrome de Bloom	
Xeroderma pigmentosum	
Viellissement cellulaire	

Table 3 : Exemples d'états pathologiques ou de situations physiologiques associés à un déséquilibre de production/destruction des radicaux libres.

Enzymes de réparation	Locus du gène	Sites AP			Lésions de bases
		Réguliers	sucre oxydé en 1'	sucre oxydé en 4'	
Endonucléase III	<i>nth</i>	+	-	+	thymine glycol, 5,6-dihydropyrimidines dérivés de l'urée N-substitués, urée, 5-hydroxypyrimidines
Fpg protéine	<i>fpg</i>	+	-	+	formamidopyrimidines, 8OHdG, 8OHdA, 5-hydroxypyrimidines
Endonucléase IV	<i>nfo</i>	+	+	+	-
Exonucléase III	<i>xth</i>	+	+	(+)	-
T4 endonucléase V	<i>den V</i>	+	-	+	dimères de pyrimidines

Table 4: Enzymes impliquées dans la réparation des bases modifiées par les radicaux libres.

2.6 Mécanismes de réparation des lésions induites par la peroxydation lipidique

La réparation des lésions induites par les espèces radicalaires au niveau des lipides, protéines et acides nucléiques se fait en général via des mécanismes enzymatiques.

- Deux systèmes ont été décrits capables de cliver hors de la membrane les hydroperoxydes issus de la lipoperoxydation : le premier repose sur l'action concertée de la phospholipase A₂ qui hydrolyse les hydroperoxydes des membranes phospholipidiques qui sont alors réduits par la glutathion peroxydase sélénium dépendante. Le second consiste en leur réduction directe par la phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase (Ursini *et al.*, 1991) (cf. 2.3).

- Les résidus méthionine oxydés dans les protéines peuvent être réparés par l'action de la méthionine sulfoxyde réductase qui réactive ainsi les protéines endommagées. En revanche, les protéines dans lesquelles d'autres groupements aminoacides ont été attaqués semblent irréversiblement lésées et doivent être éliminées de la cellule. Les protéines modifiées par les oxydants sont dégradées plus rapidement par les enzymes protéolytiques (Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Rice-Evans *et al.*, 1991).

- Les lésions à l'ADN induites par les oxydants sont capables de bloquer la synthèse de l'ADN et de produire des mésappariements. La non réparation de ces dommages avant la réplication peut conduire à la fixation des mutations et/ou à la mort cellulaire.

Le processus d'excision - resynthèse est le principal mécanisme de réparation des modifications induites par les ROS au niveau des bases de l'ADN et du déoxyribose (table 4). Il repose sur l'action conjuguée des ADN glycosylases et des endonucléases AP (Téoule, 1987 ; Breimer, 1991 ; Demple et Levin, 1991 ; Lindahl, 1993 ; Ramotar et Demple, 1993). Le mécanisme d'excision de nucléotides catalysé par des complexes multienzymatiques (UvrABC chez *E. coli*) est impliqué dans la suppression d'adduits volumineux, des dimères de pyrimidines mais également de certaines lésions oxydatives à l'ADN comme les sites AP, la thymine glycol, la 8OHdG et le FapyGua (Téoule, 1987 ; Teebor *et al.*, 1988 ; Ramotar et Demple, 1993 ; Breimer, 1991 ; Henle et Linn, 1997). Les cassures double brin et les pontages ADN-protéines formés par les ROS sont pris en charge par la réparation post-réplivative (Demple et Levin, 1991 ; Ramotar et Demple, 1993). Il existe aussi des réactions non enzymatiques de réparation de l'ADN : un exemple est la neutralisation par le glutathion des radicaux de déoxyribose de l'ADN (Demple et Levin, 1991).

Mélanges réactionnels	Concentrations (μM)	Incubations	Auteurs
ADP FeCl ₃ Acide ascorbique	500 8 300	5 à 30 min. / 30 °C	Nardini <i>et al.</i> , 1993
ADP FeCl ₃ Acide ascorbique	200 12 500	45 min. / 37 °C	Behrens et Madere, 1991
ADP FeCl ₃ Acide ascorbique	400 2,5 à 20 450	0 à 60 min. / 37 °C	Palamanda et Kehrer, 1993
ADP FeSO ₄ Acide ascorbique	1000 20 500	2 h. / 25 °C	Livingstone <i>et al.</i> , 1990
ATP FeCl ₃ NADH ou NADPH	100 15 100	60 min. / 25 °C ou 37 °C	Wofford et Thomas, 1988
ADP FeCl ₃ NADPH	1700 100 400	0 à 20 min. / 25 °C	Fairhurst <i>et al.</i> , 1982
ADP FeCl ₃ NADH	200 30 200	5 à 60 min. / 20 °C	Han et Liston, 1989
FeSO ₄ NADPH	0 à 100 500	15 min. / 37 °C	Tomita et Okuyama, 1994
Fe-NTA Fe (II) Ascorbate	5, 20 et 100 30 500	0 à 50 h. 60 min. / 37 °C	Morel <i>et al.</i> , 1990 Ruslanov <i>et al.</i> , 1994
ADP FeCl ₃ Xanthine Xanthine oxydase	15000 10000 1000 0,032 unités / ml	60 min. / 37 °C	Liu <i>et al.</i> , 1997
FeCl ₃ NADH ou NADPH EDTA	75 300 150	0 à 80 min. / 25 °C	Lemaire <i>et al.</i> , 1994

Table 5 : Exemples de mélanges réactionnels employés dans la littérature pour stimuler la lipoperoxydation *in vitro*.

2.7 Induction de la lipoperoxydation chez les mammifères

L'induction de la lipoperoxydation *in vitro* se fait classiquement par des systèmes contenant des sels de fer ou d'autres complexes du fer - FeCl₃, FeCl₂, FeSO₄, fer-ATP, fer-ADP, fer-EDTA, fer-citrate - (table 5) (Gutteridge, 1984 ; Halliwell et Gutteridge, 1984). Le terme de « lipoperoxydation enzymatique » est souvent utilisé pour décrire la lipoperoxydation microsomale, qui est stimulée en présence de NADPH et fer (III), les complexes Fe (III) étant réduits par NADPH-cytochrome P450 réductase. Un processus similaire a été observé dans la membrane mitochondriale (complexe NADH-coenzyme Q) et nucléaire. Un autre moyen de stimuler la peroxydation *in vitro* consiste à ajouter des hydroperoxydes organiques comme le tert-butylhydroperoxyde (de 1,5 à 2 mM) ou l'hydroperoxyde de cumène (de 50 µM à 3 mM). Leur métabolisation par le cytochrome P450 génère des radicaux capables d'initier la lipoperoxydation (Rush *et al.*, 1985 ; Joyeux *et al.*, 1990 ; Iannone *et al.*, 1993 ; Tseng *et al.*, 1996).

Un certain nombre de composés augmente la production des ROS (O₂⁻, OH[·], H₂O₂) dans la cellule par cycle redox. Il s'agit d'un processus au cours duquel les molécules sont d'abord réduites enzymatiquement (par de nombreuses NAD(P)H réductases : NADPH cytochrome oxydase, xanthine oxydase, ferredoxine réductase, NADH-ubiquinone oxydo-réductase) ou non enzymatiquement, en leurs radicaux correspondants. Le radical réagit avec l'oxygène moléculaire pour produire O₂⁻ et régénérer la molécule parente, qui va pouvoir subir un autre cycle redox. C'est le cas de classes de molécules comme les herbicides bipyridyl, les quinones, les composés nitro aromatiques, les hydroxylamines aromatiques, et certains métaux chélatés (table 6). (Horton et Fairhurst, 1987 ; Kappus, 1987 ; Di Giulio *et al.*, 1989 ; Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Stegeman *et al.*, 1992). Il en est de même pour des composés comme les hydrocarbures polycycliques aromatiques dont la métabolisation peut inclure notamment une conversion significative en quinones cycliques redox (Livingstone *et al.*, 1990 ; Lemaire *et al.*, 1993a). L'anion superoxyde peut augmenter la lipoperoxydation par la production accrue de radicaux initiateurs (H₂O₂, OH[·]) ; l'élimination de H₂O₂ par la SeGPx peut conduire à une rapide oxydation du glutathion affaiblissant les capacités antioxydantes de la cellule. La lipoperoxydation induite par le diéthylmaléate et la phorone, administrés respectivement à des concentrations de 12 et 250 mg/kg à des rongeurs, résulte ainsi de la déplétion du glutathion par conjugaison (Casini *et al.*, 1985 ; Younes et Siegers, 1983 ; Maellaro *et al.*, 1990).

Le rôle de la lipoperoxydation dans la toxicité des composés subissant un cycle redox n'est pas encore parfaitement élucidé, ce processus délétère ne semble se développer que dans certaines conditions (Kappus, 1987). Dans le cas de la ménadione, du paraquat et de l'adriamycine, la déplétion du glutathion est probablement le facteur majeur de leur cytotoxicité, couplée à une perte de l'homéostasie calcique, et la lipoperoxydation n'augmente en général que si des métaux de transition sont administrés simultanément (Horton et Fairhurst, 1987 ; Halliwell et

Classe de composés	Exemples
Composés halogénés	
alcanes et alcènes	Chloroforme, tétrachlorure de carbone
biphényles	Dioxines, parachlorobiphényles, parabromobiphényles
composés cycliques	Alachlore, chlordane, DDT, endrine, lindane
Composés pyridinyles	Paraquat, diquat, 1-10-phénanthroline
Quinones	
benzoquinones	Chloranile
quinones hétérocycliques	Mitomycines
naphthoquinones	Ménadione, dichlone
furanocoumarines	Adriamycine, daunorubicine
anthracyclines	8-Méthoxypsoralène
Composés nitro-aromatiques	Nitrofurantoïne, nitropyrène, misonidazole
Hydroxylamines aromatiques	Produits d'oxydation des amines aromatiques (e.g., N-OH-2-aminofluorène)
Métalloïdes	
arsenic	As (III et IV)
Métaux	
cadmium	Cd (II)
cuivre	Cu (I et II)
chrome	Cr (I et VI)
fer	Fe (II)
plomb	Pb (V et VI)
mercure	élément (Hg^0), inorganique (I et II), organique (e.g., CH_3-Hg^+)
nickel	Ni (II)
complexes du vanadate	V (II et V)

Table 6 : Exemples de toxines générant des espèces réactives de l'oxygène.

Gutteridge, 1989 ; Baird *et al.*, 1993 , Cheeseman, 1993 ; Schweich *et al.*, 1994 ; Tomita et Okuyama, 1994; Bagchi *et al.*, 1995).

La lipoperoxydation peut être induite d'autre part, par des intermédiaires radicalaires issus du métabolisme de certains xénobiotiques. C'est le cas du tétrachlorure de carbone (CCl₄), du bromodichlorométhane (BrCCl₃) et d'autres haloalcanes (chloroforme, halothane), qui sont réduits par la NADPH-cyt.P450 réductase pour former un radical trichlorométhyl CCl₃· (CF₃CHCl· pour l'halothane) (Benedetti *et al.*, 1986 ; Horton et Fairhurst, 1987 ; Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Camps *et al.*, 1992). Le radical CCl₃·, ou probablement le radical peroxy plus réactif CCl₃OO·, dérivé de la réaction de CCl₃· avec l'oxygène moléculaire, peuvent initier la lipoperoxydation *in vitro* et *in vivo*. L'incubation pendant 1 heure en présence de 8,6 mM de CCl₄ a provoqué une augmentation des taux de MDA et de HNE dans les microsomes de foie et les hépatocytes de rats (Poli *et al.*, 1989). Le traitement de rats par 26 mM/kg de CCl₄ et de BrCCl₃ a été associée à des taux de produits carbonyles plus élevés au niveau des phospholipides des microsomes hépatiques (Benedetti *et al.*, 1982). Le paradigme de lésions tissulaires toxiques impliquant la lipoperoxydation est certainement l'hépatotoxicité du tétrachlorure de carbone : la lipoperoxydation peut être mesurée dans les minutes qui suivent l'intoxication alors que la nécrose n'apparaît qu'après plusieurs heures (Cheeseman, 1993). A la différence du CCl₄, la lipoperoxydation n'est pas un mécanisme précoce dans les altérations tissulaires induites par le bromobenzène (C₆H₅Br) : administré à une concentration de 13 mM/kg à des souris, il produit en premier lieu une déplétion rapide du glutathion réduit dans le foie qui est suivie par l'induction de la lipoperoxydation (Casini *et al.*, 1985 ; Maellaro *et al.* 1990).

Le paracétamol (acétaminophène) est hépatotoxique à fortes doses en raison de sa métabolisation par le cytochrome P450 en un dérivé hautement réactif, le *N*-acétyl-*p*-benzoquinonéimine, lui-même capable de subir un cycle rédox (Cheeseman, 1993). Les surnageants post-mitochondriaux de rats traités par une dose unique de 800 mg/kg ont montré une rapide stimulation de la lipoperoxydation *in vitro* (Fairhurst *et al.*, 1982).

L'éthanol est métabolisé principalement par l'alcool deshydrogénase en acétaldéhyde ; la métabolisation de quantités plus faibles par le cytochrome P450 est accompagnée de la génération de OH·, et des augmentations des produits issus de la lipoperoxydation ont été détectées dans le foie d'animaux traités chroniquement par l'éthanol (Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Brooks, 1997). Plusieurs équipes n'ont par contre pas observé de signes de lipoperoxydation *in vivo* suite à l'intoxication aiguë par l'éthanol (Comporti, 1985 ; Horton et Fairhurst, 1987 ; Halliwell et Gutteridge, 1989).

Les ions du fer et du cuivre ainsi que leurs chélatats sont capables d'initier la lipoperoxydation en catalysant la production du radical hydroxyl, via la réaction d'Haber-Weiss. Plusieurs ions

de métaux de transition incluant Co^{2+} , Cr^{2+} et Ti^{3+} , peuvent aussi réagir avec H_2O_2 pour former le radical hydroxyl. Divers travaux ont suggéré qu'une production accrue des radicaux libres contribuait à la toxicité de fortes doses de plusieurs autres métaux incluant l'aluminium, le vanadium, le plomb, le nickel, le mercure le molybdène et le cadmium (Horton et Fairhurst, 1987 ; Halliwell et Gutteridge, 1989). Une stimulation de la lipoperoxydation a ainsi été mise en évidence dans le foie, le rein, et les poumons de rats intoxiqués par 0,75 mM/kg de NiCl_2 , et dans le cerveau de rats traités pendant 7 jours par une dose journalière de 100 mg/kg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Ohtawa *et al.*, 1982 ; Sunderman *et al.*, 1985). L'induction de la lipoperoxydation *in vitro* s'est montrée plus forte dans les homogénats hépatiques et rénaux de rats exposés au vanadate (0,15 mg/ml dans l'eau de boisson pendant 14 jours) comparé aux contrôles (Ruslanov *et al.*, 1994).

L'irradiation de la peau par les UVA et les UVB peut induire une augmentation des taux de peroxydes lipidiques parallèlement à une diminution ou une détérioration des activités enzymatiques antioxydantes (Fuchs et Packer, 1991 ; Zompetta *et al.*, 1991 ; Iizawa *et al.*, 1994).

L'implication de la lipoperoxydation dans la toxicité d'autres substances chimiques et cancérogènes a été reportée dans la littérature : l'amiante et les fibres minérales (Fontecave *et al.*, 1987 ; Fontecave *et al.*, 1990 ; Howden et Faux, 1996), les polychlorobiphényles et les HAP (Mäntylä et Ahotupa, 1993), l'hexachlorobenzène (Alleman *et al.*, 1985), les composés *N*-nitroso (Bansal *et al.*, 1997), l'aflatoxine B1 (Shen *et al.*, 1994), l'endotoxine (Giralt *et al.*, 1993), le DDT, la TCDD, les proliférateurs de peroxysomes, la cocaïne et la fumée de cigarette (Horton et Fairhurst, 1987 ; Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Cheeseman, 1993).

2.8 Formation chez les mammifères, mutagénéité et réparation de la 8OHdG

Parmi les multiples lésions oxydatives de l'ADN, la 8-hydroxylation de la guanine est la plus abondante. Sa formation a été observée pour la première fois en 1983 au cours d'une étude sur la modification de l'ADN *in vitro* par des carbohydrates chauffés, utilisés comme modèle d'aliments cuits (Kasai *et al.*, 1991). La 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine n'avait jusqu'à lors, jamais été isolée ou synthétisée chimiquement, bien que différents produits d'oxydation des constituants de l'ADN, en particulier ceux induits par les radiations ionisantes, aient été identifiés à cette époque.

- Formation de la 8OHdG *in vitro*

Kasai *et al.* (1984a, 1991) ont été les premiers à mettre en évidence la production de la 8OHdG à partir de la dG par des systèmes générant OH[•] dans des réactions de type Fenton comme décrit par Udenfriend, ou par un système catéchol-Fe³⁺-H₂O₂. La 8OHdG s'est révélée être un des produits majeurs des lésions de bases quand l'ADN est exposé *in vitro* aux radicaux OH[•] générés par des systèmes physiologiquement représentatifs : le tiers et la moitié des bases modifiées sont représentées par la 8OHdG lorsque la production de OH[•] est respectivement catalysée par les ions ferriques et les ions cuivriques (Aruoma *et al.*, 1989ab, 1991). L'exposition de l'ADN *in vitro* aux rayons X et γ , aux UV, ainsi qu'aux molécules agissant comme des photosensibilisateurs (acridine orange, bleu de méthylène) stimule la formation de la 8OHdG (Kasai *et al.*, 1984 ; Dizdaroglu, 1985 ; Floyd *et al.*, 1988 ; Epe, 1989, 1993abc ; Maccubbin *et al.*, 1995 ; Cooke *et al.*, 1996 ; Stewart *et al.*, 1996 ; Wei *et al.*, 1996 ; Wamer *et al.*, 1997). De plus, diverses substances mutagènes et cancérigènes formant des radicaux de l'oxygène, se sont montrées capables d'induire la formation de la 8OHdG dans l'ADN isolé ou sur cellules mammifères *in vitro* (Kasai *et al.*, 1993). C'est le cas par exemple des promoteurs de tumeur comme le TPA (Floyd *et al.*, 1986b), des peroxydes organiques tels que le benzoyl peroxyde (King *et al.*, 1996) et le *tert*-butyl hydroperoxyde (Altman *et al.*, 1994), du B(a)P (Mauthe *et al.*, 1995), des composés quinoniques (Nakagawa et Tayama, 1996 ; Nagai *et al.*, 1995 ; Bodell *et al.*, 1998), du bétel (Liu *et al.*, 1996c) et des différents types d'amiante (Kasai et Nishimura, 1984b ; Chen *et al.*, 1996 ; Howden *et al.*, 1996 ; Fung *et al.*, 1997). Les métaux cancérigènes tels le chrome - en présence ou absence de H₂O₂ - (Faux *et al.*, 1992b ; Tsou *et al.*, 1996 ; Aiyar *et al.*, 1990) et le nickel - en présence de H₂O₂ ou de GSH - augmentent le nombre de résidus 8OHdG dans l'ADN (Shi *et al.* 1995 ; Dally et Hartwig, 1997).

- Formation de la 8OHdG *in vivo*

Le développement d'une technique CLHP simple, couplée à une détection électrochimique hautement sensible, pour la mesure de la 8OHdG (Floyd *et al.*, 1986a) a permis d'étudier la formation de cette base *in vivo* et a conduit à une série d'études pionnières sur les lésions oxydatives à l'ADN et leurs relations avec la mutagenèse et la cancérogenèse. Les niveaux de base de la 8OHdG, reflétant la balance entre sa formation et sa réparation dans l'ADN en conditions physiologiques normales, ont pu être ainsi quantifiés.

Plusieurs auteurs ont indiqué que les résidus 8OHdG s'accumulaient avec l'âge dans l'ADN hépatique, rénal et intestinal de rats, résultant probablement d'une perte d'efficacité des systèmes de réparation ; ces données renforçant l'hypothèse du rôle majeur des lésions oxydatives à l'ADN dans le vieillissement cellulaire et dans d'autres pathologies qui y sont liées comme le cancer (Fraga *et al.*, 1990 ; Sai *et al.*, 1992 ; Kaneno *et al.*, 1996).

Les taux de 8OHdG présents dans l'ADN mitochondrial restent sujets à controverses. Bien qu'une augmentation des niveaux de base avec l'âge ait été observée à plusieurs reprises (Garcia de la Asuncion *et al.*, 1996 ; Muscari *et al.*, 1996 ; Croteau et Bohr, 1997), le nombre de résidus 8OHdG mesuré par différentes techniques (CLHP-EC, CG-SM-SIM, endonucléases de réparation) varie. Richter *et al.* (1988) ont indiqué que la 8OHdG était présente à un niveau de 1/130000 bases dans l'ADN nucléaire et 1/8000 dans l'ADN mitochondrial de rat. Une étude plus récente a confirmé cette différence bien qu'elle ne soit pas aussi marquée (Mitsui *et al.*, 1996). L'importance des processus de phosphorylation oxydative, l'efficacité réduite des systèmes de réparation et l'absence d'histones dans l'ADN mitochondrial peuvent expliquer ces taux plus élevés (Ames, 1989 ; Richter, 1992). Pourtant Hegler *et al.* (1993) ont reporté que les niveaux de base de modifications oxydatives dans l'ADN mitochondrial étaient faibles en conditions physiologiques normales. Les travaux Taffe *et al.* (1996) et de Croteau *et al.* (1997) ont démontré de plus que les mitochondries étaient capables de réparer les lésions oxydatives en dépit de l'incapacité à prendre en charge d'autres lésions à l'ADN comme les dimères de pyrimidines.

Fiala *et al.* (1989) ont reporté pour la première fois la formation de la 8OHdG dans l'ARN chez des rats exposés à l'hépatocancérogène 2-nitropropane. L'augmentation de la 8OHdG au niveau hépatique est beaucoup plus prononcée dans l'ARN (11 fois) que dans l'ADN (4 fois). Cette différence peut être liée à la proximité de l'ARN cytosolique du réticulum endoplasmique, site majeur de métabolisation du 2-nitropropane.

De nombreuses études ont reporté une stimulation de la production de la 8OHdG *in vivo* après traitement par des substances générant des ROS tels que les proliférateurs de peroxisomes (Kasai *et al.*, 1989, Sausen *et al.*, 1995), les agents cycliques rédox (Dalhaus et Appel, 1994) et les radiations ionisantes (Zastawny *et al.*, 1996, 1997). Des effets synergiques entre le fer et l'Aroclor 1254 ont été mis en évidence dans l'ADN de foie de rat (Faux *et al.*, 1992a). L'augmentation des niveaux de 8OHdG chez des rats traités par le bromate de potassium n'a été indiquée que dans l'ADN de rein, organe cible dans la cancérogénèse de KBrO₃ (Kasai *et al.*, 1987 ; Sai *et al.*, 1991 ; Umemura *et al.*, 1995). De même, Kasprzak *et al.* (1997) ont suggéré que la plus longue persistance des résidus 8OHdG induits par le nickel (II) dans l'ADN du rein de rat pouvait être liée à l'initiation exclusive de tumeurs au niveau rénal par ce métal. Le traitement de rats par de puissants cancérogènes rénaux (Fe-NTA) et hépatiques (TCDD, aflatoxine B1, haloacétates) a été associé de même à des taux de 8OHdG significativement plus élevés dans l'ADN de rein et de foie respectivement (Toyokuni *et al.*, 1994 ; Shen *et al.*, 1995 ; Yamaguchi *et al.*, 1996ab ; Umemura *et al.*, 1996 ; Austin *et al.*, 1996, Parrish *et al.*, 1996 ; Tritscher *et al.*, 1996).

Certaines équipes ont observé des niveaux de base de 8OHdG plus forts dans l'ADN chez des sujets atteints de pathologies telles que la gastrite de type B avec infection par *Helicobacter pylori* (Baik *et al.*, 1996), différents types de cancer (Malins et Haimanot, 1991b ; Jaruga *et al.*, 1994 ; Okamoto *et al.*, 1994 ; Tagesson *et al.*, 1995 ; Toyokuni *et al.*, 1995), l'anémie de Fanconi (Degan *et al.*, 1995), et les encéphalomyopathies mitochondriales (Mitsui *et al.*, 1996)

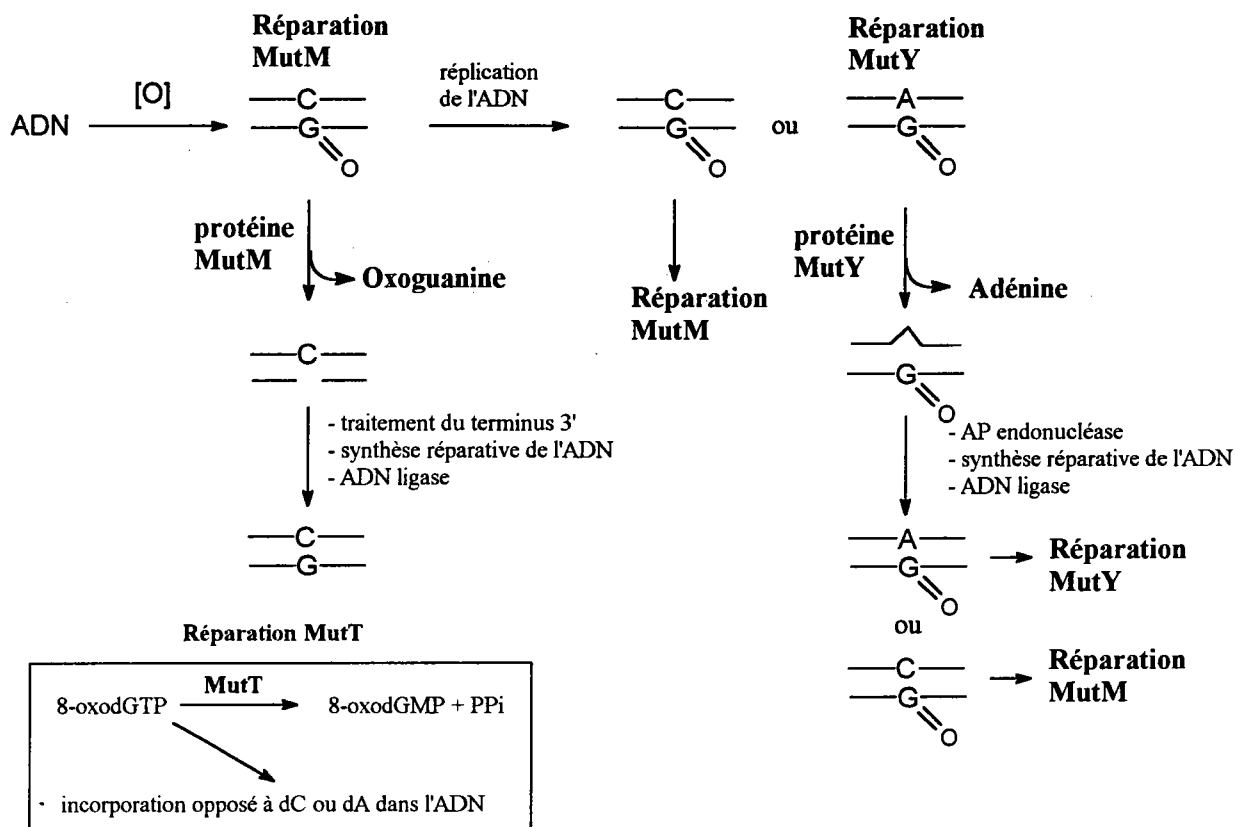


Figure 10 : Mécanisme de réparation de la 8OHdG chez *E.coli*.

suggérant que les modifications oxydatives des bases de l'ADN jouent un rôle important dans ces processus pathologiques. Les travaux de Kiyosawa *et al.* (1990) et Asami *et al.* (1996, 1997) ont indiqué, en outre, une association positive entre le tabagisme et une augmentation des taux de 8OHdG dans les leucocytes et les tissus pulmonaires humains. La même observation a été faite par Fraga *et al.* (1996) pour l'ADN du fluide séminal humain et par Priemé *et al.* (1998) pour l'excrétion de la 8OHdG dans les urines. Récemment, des études ont montré que les taux de 8OHdG mesurés dans les leucocytes ou les urines de populations exposées sur leurs lieux de travail à des cancérigènes établis (benzène, styrène) étaient significativement plus élevés et corrélés au degré d'exposition (Lagorio *et al.*, 1994 ; Liu *et al.*, 1996b ; Marczyński *et al.*, 1997) démontrant la valeur potentielle de la 8OHdG en tant qu'indicateur précoce des risques de cancers professionnels.

- Mutagénicité et réparation de la 8OHdG

Les résidus 8OHdG induisent des mésappariements pendant la synthèse de l'ADN *in vitro* au niveau de la lésion et des bases adjacentes (Kuchino *et al.*, 1987 ; Shibutani *et al.*, 1991 ; Cheng *et al.*, 1992) mais aussi la production de transversions G : C → T : A *in vivo* (Wood *et al.*, 1990 ; Moriya *et al.*, 1991). A l'instar de l'ADN, le dGTP peut être attaqué par les ROS conduisant à l'incorporation de 8OHdGTP dans le pool de dNTP pouvant provoquer des transversions A : T → C : G. L'implication de la 8OHdG a été suggérée dans les transversions G → T détectées à haute fréquence dans le spectre de mutations des gènes *ras* et *p53* dans divers organes de mammifères (Bessho *et al.*, 1993a ; Kamiya *et al.*, 1995).

L'existence d'un processus spécifique de réparation dans l'ADN a été suggérée par la présence de la 8OHG dans les urines (Fraga *et al.*, 1990 ; Shigenaga *et al.*, 1991 ;), et par sa diminution dans l'ADN hépatique murin après irradiation γ (Kasai *et al.*, 1986). Les processus de réparation par excision de bases de la 8OHdG ont été étudiés en détail chez *E. coli* : trois systèmes enzymatiques protègent la cellule contre les effets délétères des résidus 8OHdG dans l'ADN (Grollman et Moriya, 1993 ; Wojcik *et al.*, 1996). Ils incluent les protéines MutT, Fpg (Mut M) et MutY. MutT hydrolyse le 8OHdGTP en 8OHdGMP prévenant ainsi l'incorporation de 8OHdGTP dans l'ADN (figure 10). Fpg et Mut Y sont des glycosylases possédant aussi une activité AP endonucléase, qui excisent respectivement la 8OHdG et le dA apparié à la 8OHdG (Boiteux *et al.*, 1992 ; Michaels *et al.*, 1992 ; Boiteux, 1993 ; Grollman et Moryira, 1993). Des homologues des produits des gènes *mutT*, *mutM* et *mutY* de *E. coli* ont été identifiés chez les mammifères et il apparaît vraisemblable qu'un mécanisme de réparation analogue opère dans les cellules de mammifères (Yamamoto *et al.*, 1992 ; Bessho *et al.*, 1993b ; Björås *et al.*, 1997 ; Henle et Linn, 1997 ; Fowler et Schaaper, 1997). L'action coopérative de Fpg et du complexe enzymatique UvrABC dans la réparation de la 8OHdG a été mise en évidence chez *E. coli* (Ramotar et Demple, 1993, Agnez *et al.*, 1996).

2.9 Induction de la lipoperoxydation et de la formation de la 8OHdG chez les organismes aquatiques

2.9.1 Introduction

L'étude du stress oxydant et de ses implications toxicologiques chez les organismes aquatiques a réellement débuté il y a une dizaine d'années, après la mise en évidence d'activités antioxydantes chez les poissons dans les années 70-80. Ces résultats ont tout naturellement conduit les écotoxicologistes à étudier les mécanismes de production des espèces réactives chez ces organismes et ses conséquences en terme de lipoperoxydation. Les équipes de Livingstone en Grande Bretagne, de Di Giulio aux Etats Unis et de Narbonne en France ont été les pilotes de ces recherches. Le rôle de la pollution en tant que facteur de stress oxydant n'a commencé à être étudié que tout récemment.

2.9.2 Niveaux endogènes de lipoperoxydation

La formation d'oxyradicaux chez les espèces aquatiques a été mise en évidence *in vitro* à l'aide de fractions microsomales isolées de foie de poissons, d'hépatopancreas de crustacés et de glande digestive de bivalves (Winston et Di Giulio, 1991). Les organismes aquatiques sont dotés qualitativement des mêmes systèmes antioxydants que les mammifères, bien que les activités antioxydantes soient en général inférieures chez les espèces aquatiques. En dépit de la nature adaptative de ces défenses antioxydantes, une conséquence reconnue de la production accrue d'oxyradicaux est la lipoperoxydation : les étapes du processus chez les organismes aquatiques semblent être comparables à celles reportées chez les mammifères. Un système enzymatique de lipoperoxydation microsomale a ainsi été identifié chez diverses espèces de poissons (Han et Liston, 1987, 1989). Wofford et Thomas (1988b) ont comparé la susceptibilité d'homogénats hépatiques de poisson (*Mugil cephalus*) et de rat à la lipoperoxydation. Des stimulations similaires ont été observées chez ces deux espèces en présence de NADH ou NADPH ; le NADH apparaît néanmoins plus efficace que le NADPH chez certains groupes de poissons. Dans les deux cas, la lipoperoxydation est dépendante du fer ajouté et est stimulée par des xénobiotiques tels que le CCl₄ et le diéthylmaléate. Plusieurs études comparatives ont indiqué des degrés de peroxydation différents selon les organes et les espèces considérées (Lopes-Torres *et al.*, 1993). Les taux de lipides peroxydés sont plus élevés dans le foie et les branchies que dans le muscle de la morue (*Gadus morhua*), ils sont en revanche indétectables dans la glande gazeuse pourtant soumise à des conditions de haute tension en O₂ (Lemaire *et al.*, 1993b). Les substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) mesurés dans les foies des Elasmobranches (requins et raies) sont 100 à 1000 fois supérieurs à ceux des foies de mammifères (Wilhelm Filho et Boveris, 1993). La sensibilité à la

Composés étudiés	Organismes	Dose mg/l	Conditions d'exposition	Organes	Lipoperoxydation	Auteurs
Cadmium	Bivalves / marin <i>Mytilus edulis</i>	40	6 jours	glande digestive branchies	= =	Viarengo <i>et al.</i> , 1988
	Poisson / marin <i>Micropogonias undulatus</i>	5 puis 1	6 jours 33 jours	foie ovaires	stimulation par FeCl ₃ /ATP/NADH microsomes homogénats × 10,6 × 1,2 × 1,4 × 2,3	Thomas et Wofford, 1993
	Crabe / eau douce <i>Barytelphusa guerini</i>	0,62	1, 7, 15 et 30 jours	glande digestive branchies	J ₁ J ₇ J ₁₅ J ₃₀ × 1,1 × 1,5 × 1,6 × 1,4 × 1,2 × 1,3 × 1,2 × 1,5	Venugopal <i>et al.</i> , 1997
					↗ SOD, G6PDH, XO	
Cuivre (II)	Bivalves / marin <i>Mytilus edulis</i>	0,04	6 jours	glande digestive branchies	↗ ↗	↘ GSH Viarengo <i>et al.</i> , 1988
	Poisson / eau douce <i>Cyprinus carpio L.</i>	5, 10, 25, 50	24 heures	foie branchies muscles blancs	à 25 et 50 mg/l × 1,6 × 2 × 3	↗ GPx ↘ Cat, SOD ↗ GPx ↘ Cat, SOD ↘ Cat, SOD Radi et Matkovics, 1988
	Bivalves / marin <i>Mizuhopecten yessoensis</i>	0,025	21 jours	glande digestive (microsomes)	× 1,7 × 3,1 (hydroperoxydes)	Chemolin et Belcheva, 1992
	Poisson / marin <i>Sparus aurata</i>	0,2 mg/kg injection i.p.	2 et 7 jours	foie (fraction soluble)	× 1,9 à J ₂ × 1,4 à J ₇ ↗ SOD + 2 nouvelles isoformes SOD à 1 mg	Pedrajas <i>et al.</i> , 1995
	Bivalves / marin <i>Ruditapes decussatus</i>	0,03	4, 7, 9 et 12 jours	glande digestive branchies	× 1,5 à J ₉ et × 2,5 à J ₁₂ * = * chute des valeurs des contrôles à J ₉ et J ₁₂	Romeo et Gnassia-Barelli, 1997
Mercure (HgCl₂)	Poisson / eau douce <i>Heteropneustes fossilis</i>	0,2	10, 20 et 30 jours	cerveau foie muscle rein	× 2 à J ₁₀ et × 1,2 à J ₃₀ × 1,5 à J ₁₀ , × 1,2 à J ₂₀ et × 0,6 à J ₃₀ × 6,4 à J ₁₀ et × 2,9 à J ₂₀ × 0,3 de J ₁₀ à J ₃₀	Bano et Hasan, 1989
Zinc	Bivalves / marin <i>Mytilus edulis</i>	0,08	6 jours	glande digestive branchies	= =	Viarengo <i>et al.</i> , 1988
	Poisson / eau douce <i>Cyprinus carpio L.</i>	10* et 100**	24 heures	foie branchies muscles blancs	= = × 1,3 * × 2 **	↗ GPx, SOD** ↘ GPx, Cat, SOD** ↘ GPx, Cat, SOD** Radi et Matkovics, 1988

Tableau 7 : Etudes reportées dans la littérature portant sur l'exposition de vertébrés et invertébrés aquatiques à des métaux. i.p. : intrapéritonéale, SOD : superoxyde dismutase, G6PDH : glucose-6-phosphate deshydrogénase, XO : xanthine oxydase, GPx : glutathion peroxydase, Cat : catalase, GRd : glutathion réductase, GSH : glutathion réduit.

lipoperoxydation est plus faible dans les branchies et les muscles de *M. galloprovincialis* par rapport à la glande digestive et au manteau (Ribera *et al.*, 1989). Divers facteurs sont susceptibles de moduler le stress oxydant chez les vertébrés et invertébrés aquatiques : la lipoperoxydation augmente avec l'âge (Viarengo *et al.*, 1989 ; Viarengo *et al.*, 1991b ; Sawada *et al.*, 1993) et en période de ponte (Sawada *et al.*, 1993), elle est par contre diminuée pendant l'anaérobiose (Viarengo *et al.*, 1989). Les poissons seraient mieux protégés de la lipoperoxydation que les mammifères, bien qu'ils présentent un taux de lipides insaturés plus élevé. Singh *et al.* (1989) ont en effet montré que les lipides de microsomes hépatiques étaient 30 fois moins peroxydés chez la truite que chez le rat, une concentration 43 fois plus forte en vitamine E chez la truite pourrait l'expliquer. D'autres études chez des vertébrés terrestres ont conclu à l'importance de la balance entre la composition en acides gras insaturés et le contenu en vitamine E des membranes dans la protection contre la lipoperoxydation (Nardini *et al.*, 1993 ; Salvati *et al.*, 1993 ; Ibrahim *et al.*, 1997)

2.9.3 Induction de la lipoperoxydation par l'exposition à des xénobiotiques

Les conséquences en terme de lipoperoxydation de l'exposition des organismes aquatiques à des polluants ont été étudiées expérimentalement et *in situ*. L'approche expérimentale permet de mieux corrélérer les résultats avec l'exposition des organismes que les études de terrain ; mais les conditions expérimentales font souvent appel à des concentrations élevées de polluants et des durées d'exposition courtes (24 heures à quelques jours), simulant plus des conditions d'intoxication aiguë que des situations d'exposition à une pollution diffuse. Les études *in situ* sont plus intéressantes de ce point de vue, mais les problèmes tiennent à l'identification des contaminants qui est loin d'être exhaustive. Les principales études sur ce thème sont répertoriées dans les tableaux 7 - 10 avec un rappel des conditions d'intoxication, les espèces exposées ainsi que les réponses obtenues au niveau de la lipoperoxydation.

- Exposition des organismes aquatiques aux métaux

De nombreuses études ont montré que les métaux sont capables d'altérer la balance redox dans les cellules et de stimuler la lipoperoxydation (tableau 7). Pedrajas *et al.* (1995) ont reporté que l'injection intrapéritonéale de cuivre (II) (0,2 mg/kg) produit après 7 jours une augmentation des TBARS dans la fraction soluble des foies de *Sparus aurata*, en association avec la stimulation de l'activité SOD et l'apparition de nouvelles isoformes de la SOD. L'exposition à des concentrations en CuSO₄ de 25 et 50 mg/l pendant 24 h induit la lipoperoxydation chez la carpe au niveau hépatique, branchial et musculaire parallèlement à une diminution des activités enzymatiques (Radi et Matkovics, 1988). Des stimulations comparables pour des concentrations plus faibles, ont été reportées chez les invertébrés aquatiques : chez *M. edulis* exposés à 40 µg/l de Cu²⁺ pendant 6 jours (Viarengo *et al.*, 1988),

Composés étudiés	Organismes	Dose mg/l	Conditions d'exposition	Organes	Lipoperoxydation	Auteurs	
Paraquat	Poisson / eau douce <i>Cyprinus carpio L.</i> <i>Carassius carassius L.</i> <i>Tinca tinca L.</i>	10	4, 12, 48 et 96 heures	erythrocytes	× 1,6 à 3,1 de 4 h à 96 h × 2,5 de 4 h à 12 h, puis × 1,6 à 48 h =	↗ GPx ↗ GPx, Cat, SOD	Gabrielak et Klekot, 1985
	Bivalves / marin <i>Mytilus edulis</i>	0,5, 1, 2 mM (- 56% à 36 h)	6, 12, 24 et 36 heures	glande digestive	1mM : × 1,2 à 1,8 de 6 h à 24 h 2 mM : × 6 à 6 h, × 1,5 de 12 h à 24 h	↗ GSH, Cat, SOD	Wenning <i>et al.</i> , 1988
	Poisson / marin <i>Sparus aurata</i>	50 mg/kg injection i.p.	2 et 7 jours	foie fraction soluble	× 5,1 à J ₂ mort à J ₇	↘ SOD	Pedrajas <i>et al.</i> , 1995
Ménadione	Bivalves / marin <i>Mytilus edulis</i>	1	2 et 6 jours	glande digestive	× 1,4 à J ₂ et × 0,7 à J ₆	↗ DTD à J ₆	Livingstone <i>et al.</i> , 1990
	Bivalves / marin <i>Mytilus edulis</i>	1	2 et 6 jours 23 % mortalité à J ₅ par ponte	glande digestive branchies tissus restants	× 1,4 à J ₂ et × 0,7 à J ₆ = =		Ribera <i>et al.</i> , 1991
Aroclor 1254	Poisson / marin <i>Micropogonias undulatus</i>	0,42 mg / kg nourriture -	17 jours 7 jours	foie ovaires	× 3 =	↗ GPx ↗ GPx	Thomas et Wofford, 1993
	Poisson / marin <i>Sparus aurata</i>	500 mg/kg * 1000 ** injection i.p.	2 et 7 jours	foie	= à J ₂ × 0,24 * et × 0,52 ** à J ₇		Pedrajas <i>et al.</i> , 1995
CCl₄	Bivalves / marin <i>Mytilus edulis</i>	1	2, 6, 19 jours	glande digestive branchies tissus restants	= × 1,6 à J ₁₉ =		Ribera <i>et al.</i> , 1991
BaP	Bivalves / marin <i>Mytilus edulis</i>	0,05	2, 6 et 19 jours	glande digestive	=	↗ DTD à J ₆	Livingstone <i>et al.</i> , 1990
PCP	Escargots / eau douce <i>Planorbarius corneus L.</i>	0,45	2, 8 et 13 jours	glande digestive	× 6 à J ₂ et × 3 à J ₆		Klobucar <i>et al.</i> , 1997
		0,8			× 2,3 à J ₂ et × 9 à J ₆ J ₆ à J ₉ : importantes lésions histologiques puis immobilisation complète des individus à J ₁₃		

Dieldrine	Poisson / marin <i>Sparus aurata</i>	0,15 mg/kg 0,67 injection i.p.	2 et 7 jours	foie	× 3 à J ₂ et × 0,7 à J ₇ × 1,8 à J ₂ et × 3 à J ₇ + apparition de nouvelles isoformes de la SOD	Pedrajas <i>et al.</i> , 1995
Malathion	Poisson / marin <i>Sparus aurata</i>	1,5 7,5 injection i.p.	2 et 7 jours	foie	× 2 à J ₂ et × 0,4 à J ₇ = à J ₂ et × 1,6 à J ₇ + apparition de nouvelles isoformes de la SOD	Pedrajas <i>et al.</i> , 1995
Effluents pâte à papier	Poisson / eau douce Channel catfish	10, 20, 40 %	14 jours	foie sang	= =	Mather-Mihaich et Di Giulio, 1991
DEF nBM	Poisson / eau douce <i>Ictalurus punctatus</i>	1 à 40 % CL ₅₀ 7 à 45 %	21 jours	foie et branchies	= SOD, Cat, GPx, GSH = SOD, Cat, GPx, GSH	Mather-Mihaich et Di Giulio, 1986
Paracétamol	Poisson / marin <i>Micropogonias undulatus</i>	17 mg/100g injection	1 heure avant l'essai	foie microsomes	stimulation par FeCl ₃ /ATP/NADH × 1,9 = GSH	Wofford et Thomas, 1988

Tableau 8 : Etudes reportées dans la littérature portant sur l'exposition de vertébrés ou invertébrés aquatiques à des molécules organiques. i.p. : intrapéritonéale, SOD : superoxyde dismutase, GPx : glutathion peroxydase, Cat : catalase, GSH : glutathion réduit, DTD : DT-diaphorase, PCP : pentachlorophénol.

dans les microsomes hépatiques de *M. yessoensis* intoxiqués par 25 µg/l de Cu²⁺ pendant 21 jours (Chemolin et Belcheva, 1992) ainsi que dans les glandes digestives de *R. decussatus* après 9 et 12 jours d'exposition à 30 µg/l de Cu²⁺ (Romeo et Gnassia-Barelli, 1997).

Le cadmium, même s'il n'est pas un métal redox, peut stimuler la lipoperoxydation *in vitro*. Des résultats plus conflictuels ont été obtenus *in vivo* chez le rat et les organismes aquatiques. Thomas et Wofford (1993) n'ont pas observé d'augmentation de la lipoperoxydation *in vivo* dans les foies et les ovaires de *M. undulatus* exposés pendant 6 jours à 5 mg/l de Cd puis pendant 33 jours à 1 mg/l. Une stimulation de la peroxydation induite par FeCl₃/ATP/NADH a pourtant été mise en évidence dans les microsomes et les homogenats hépatiques de *M. undulatus* intoxiqués dans les mêmes conditions (Wofford et Thomas, 1988a ; Thomas et Wofford, 1993). Aucune modification des niveaux de MDA et des contenus en GSH n'a été reportée chez *M. edulis* exposé à 40 mg/l de Cd pendant 6 jours (Viarengo *et al.*, 1988). En revanche, l'exposition de crabes d'eau douce à une concentration sublétales de Cd (0,62 mg/l) pendant 30 jours a induit la lipoperoxydation dans les glandes digestives et les branchies en association avec une augmentation des activités des enzymes antioxydantes (Venugopal *et al.*, 1997).

Les effets du mercure sur la lipoperoxydation se sont révélés également complexes : des augmentations significatives des taux de TBARS ont été reportées dans le cerveau, le foie et le muscle chez le poisson chat après intoxication par 0,2 mg/l de HgCl₂ pendant 10, 20 et 30 jours (Bano et Hasan, 1989) ; des diminutions significatives ont été par contre observées au niveau rénal. De plus, Wofford et Thomas (1988a) ont indiqué que la peroxydation *in vitro* induite par FeCl₃/ATP/NADH chez le mulot était complètement inhibée par 25 µM de HgCl₂, cette concentration stimulant la lipoperoxydation *in vitro* dans les hépatocytes de rat.

Le zinc n'a pas induit la lipoperoxydation dans les glandes digestives et les branchies de *M. edulis* (Viarengo *et al.*, 1988). Radi et Matkovics (1988), au contraire, ont conclu que, bien qu'il soit moins toxique que le cuivre, le zinc à des concentrations de 10 et 100 mg/l peut causer une augmentation des taux de TBARS au niveau musculaire chez la carpe après 24 h d'exposition ; à 100 mg/l cette stimulation est associée à une forte diminution des activités antioxydantes (de l'ordre de 50 à 98 %).

Labrot *et al.* (1996) ont mis en évidence des changements transitoires des taux de TBARS dans les tissus mous de bivalves (*Corbicula sp.*) et chez *Brachydanio rerio* intoxiqués par l'uranium et le plomb : les diminutions aux plus fortes concentrations ne semblent pas être liées à une protection par les systèmes antioxydants car les activités catalasique et peroxydasique ont été respectivement diminuées et non modifiées.

- Exposition des organismes à des molécules organiques

L'exposition au paraquat stimule le degré de lipoperoxydation et l'intoxication est en général associée à des activités enzymatiques antioxydantes augmentées en particulier la GPx, la SOD pouvant être également diminuée selon les espèces et la durée du traitement (tableau 8). L'injection intrapéritonéale de 50 mg/kg à un poisson marin (*Sparus aurata*) a entraîné après 2 jours une augmentation des TBARS dans la fraction soluble hépatique simultanément à une diminution de l'activité CuZnSOD (Pedrajas *et al.*, 1995). La lipoperoxydation est également un élément significatif de la toxicité du paraquat à fortes concentrations chez les invertébrés aquatiques (Wenning *et al.*, 1988). Des taux de TBARS plus élevés ont été reportés dans les microsomes hépatiques de poissons intoxiqués par la dieldrine (epoxyde) et le malathion (pesticide organochloré) (Pedrajas *et al.*, 1995).

L'induction de la peroxydation lipidique peut être spécifique de l'espèce ou du tissu considéré. Gabrielak et Klekot (1985) ont mis en évidence une sensibilité interspèce chez 3 poissons d'eau douce lors de l'exposition au paraquat : chez *C. carpio* l'augmentation progressive des taux sanguins de TBARS est accompagnée par une forte induction de l'activité peroxydasique ; *C. carassius L.* s'est révélée la plus sensible avec des élévations des TBARS et de l'ensemble des activités des enzymes antioxydantes tout au long du traitement mais aucune modification n'a été observée chez *T. tinta*. L'exposition à la ménadione - 1 mg/l pendant 6 jours - a provoqué une induction de la lipoperoxydation dans la glande digestive mais pas au niveau des branchies et des tissus restants de *M. edulis* (Livingstone *et al.*, 1990 ; Ribera *et al.*, 1991). Des taux de TBARS plus élevés dans les branchies de *M. edulis* exposés au tétrachlorure de carbone ont été reportés par Ribera *et al.* (1991) alors qu'aucun changement n'a été enregistré dans les glandes digestives.

La stimulation du processus de peroxydation peut dépendre également du mode d'administration des xénobiotiques et des doses appliquées. L'Aroclor 1254, mélange de PCBs agissant comme un inducteur général des enzymes du cytochrome P450, induit la lipoperoxydation mais seulement s'il est administré dans l'alimentation. Ainsi, Thomas et Wofford (1993) ont montré que ce mélange augmentait les taux de TBARS dans les microsomes hépatiques de *M. undulatus* intoxiqués par des aliments contenant 0,42 mg/kg d'Aroclor 1254. Aucun signe de stress oxydant n'a été noté après injection intrapéritonéale (500 et 1000 mg/l) chez *Sparus aurata* (Pedrajas *et al.*, 1995). Les travaux de Klobucar *et al.* (1997) ont indiqué que le pentachlorophénol exerçait des effets biphasiques sur les escargots d'eau douce selon sa concentration : à 450 µg/l, il a induit fortement et rapidement la lipoperoxydation qui est ensuite inhibée vraisemblablement suite à l'activation de mécanismes compensatoires. En revanche à 800 µg/l, le processus de peroxydation n'apparaît que tardivement en association avec des changements histologiques très marqués.

D'autres xénobiotiques organiques se sont montrés incapables d'affecter les taux de lipoperoxydation et les activités enzymatiques antioxydantes chez les bivalves et les poissons : c'est le cas du DEF (1 à 40 % de la CL₅₀ pendant 21 jours) et de son métabolite le N-

Type d'études	Organismes	Polluants sédiments µg/g poids sec	Accumulation dans les organes µg/g poids frais	Organes	Lipoperoxydation	Auteurs
ETUDES IN SITU Estuaire de Huelva Mines de pyrite	Poisson / eau douce <i>Mugil sp.</i>	HAPs : 44 PCBs : 2,3 DTT : 7,1	foie Cu : 51,1 Fe : 300	foie	× 0,3 × 0,6 (hydroperoxydes) ↗ SOD, GPx, Cat, GRd, GSH, GST, EROD	Rodriguez-Ariza <i>et al.</i> , 1993
	Bivalves / marin <i>Chamelea gallina</i> <i>Ruditapes decussatus</i> <i>Crassostrea gigas</i>		organisme entier métaux totaux 132,4 58,8 1194,3	organisme entier	× 0,8 = × 0,2 ↗ GPx, SOD, Cat, GST ↗ GPx, ↘ CAT	Rodriguez-Ariza <i>et al.</i> , 1992
Côte de Gallice Marée noire 5 stations	Bivalve / marin <i>Mytilus edulis</i>		organime entier HAPs Méra : 0,307 Lorbé : 0,296 Puente. : 0,216 Carino : 0,131 Référence : 0,028	glande digestive	× 2,3 = = = ↗ Cyt.P450 _{tot} , ↗ Cyt.1A	Solé <i>et al.</i> , 1996
Deux ports Mersin Erdemli : référence	Poisson / marin <i>Oedalechilus labeo</i> (1) <i>Lisa ramada</i> (2) <i>Mugil auratus</i> (3)	HAPs Mersin : 367 Erdemli : 8	HAPs - foies 34,3 (1+2) 9,3 (1+2+3)	foie	<i>O. labeo</i> : × 2,3 <i>L. ramada</i> : × 2,2 ↗ GPx, GRd, adduits ADN, ↘ SOD	Telli Karakoc <i>et al.</i> 1997
Rivière polluée	Poisson / eau douce <i>Leuciscus cephalus</i>		métaux _{tot} : 82,9 Fe : 74,6 Cu : 8,1	foie	= ↗ GPx, GST, ↘ SOD + nouvelles isoformes SOD	Lenartova <i>et al.</i> , 1997
ETUDES AU LABORATOIRE						
Sédiments contaminés 25, 80 et 144 jours	Poisson / marin <i>Limanda limanda</i>	HAPs : 310 PCBs : 0,015 Cd : 0,41 Hg : 0,85		foie	J ₂₅ → J ₈₀ : ↗ (× 4 à J ₈₀) J ₈₀ → J ₁₄₄ : ↘ (< référence) idem pour SOD, Cat, EROD : variations pour les sédiments référence à partir J ₈₀	Livingstone <i>et al.</i> , 1993
Sédiments contaminés 2, 7, 14 et 28 jours	Poisson / eau douce <i>Ictalurus punctatus</i>	HAPs : 93 PCBs : 7		foie	× 1,4 à × 1,6 de J ₂ à J ₂₈ ↗ SOD, Cat, GSH, GSSG ↗ EROD, ECOD, cassures ADN	Di Giulio <i>et al.</i> , 1993

Tableau 9 : Etudes reportées dans la littérature portant sur l'exposition *in situ* ou au laboratoire de vertébrés ou invertébrés aquatiques à des sédiments contaminés. SOD : superoxyde dismutase, GPx : glutathion peroxydase, Cat : catalase, GRd : glutathion réductase, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, GST : glutathion-S-transférases, EROD : éthoxyrésorufine O-dééthylase, Cyt. P450 tot. : cytochrome P450 total, Cyt. 1A : cytochrome P4501A, ECOD : éthoxycoumarine O-dééthylase.

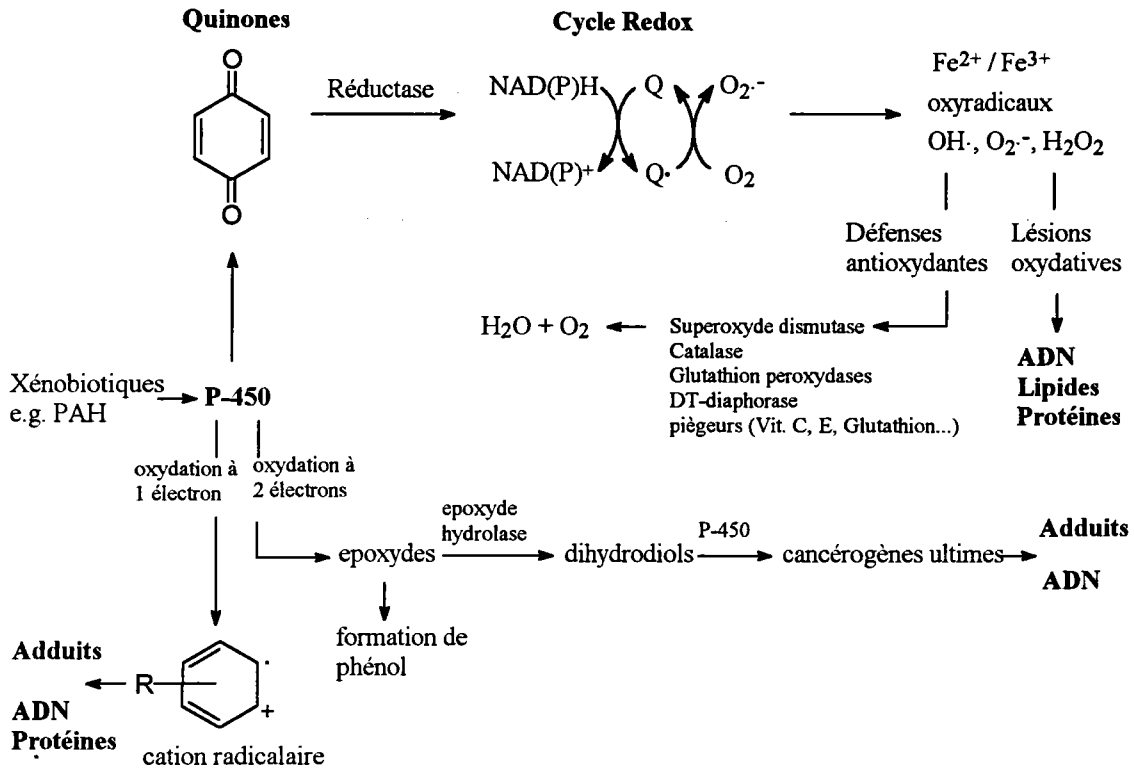


Figure 11 : Voies de transformation des xénobiotiques en métabolites et oxyradicaux catalysées par les enzymes du système des MFO.

butylmercaptan (Mather-Mihaich et Di Giulio, 1986), des effluents de pâte à papier (Mather-Mihaich et Di Giulio, 1991), du B(a)P (0,05 mg/l) (Livingstone *et al.*, 1990).

- Exposition des organismes *in situ* ou à des sédiments contaminés au laboratoire

Les réponses des vertébrés ou invertébrés aquatiques exposés au laboratoire à des sédiments pollués prélevés dans l'environnement ou peuplant des sites pollués sont variables (tableau 9). Les sources de contamination sont multiples (HAPs, PCBs, métaux) et l'établissement de corrélation directe entre un type de polluants et les changements des paramètres antioxydants et de la lipoperoxydation est souvent difficile. De plus, les modifications peuvent être liées à des facteurs de stress naturels (température, oxygène dissous, pH).

Des taux de MDA plus élevés ont été mesurés dans les glandes digestives des bivalves prélevés sur la côte de Galice au niveau du point le plus pollué par les HAPs (0,307 µg/g poids sec de tissu) par rapport au site de référence (0,027 µg/g poids sec de tissu) (Solé *et al.*, 1996). Cette augmentation est corrélée de façon marquée à des concentrations plus fortes en cytochrome P450 total et cytochrome 1A. Les HAPs et les PCBs sont des inducteurs reconnus des différentes isoenzymes du cytochrome P450, stimulant ainsi la production d'oxyradicaux (figure 11). Les effets délétères de l'exposition aux HAPs ont également été reportés chez des poissons vivant au sein d'une zone portuaire contaminée (219 µg/g de sédiments) : l'augmentation des activités de la GPx et de la GRd n'a pas été suffisante pour éviter le doublement des taux de MDA (Telli Karakoc *et al.*, 1997). Des stimulations similaires de la lipoperoxydation ont été obtenues lors de l'exposition de poissons au laboratoire à des sédiments contaminés par les HAPs et les PCBs (Di Giulio *et al.*, 1993 ; Livingstone *et al.*, 1993) même si les inductions de la peroxydation étaient transitoires chez la limande.

Des diminutions des taux de MDA ont été reportées en revanche au cours de deux études menées par Rodriguez-Ariza et collaborateurs (1992, 1993) sur l'estuaire de Huelva contaminé par les HAPs, PCBs, et les métaux, en particulier le fer et le cuivre. L'inhibition de la lipoperoxydation chez le poisson et chez les bivalves s'explique par une augmentation des enzymes antioxydantes et de détoxification (GST) tandis que leurs contenus élevés en GSSG confirmaient qu'ils avaient été soumis à un stress oxydant. Les espèces se sont adaptées aux conditions oxydantes chroniques. L'étude portant sur les 3 espèces de bivalves a montré, en outre, une différence de sensibilité interspèce dans la capacité à accumuler les métaux et à répondre au stress oxydant : *C. giga* contenant le plus de métaux dans ses tissus possède aussi les activités enzymatiques les plus faibles et les taux de MDA les plus forts ; *R. decussatus* pour laquelle aucun changement n'a été indiqué dans les taux de MDA par rapport aux témoins présentent les plus fortes activités enzymatiques pour la GPx, la GST et la SOD.

Composés étudiés	Organismes	Dose (sédiments) mg/l (µg/g)	Conditions d'exposition	Organes	8OHdG	Auteurs
Etudes au laboratoire Nitrofurantoïne	Poisson / marin <i>Parophrys vetulus</i>	Dose-réponse 0,1 - 1,0 - 10 mg/kg Cinétique 10 mg/kg	72 heures 1, 2, 3, 5 et 7 jours	foie rein sang foie	dose - réponse de 0,1 à 10 mg/kg (× 8 à × 16) × 2 à 10 mg/kg × 3 à 10 mg/kg ↗ maximale à J ₁ , J ₂ et J ₃ (× 4) ↘ aux valeurs contrôles à J ₅ et J ₇	Nishimoto <i>et al.</i> , 1992
	Bivalves / marin <i>Mytilus edulis</i>	0,1	2 et 4 jours	glande digestive	=	
Ménadione	Bivalves / marin <i>Mytilus edulis</i>	0,1	2 et 4 jours	glande digestive	=	Marsh <i>et al.</i> , 1993
Etudes <i>in situ</i> Zone portuaire (Eagle Harbour)	Poisson / marin <i>Parophrys vetulus</i>	Hydrocarbures de créosote et autres, forte prévalence de néoplasmes hépatiques		foie (porteurs de tumeurs)	× 12 par rapport aux foies normaux des poissons du site de référence	Malins et Haimanot, 1990b
Port Madison	Poisson / marin <i>Parophrys vetulus</i>	3% de néoplasmes hépatiques		foie (histologiquement normaux)	× 7 par rapport aux foies normaux des poissons du site de référence × 0,6 par rapport aux foies néoplastiques des poissons de Eagle Harbour	Malins et Haimanot, 1991a
4 stations Mer du Nord	Poisson / marin <i>Limanda limanda</i>			foie	=	Chipman <i>et al.</i> , 1992
2 sites sur la rivière Niagara	Poisson / eau douce <i>Ameriurus nebulosus</i>	1 : HAPs : 5,4 (× 14)* PCBs : 0,3 (× 11) 2 : HAPs : 3,3 (× 8) PCBs : 1,4 (× 56)		foie	= par rapport au site de référence	Eufemia <i>et al.</i> , 1997

Tableau 10 : Etudes reportées dans la littérature portant sur la mesure de la 8OHdG chez des vertébrés et invertébrés aquatiques. * : augmentations par rapport au site de référence.

Lenartova *et al.* (1997) n'ont observé aucune modification dans les taux de MDA chez *L. cephalus* peuplant une rivière polluée. Les foies renfermaient des teneurs en métaux entre 8 à 814 fois plus élevées que celles relevées chez des individus prélevés dans une rivière de référence. Des activités augmentées de la GPx et des GST et la synthèse de nouvelles isoformes de SOD sont apparues suffisamment efficaces pour empêcher l'apparition de la lipoperoxydation.

L'exposition aux métaux et aux molécules organiques au laboratoire aboutit souvent à l'induction de la lipoperoxydation dans les tissus des vertébrés et invertébrés aquatiques intoxiqués car les concentrations d'exposition utilisées sont généralement très élevées. Les résultats des différentes études *in situ* montrent que cette induction n'est pas une règle générale : la situation est en réalité plus complexe car des mécanismes de compensation et d'adaptation face au stress peuvent se mettre en place et prévenir le développement du processus de peroxydation.

2.9.4 Induction de la 8OHdG chez les organismes aquatiques

La mesure de la 8OHdG est une méthode relativement nouvelle pour examiner les lésions à l'ADN, comparé à la technique bien acceptée du postmarquage au ^{32}P pour la mesure des adduits. Peu de travaux sur les organismes aquatiques ont été publiés à ce jour.

Une augmentation des lésions oxydatives à l'ADN résultant de l'exposition à des contaminants a été mise en évidence chez les poissons mais pas chez les mollusques (tableau 10). Des concentrations élevées de 8OHdG dans les tissus hépatiques de poissons ont été reportées pour des expositions expérimentales aiguës (Nishimoto *et al.*, 1991) ou chroniques (Kelly *et al.*, 1992) à des composés purs, et chez des poissons prélevés dans des écosystèmes marins contaminés (Malins *et al.*, 1990ab ; Malins et Haimanot, 1991a ; Malins *et al.*, 1996). Ces études ont indiqué une augmentation de 3 à 12 fois des niveaux hépatiques de 8OHdG chez les poissons exposés par rapport aux contrôles. Malins et ses collaborateurs ont avancé l'hypothèse que ces lésions étaient liées de manière causale à la tumorigénèse.

Eufemia *et al.* (1997) n'ont par contre pas observé de modifications dans les taux de 8OHdG chez les poissons *Ameriurus nebulosus* capturés dans 2 sites pollués du Niagara. De même, les travaux de Chipman *et al.* (1992) n'ont pas révélé d'augmentation de la 8OHdG dans les foies de limandes (*Limanda limanda*) en relation avec l'exposition aux polluants chimiques. L'étude de Marsh *et al.* (1993) est la seule reportée dans la littérature à notre connaissance concernant les invertébrés aquatiques : les taux de 8OHdG dans les glandes digestives de *M. edulis* après 2 et 4 jours d'exposition *in vivo* à 2 composés cycliques rédox (ménadione et nitrofurantoïne (100 µg/l)) ne se sont pas montrés significativement différents de ceux des contrôles.

Produits mesurés	Méthodes	Auteurs
Diènes conjugués	- Spectroscopie UV à 233 nm - CLHP avec détection UV à 234 nm	Recknagel et Glende, 1984 Rice-Evans <i>et al.</i> , 1991
Perte sélective en acides gras polyinsaturés	- CG avec détection à ionisation de flamme - CLHP avec détection UV ou fluorescence	Christie, 1982 (Rice-Evans <i>et al.</i> , 1991) Christie, 1987
Hydroperoxydes lipidiques	Détermination iodométrique - spectroscopie UV à 353 nm - CLHP avec détection UV à 358 nm	Pryor et Castle, 1984 Rice-Evans <i>et al.</i> , 1991
	Détermination enzymatique (cyclooxygénase) polarographie (électrode à O ₂)	Marshall <i>et al.</i> , 1985 (Rice -Evans <i>et al.</i> , 1991)
	CLHP avec détection UV à 210 et 265 nm	Yamamoto et Ames, 1987
	CG-SM	Gutteridge et Halliwell, 1991
Aldéhydes		
Malonaldéhyde (MDA)	Détermination à l'acide thiobarbiturique - spectroscopie à 535 nm - spectrofluorométrie (excitation : 515 nm, émission : 555 nm) - CLHP avec détection UV à 535 nm	Buege et Aust, 1978 Uchiyama et Mihara, 1978 Yagi, 1984 Bird et Draper, 1984 Carbonneau <i>et al.</i> , 1991
	MDA libre - CLHP avec détection UV à 267-270 nm - CG-SM	Csallany <i>et al.</i> , 1984 Esterbauer <i>et al.</i> , 1984 Behrens et Madere, 1991 Liu <i>et al.</i> , 1997
4-Hydroxynonéal (HNE)	- CLHP avec détection UV à 220-223 nm - CG-SM	Esterbauer et Zollner, 1989 Esterbauer et Cheeseman, 1990
Ensemble du spectre d'aldéhydes formés	- Méthode DNPH dérivation par la DNPH puis séparation et identification par CCM puis CLHP avec détection UV à 365-378 nm - Méthode CHD Dérivation par la CHD puis séparation et identification par CLHP avec détection fluorescence (excitation : 380 nm, émission : 445 nm)	Esterbauer et Zollner, 1989 Esterbauer et Cheeseman, 1990
Hydrocarbures pentane (issu de la décomposition des hydroperoxydes) éthane (issu de l'oxydation des acides gras)	CG avec détection à ionisation de flamme	Laurence et Cohen, 1984 Müller et Sies, 1984

Table 11 : Différentes méthodes permettant d'évaluer la lipoperoxydation reportées dans la littérature.

2.10 Méthodes d'évaluation de la lipoperoxydation et de la 8OHdG

2.10.1 Détermination de la lipoperoxydation

L'évaluation de la lipoperoxydation s'avère difficile en raison de la grande diversité des espèces formées au cours du processus :

- radicaux libres à courte durée de vie
- hydroperoxydes lipidiques labiles
- aldéhydes et alcanes issus de réactions de coupure de certains dérivés.

De nombreuses techniques d'évaluation ont été proposées, chacune, cependant, mesurant un paramètre différent. Le choix d'un marqueur du processus global est, par conséquent, délicat (tableau 11).

Parmi ces méthodes, plusieurs mesurent des espèces formées au cours de l'initiation de la lipoperoxydation. Il s'agit, d'une part, de la **détection des diènes conjugués**, issus de la stabilisation du radical d'acide gras par réarrangement moléculaire. Les molécules possédant la configuration diène sont caractérisées par une absorption intense de la lumière (la bande K) dans une région de 215-250 nm, ce qui permet leur détermination par spectroscopie UV à 233 nm (Recknagel et Glende, 1984). Cette méthode a l'inconvénient *in vivo* de nécessiter un contrôle "lipides non peroxydés" difficile à obtenir. Une information qualitative et quantitative sur les principaux composés diènes conjugués peut être obtenue par des techniques CLHP (Rice-Evans *et al.*, 1991). **La mesure de la perte sélective en acides gras insaturés** des fractions membranaires peut être utilisée également pour estimer le degré de lipoperoxydation. Les acides gras sont mesurés sous la forme de méthylesters par CG, ou par CLHP (Christie, 1987 ; Rice-Evans *et al.*, 1991). Cette méthode utilisée *in vitro* fournit une bonne corrélation avec d'autres indices de la lipoperoxydation, *in vivo* par contre, l'interprétation est rendue délicate car la mesure de faibles différences entre des nombres très importants et les mécanismes de remplacement des acides gras, peuvent masquer les changements peroxydatifs initiaux.

Un ensemble de méthodes permet de quantifier **les hydroperoxydes lipidiques**, issus de l'étape de propagation de la lipoperoxydation. Ils peuvent être réduits par l'iode et quantifiés en spectrophotométrie à 353 nm (Pryor et Castle, 1984) ou avec plus sensibilité en CLHP (Slater, 1984 ; Rice-Evans *et al.*, 1991). Des problèmes d'interférence sont liés à l'utilisation de cette méthode. Marshall *et al.* (1985) ont mis au point une technique de détermination enzymatique spécifique et sensible basée sur la stimulation de l'activité de la cyclooxygénase (Gutteridge et Halliwell, 1991 ; Rice-Evans *et al.*, 1991). Des techniques CLHP, ainsi que CG-SM permettent

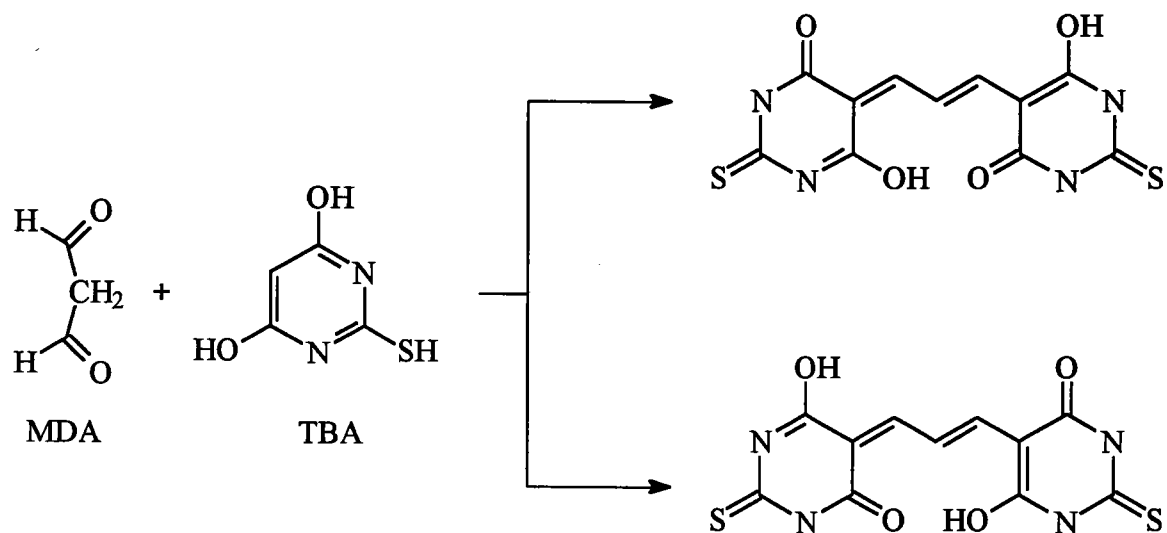


Figure 12 : Réaction du TBA avec le MDA, et structures tautomériques du complexe.

une analyse spécifique plus fine des hydroperoxydes lipidiques (Gutteridge et Halliwell, 1991). La labilité de ces composés en présence d'ions métalliques, et de thiols, et leur métabolisation par les peroxydases rendent cependant leur détermination complexe.

Les hydroperoxydes lipidiques, instables, peuvent être convertis par des réactions d'oxydation, de scission, de fission, et de réarrangement, en des carbonyles plus stables. Les méthodes analytiques courantes de **mesure des aldéhydes** sont variées et permettent, soit de détecter et de quantifier des aldéhydes spécifiques (malonaldéhyde, 4-hydroxynonanal), soit d'obtenir la gamme complète des aldéhydes formés dans les échantillons biologiques.

Le malonaldéhyde (MDA), dialdéhyde à 3 carbones, est le plus abondant individuellement, et résulte de la décomposition des acides gras à plus de 3 doubles liaisons. Sa détermination par l'acide thiobarbiturique (TBA) est l'un des essais les plus communs dans les études de lipoperoxydation (Bird et Draper, 1984 ; Esterbauer et Cheeseman, 1990 ; Draper et Hadley, 1990 ; Valenzuela, 1991). Le test TBA a l'avantage d'être simple et rapide ; son principe est basé sur la formation un complexe chromogène entre le MDA et le TBA, à pH 2-3 et à chaud (100 °C), détectable en absorbance à 535nm (Buege et Aust, 1978), ou en fluorescence à 553 nm (Rice-Evans *et al.*, 1991) (figure 12). Une amélioration de l'essai par Uchiyama et Mihara (1978) consiste en l'extraction du chromogène par le n-butanol. Ce test a cependant l'inconvénient d'être peu spécifique et des précautions doivent être prises dans l'interprétation des résultats en raison de multiples problèmes d'interférence. Plusieurs autres aldéhydes, saturés ou insaturés, formés dans les systèmes lipidiques peroxydés produisent différents chromogènes avec le TBA et l'authentique complexe (TBA)₂-MDA ne peut être séparé que par CLHP (Rice-Evans *et al.*, 1991). Une variété d'espèces chimiques comme la biliverdine, le glucose, le sucrose, le fructose, le 2-déoxyribose réagissent également avec le TBA. De plus, une partie du MDA détecté par le test TBA est générée par la décomposition des hydroperoxydes en raison des conditions d'acidité et de haute température utilisées. C'est pourquoi le terme de TBARS semble plus approprié pour définir les espèces formées au cours du test TBA. Les sources d'erreurs peuvent être réduites par l'addition d'antioxydants comme l'hydroxytoluène butylé (BHT), de chélatants, néanmoins ces ajouts peuvent non seulement influencer la lipoperoxydation dans le milieu d'incubation, mais aussi la décomposition des hydroperoxydes pendant l'essai lui-même (Gutteridge et Halliwell, 1990). En conclusion, le test TBA peut être en première approximation utile car il est rapide et simple, mais son interprétation reste délicate.

Des techniques CLHP pour la détermination du MDA libre sont nettement supérieures car elles sont spécifiques et sensibles. Plusieurs méthodes CLHP ont été reportées différant principalement par le type de colonnes employées : la méthode de Csallany *et al.* (1984) est basée sur l'utilisation d'une colonne à exclusion, son principal inconvénient est lié à la longueur des temps d'analyse (~ 50 min.). Esterbauer *et al.* (1984) ont séparé le MDA sur une colonne

« aminophase » : les temps d'analyse sont dans ce cas beaucoup plus courts (~ 5 min.) mais des problèmes de stabilité des temps de rétention du MDA sont liés à l'utilisation des colonnes « aminophase », en raison sans doute de l'hydrolyse de leur site actif. Le MDA étant un anion à pH physiologique, la chromatographie par appariement d'ions peut être appliquée (Behrens et Madere, 1991). Le réactif d'appariement d'ions évite la polymérisation du MDA pendant la séparation. Récemment une détermination du MDA a été mise au point par CG-SM (Liu *et al.*, 1997).

Une technique CLHP ainsi qu'une méthode GC-SM ont été développées pour la mesure de l'aldéhyde hautement cytotoxique **4-hydroxynonéal** (HNE), (Esterbauer et Zollner, 1989 ; Esterbauer et Cheeseman, 1990).

Des méthodes d'analyse plus fines permettent une détermination de l'ensemble du **spectre d'aldéhydes formés**. Elles restent difficilement exploitables en routine en raison de leur longueur et de leur complexité. Deux types de méthodes ont été mises au point : la méthode à la 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) et la méthode à la 1,3-cyclohexanedione (CHD) (Esterbauer et Zollner, 1989 ; Esterbauer et Cheeseman, 1990). La méthode à la DNPH a pour principe la dérivation des aldéhydes par la 2,4-dinitrophénylhydrazine suivie d'une détection par CCM puis CLHP. Le principe de la méthode à la CHD est similaire : les aldéhydes réagissent avec la 1,3-cyclohexanedione pour former des dérivés fluorescents séparés par CLHP. Bien que cette dernière soit plus sensible et plus sélective que la méthode à la DNPH, l'identification des chromatogrammes obtenus est plus délicate.

Enfin, des méthodes évaluent **les hydrocarbures** issus de la décomposition des hydroperoxydes lipidiques (pentane) et de l'oxydation des acides gras (éthane) dans l'air exhalé par les organismes (Lawrence et Cohen, 1984) et au niveau des organites ou organes isolés (Müller et Sies, 1984) par CG. Ces méthodes ont l'avantage d'être non invasives mais des interférences liées à la présence de peroxydation bactérienne dans les intestins des individus et à la contamination fréquente de l'air inhalé par de forts taux d'hydrocarbures, font qu'elles restent controversées.

Il a fallu faire un choix parmi l'ensemble de ces méthodes, et ce sont les critères de faisabilité (rapidité) et de fiabilité c'est à dire spécificité, sensibilité et reproductibilité, qui nous ont conduit à évaluer le MDA par CLHP (Behrens et Madere, 1991) comme indice de la lipoperoxydation. Le test TBA a été réalisé simultanément pour comparaison.

Méthodes	Quantité d'ADN(µg)	Sensibilité*	Avantages et inconvénients	Auteurs
CLHP-EC	10 - 100	1×10^{-6} $0.01 \times 10^{-6\diamond}$	<ul style="list-style-type: none"> - sensible, spécifique, simple - sous-estimation possible dans le cas d'ADN fortement endommagé en raison d'une hydrolyse enzymatique incomplète - les protocoles d'extraction pourraient être à l'origine d'une production artéfactuelle de 8OHdG 	Shigenaga <i>et al.</i> , 1990 Shigenaga <i>et al.</i> , 1994 Adachi <i>et al.</i> , 1995 \diamond
GC-SM-SIM	10 - 100	1×10^{-6}	<ul style="list-style-type: none"> - sensibilité comparable à CLHP-EC, spécificité, facilité d'application en routine - détermination d'un large spectre de modifications oxydatives (bases, sucres, pontages ADN-protéines) - possibilité de travailler directement sur la chromatine évitant l'extraction des protéines - l'étape d'hydrolyse classique de l'ADN par l'acide formique peut décomposer certains produits (FapyGua, Fapy Ade) - l'étape de silylation peut entraîner l'oxydation de la guanine non modifiée si une prépurification de la 8OHG n'est pas appliquée 	Dizdaroglu, 1991 Dizdaroglu, 1994 Ravanat <i>et al.</i> , 1995 Douki <i>et al.</i> , 1996 Douki <i>et al.</i> , 1997
Immunologie	100	1×10^{-5}	<ul style="list-style-type: none"> - rapide, sensible, très spécifique (colonne d'immunoaffinité) - bonne corrélation avec CLHP-EC mais les niveaux ELISA sont 6 fois supérieurs - cross-réactions avec guanosine et d'autres dérivés structurellement apparentés 	Yin <i>et al.</i> , 1995
			<ul style="list-style-type: none"> - analyse immunohistochimique applicable à un petit nombre de cellules (biopsies de tissus) - pas d'étapes d'extraction ou d'hydrolyse de l'ADN - semiquantitative - cross-réactions possibles 	Yarborough <i>et al.</i> , 1996
Endonucléases de réparation	10	5×10^{-7}	<ul style="list-style-type: none"> - très bonne sensibilité - le profil de cassures de brin fournit une empreinte de l'agent endommageant l'ADN - quantification des sites AP - intéressant en complément de la CG-SM-SIM qui permet de différencier les modifications de bases qui sont sensibles à la même endonucléase - important de définir la concentration de protéine nécessaire à saturer la réaction d'incision et de vérifier que les endonucléases ne clivent pas des modifications qui ne sont pas des substrats 	Epe et Hegler, 1994
Postmarquage au ^{32}P	≤ 1	1×10^{-5} - 10^{-6}	<ul style="list-style-type: none"> - très bonne sensibilité - long et difficilement applicable en routine - intéressant dans le cas de biopsies de tissus en raison de la faible quantité d'ADN requise - surestimation de 10 à 50 fois par rapport à la CLHP-EC 	Devanaboyina et Gupta, 1996
	1	1×10^{-4}	<ul style="list-style-type: none"> - très faible quantité d'ADN requise - sous-estimation de 4 fois par rapport à la CLHP-EC - sensibilité suffisante pour l'analyse <i>in vitro</i> mais pas pour l'analyse de cellules ou de tissus 	Lu <i>et al.</i> , 1991
Postmarquage par fluorescence	100	1×10^{-6}	<ul style="list-style-type: none"> - versatilité, applicable à une large gamme de nucléosides modifiés - problèmes de résolution en CLHP dans le cas de mélanges complexes de nucléosides modifiés 	Sharma <i>et al.</i> , 1991
Postmarquage au ^3H	100	$0,5 - 3 \times 10^{-4}$	<ul style="list-style-type: none"> - analyse simultanée de plusieurs nucléosides dans l'ADN et l'ARN - possibilité de transmutation ou de self-radiolyse dans la portion marquée radioactivement 	Frenkel <i>et al.</i> , 1991

Table 12 : Différentes méthodes permettant la mesure de la 8OHdG reportées dans la littérature. *sensibilité indiquée par rapport aux bases normales de l'ADN.

2.10.2 Mesure de la 8OHdG

Diverses techniques ont été développées pour mesurer la 8OHdG. Ces méthodes incluent la CLHP avec détection électrochimique (CLHP-EC) (Floyd *et al.*, 1986a), la CG-SM (Dizdaroglu, 1991, 1994), le postmarquage au ^{32}P (Cadet *et al.*, 1992), les essais basés sur les anticorps (Yin *et al.*, 1995 ; Yarborough *et al.*, 1996), les techniques d'affinité (Cook *et al.*, 1996), le postmarquage par fluorescence (Sharma *et al.*, 1990) et le postmarquage par ^3H (Frenkel *et al.*, 1991) (table 12).

La CLHP-EC a été la plus souvent utilisée pour quantifier la 8OHdG dans des systèmes biologiques variés, probablement en raison de sa simplicité et de sa sensibilité. La détection électrochimique permet de mesurer cette lésion avec une sensibilité 1000 fois supérieure à la détection UV. De multiples études ont permis de montrer la présence de la 8OHdG *in vivo* mais des précautions doivent être prises dans l'interprétation de ces données en terme de mesures *quantitatives*. Quand OH^\cdot attaque les bases de l'ADN, des radicaux sont formés qui peuvent être oxydés ou réduits selon les conditions expérimentales : des taux variables de 8OHdG peuvent ainsi résulter de l'attaque de la guanine dans l'ADN par un même taux de OH^\cdot . Un nombre de résidus 8OHdG modifié ne reflète pas nécessairement des changements dans l'intensité de l'attaque de l'ADN par les ROS. Par exemple, les systèmes pour lesquels la génération de OH^\cdot est dépendante des ions fer, entraînent la formation de FapyGua et de 8OHdG ; dans le cas où les ions cuivres catalysent la formation de OH^\cdot , la production de 8OHdG par rapport à FapyGua est favorisée. Les limites de détection des techniques CLHP-EC sont de l'ordre de 1 résidu 8OHdG pour 10^6 bases de l'ADN (1 8OHdG/ 10^6 bases) (Shinenaga *et al.*, 1990, 1994). Adachi *et al.* (1995) ont pu l'améliorer en apportant des modifications à la méthode analytique (0,01 8OHdG/ 10^6 bases). Les niveaux de base de 8OHdG déterminés dans les cellules et les tissus sont compris entre 0,4 et 10 8OHdG/ 10^6 bases. Plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature différant principalement par les techniques d'isolement de l'ADN employées (sans phénol (Marmur, 1961), avec phénol (Gupta, 1984) ou kits d'isolement), les mélanges enzymatiques utilisés pour l'hydrolyse de l'ADN en nucléosides correspondants (nucléase P1 et phosphatase alcaline ou mélanges enzymatiques plus complexes) et les conditions chromatographiques appliquées pour la séparation de la 8OHdG.

Des techniques analytiques basées sur la CLHP-EC ont été développées pour la mesure de la 8OHdG et de la 8OHG dans les urines. Ames et collaborateurs ont utilisé de multiples extractions phase-solide sur des mini-colonnes précédant une séparation gradient, et plus récemment les extractions ont été réalisées sur des colonnes d'immunoaffinité avec des anticorps monoclonaux spécifiques de la 8OHdG et de la 8OHG, ne nécessitant qu'une

séparation isocratique (Shigenaga *et al.*, 1990, 1991, 1994). Des méthodes CLHP-EC bi - et tridimensionnelle automatisables ont été reportées respectivement par Tagesson *et al.* (1995) et Loft *et al.* (1993). L'excrétion urinaire de la 8OHdG et de la 8OHG fournit une estimation de la réparation de cette lésion au niveau de l'ADN et elle représente un biomarqueur non invasif intéressant. Les taux d'excrétion de la 8OHdG dans l'urine humaine sont en général de l'ordre de 130-300 pmol / kg de poids corporel / 24 h (Loft *et al.*, 1993 ; Shigenaga *et al.* 1994 ; Tagesson *et al.*, 1995 ; Lagorio *et al.*, 1994). Les limitations de ce type de dosage résident dans le fait que l'apport d'acides nucléiques issus de l'alimentation et d'autres processus physiologiques cellulaires - turnover normal des cellules, oxydation des pools de déoxynucléosides et déoxynucléotides - peuvent contribuer aux niveaux mesurés.

Une caractérisation complète des lésions à l'ADN par les ROS peut être obtenue par la technique de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) applicable à l'ADN lui-même ou à des complexes ADN-protéines comme la chromatine (Dizdaroglu, 1991, 1994). Pour les techniques de CG-SM, l'ADN ou la chromatine est préalablement hydrolysé (en général à chaud par l'acide formique) et les produits sont convertis en dérivés volatiles qui sont alors séparés par chromatographie gazeuse et finalement identifiés par leur structure en spectrométrie de masse. De meilleures sensibilité et spécificité de détection peuvent être obtenues en opérant en mode SIM (selected ion monitoring). La limite de détection dans l'ADN ou la chromatine est approximativement de 1 8OHdG/10⁶ bases, ce qui rend la technique GC-SM-SIM comparable en sensibilité à la détermination par CLHP-EC. La technique CG-SM-SIM a permis de connaître les spectres caractéristiques des modifications de bases induites par le radical OH[•] et l'oxygène singulet dans l'ADN. Les résultats sont exprimés en général en nanomoles de bases modifiées par milligramme d'ADN, correspondant à 318 bases modifiées pour 10⁶ bases de l'ADN (Halliwell et Dizdaroglu, 1992). Peu d'études sur l'ADN de cellules ou de tissus ont été réalisées par CG-SM et les valeurs reportées sont comprises entre 22 et 73 8OHdG/10⁶ bases.

La détection immunologique a été depuis longtemps reconnue comme un outil potentiellement puissant pour l'analyse de l'ADN modifié par les génotoxiques (Cadet et Weinfeld, 1993). Une méthode immunoperoxidase utilisant un antisérum reconnaissant la 8OHdG a été développée par Yarborough et collaborateurs (1996). Elle présente l'avantage de ne nécessiter qu'un faible nombre de cellules, ce qui permet son application à des biopsies de tissus. Néanmoins il s'agit d'une technique semiquantitative. Les mêmes auteurs ont reporté une quantification de la 8OHdG par purification sur colonnes d'immunoaffinité suivi par un dosage ELISA (Yin *et al.*, 1995).

Des méthodes indirectes de détection de la 8OHdG sont basées sur l'utilisation des endonucléases de réparation de l'ADN. Plusieurs endonucléases spécifiques ont été clonées et bien caractérisées : ces enzymes reconnaissant les modifications de base, combinent une activité glycosylase et AP endonucléase. Elles éliminent d'abord les bases modifiées de la portion déoxyribose et incisent ensuite l'ADN au niveau du site AP généré. Les cassures de brin formées peuvent être ainsi détectées avec sensibilité et quantifiées par une variété de techniques (Epe et Hegler, 1994). La 8OHdG peut être excisée par la protéine Fpg.

Plusieurs tentatives ont été faites pour détecter la 8OHdG par le postmarquage au ^{32}P (Lu *et al.*, 1991), mais aucune de ces techniques n'a été appliquée en routine en raison de plusieurs limitations : la résolution insuffisante de la 8OHdG du déoxyguanosine (dG), le manque de séparation de la 8OHdG du riboguanosine résultant d'une digestion incomplète de l'ARN présent dans les préparations d'ADN, une sous-estimation de 5 fois des taux de 8OHdG dans l'ADN comparé à la CLHP-EC, et/ou un bruit de fond chromatographique trop élevé. Devanaboyina et Gupta (1996) ont cependant développé des conditions pour le postmarquage au ^{32}P permettant la mesure de la 8OHdG dans l'ADN sans rencontrer les difficultés techniques décrites précédemment. Ces améliorations consistent principalement en une séparation de la 8OHdG au niveau 5'-monophosphate et au développement d'un nouveau système de solvants pour la CCM. Cette technique a été notamment appliquée à la détermination des niveaux de base dans l'ADN de différents organes de rat. Les valeurs indiquées sont de 10 à 50 fois supérieures à celles obtenues par la CLHP-EC dans les tissus respectifs de rats Sprague-Dawley âgés de 5 mois. Elles sont proches de celles mesurées par CG-SM dans le foie et le rein pour des rats de 10 mois.

Plusieurs possibilités ont été avancées par Halliwell et Dizdaroglu (1992) pour expliquer les différences entre les niveaux de base mesurés par CLHP-EC et CG-SM. Tout d'abord, la CLHP-EC peut sous-estimer le taux réel de 8OHdG dans l'ADN. La mesure quantitative de la 8OHdG ne peut se faire qu'après extraction de l'ADN et hydrolyse enzymatique complète. L'extraction d'ADN hautement endommagé peut être moins efficace en raison de la perte de petits fragments d'ADN et de pontages des bases de l'ADN avec les nucléoprotéines sous-estimant les lésions dans les cellules soumises à un stress oxydatif intense. L'efficacité des exonucléases et des endonucléases dans l'hydrolyse de l'ADN est fortement affectée par les modifications dans les bases, il n'est par conséquent pas certain que les bases modifiées soient complètement hydrolysées. Enfin, la technique CLHP mesure la 8OHdG et non la 8OHG. Frenkel *et al.* (1991) ont montré qu'un pH acide - fréquemment utilisé pour la digestion par la nucléase P1- peut stimuler l'hydrolyse de la 8OHdG en 8OHG, causant une perte de matériel détectable. Les récents travaux de Douki *et al.* (1997) ont par contre écarté toute possibilité de sous-estimation des taux de 8OHdG par la technique CLHP-EC en raison d'une digestion enzymatique incomplète de l'ADN : l'augmentation des temps d'incubation et des

concentrations de la nucléase P1 n'a pas modifié les taux de 8OHdG mesurés. De plus, les auteurs ont montré que la 8OHdG ne bloquait pas l'activité exonucléase de la nucléase P1 et que cette lésion ne subissait pas de dépurination dans le tampon légèrement acide de la nucléase P1. Les étapes d'hydrolyse et de dérivation de la technique CG-SM, longues et fastidieuses, peuvent détruire certaines bases modifiées et créer des artéfacts. Les travaux de Halliwell et Dizdaroglu (1992) ont montré que l'hydrolyse par l'acide formique n'induit pas la formation de 8OHdG dans l'ADN. Il semble par contre que l'étape de dérivation par l'acétonitrile et le *N*-tertbutyldiméthylsilyl-*N*-méthyl-trifluoroacétamide, puisse produire la 8OHdG. De récentes études ont confirmé ces problèmes et semblent avoir élucidé leur origine. Les travaux de Ravanat *et al.* (1995) ont établi sans ambiguïté que les plus fortes valeurs de 8OHdG obtenues par CG-SM étaient dues à l'oxydation artéfactuelle de la guanine non modifiée pendant l'étape de silylation précédant l'analyse CG-SM. La prépurification de la 8-oxoguanine par HPLC ou par chromatographie d'immunoaffinité, avant l'étape de silylation permet de minimiser cet artéfact et d'obtenir des taux comparables à ceux mesurés par CLHP-EC. Douki et collaborateurs (1996) ont démontré que l'oxydation des bases normales pendant la dérivation était un phénomène général et concernait aussi l'adénine, la thymine, la cytosine et la thymidine. Ces résultats expliquent par conséquent pourquoi les niveaux de bases de 8OHdG estimés par CG-SM reportés dans la littérature sont en moyenne 10 fois plus élevés que ceux obtenus par CLHP-EC.

Notre choix pour la mesure de la 8OHdG s'est porté sur les techniques CLHP-EC en raison de leur accessibilité comparé à la CG-SM, de la facilité de leur mise en œuvre pour des dosages de routine par rapport à des techniques comme le postmarquage au ³²P. La méthode de Shigenaga *et al.* (1994) a été retenue parmi les autres techniques CLHP-EC reportées dans la littérature car l'ensemble des étapes de préparation des échantillons biologiques sont extrêmement bien détaillées.

3 Matériel biologique, méthodes et optimisations

3.1 Matériel biologique

3.1.1 Présentation

- Systématique.

Embranchement : Mollusques

Classe : Lamellibranches

Ordre : Eulamellibranches

Famille : Unionidés

Genre et espèce : *Unio tumidus*

- Biologie.

Les Lamellibranches ou Bivalves, sont des mollusques aquatiques, à corps mou, caractérisés par une masse viscérale symétrique aplatie transversalement ; elle est enveloppée par le manteau qui forme deux grands lobes, l'un droit, l'autre gauche, chacun sécrétant une valve de la coquille. Dans la vaste cavité ainsi formée, font saillie les branchies en lames aplaties. Le pied est petit, comprimé latéralement et souvent fouisseur : les Lamellibranches se déplacent peu ou même peuvent vivre fixés. Ce sont des microphages : ils se nourrissent par filtration de particules en suspension microscopiques comprenant le phytoplancton, le zooplancton et les détritiques organiques. Les particules alimentaires sont captées par le mucus sur les branchies et ensuite dirigées par l'action ciliaire vers le tractus digestif.

Les Eulamellibranches sont les plus évolués des Lamellibranches ; leurs branchies présentent des jonctions vasculaires.

La plupart des bivalves d'eau douce font partie de la famille des Unionidés (figure 1) ; il existe d'autres familles telles que les Sphaeriidae et les Corbiculidae. Les Unionidés forment un grand groupe d'espèces d'assez grande taille, se divisant en trois sous familles : les Margaritiferidae, les Unioninae et les Anodontinae. Elles sont caractérisées pendant la période de reproduction (début de l'automne) par l'incubation des embryons entre les feuillets des lamelles branchiales dont une partie des filaments a perdu son rôle respiratoire (*marsupium*). Les embryons forment des larves (*glochidia*) qui nécessitent une période de parasitisme sur un poisson hôte pour se métamorphoser en bivalves juvéniles. Les larves se fixent d'abord au niveau des écailles ou des branchies du poisson hôte puis sont encapsulées sous le tissu. Après la métamorphose sur le poisson hôte, les moules juvéniles tombent sur le substratum pour devenir des membres à part entière de la communauté benthique. La plupart des espèces libère leurs glochidia à la fin du

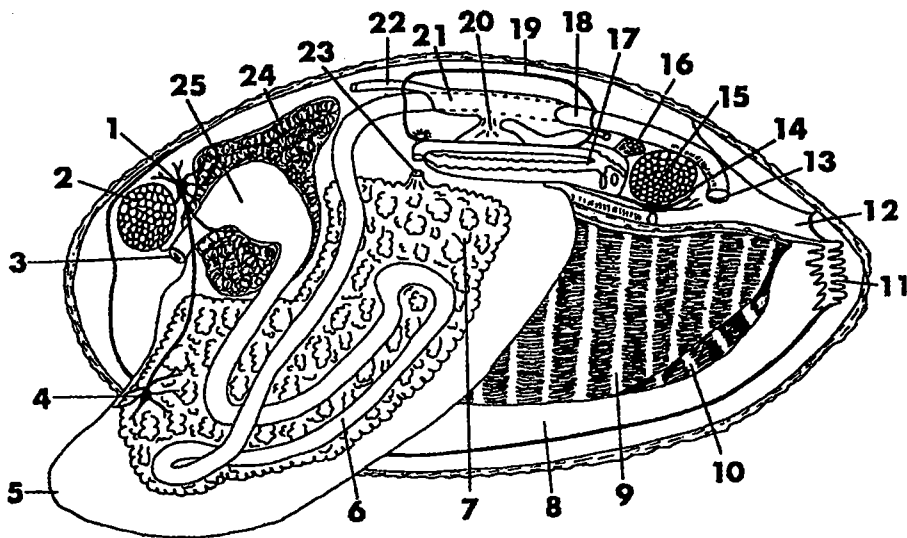


Figure 1 : Dissection d'un Unio adulte.

1 : ganglion cérébral, 2 : muscle adducteur antérieur, 3 : bouche, 4 : ganglion pédieux, 5 : pied, 6 : intestin moyen, 7 : gonade, 8 : manteau (droit), 9 : branchie interne (droite), 10 : branchie externe (droite), 11 : syphon inhalant, 12 : syphon exhalant, 13 : anus, 14 : ganglion viscéral, 15 : muscle adducteur postérieur, 16 : muscle rétracteur du pied, 17 : rein, 18 : intestin, 19 : péricarde, 20 : oreillette droite, 21 : ventricule, 22 : aorte, 23 : pore génital, 24 glande digestive, 25 : estomac.

printemps ou pendant l'été, probablement en réponse à une augmentation de la température de l'eau.

Les cycles de vie des moules Unionidés sont de l'ordre plusieurs années.

Les Unionidés sont largement répandues en France et en Europe dans les milieux dulçaquicoles, les espèces rencontrées étant plus spécifiques des régions. Nagel (1988) a indiqué que les espèces *Unio tumidus* et *pictorum* sont présentes en France surtout dans le nord et l'est. Ces bivalves vivent dans le fond des cours d'eau et des étangs. Plus généralement, la distribution des mollusques peut être limitée par de très faibles concentrations en sels dissous, en particulier le carbonate de calcium qui est important pour la construction de la coquille : les mollusques sont par conséquent plus aptes à vivre dans des eaux alcalines que dans des eaux acides ($\text{pH} < 6$) (Elder et Collins, 1991).

Les mollusques aquatiques sont communément utilisés comme bioindicateurs de contamination environnementale et particulièrement métallique en raison de leur capacité à bioaccumuler les polluants. Les bivalves marins ont notamment été employés comme organismes sentinelles dans des programmes de biomonitoring pour la contamination d'estuaires et de zones côtières (Jernelov, 1996).

Unio tumidus présente plusieurs avantages pour nos études :

- sa taille est suffisante pour permettre la mesure de plusieurs paramètres biochimiques sur un même tissu
- sa faible mobilité permet la mise en cage des individus et les études de transfert sur des sites pollués
- sa position à l'interface eau-sédiment tient compte à la fois des contaminants présents dans l'eau et le sédiment

3.1.2 Echantillonnage, conservation et préparation des tissus

3.1.2.1 Echantillonnage et conservation

Les bivalves utilisés pour les études de transfert et les expérimentations au laboratoire ont été prélevés au niveau de l'étang de Manom, site de référence localisé à une vingtaine de kilomètres du laboratoire. Des analyses physico-chimiques ont été effectuées régulièrement sur les sédiments afin de contrôler le maintien de la qualité du site.

Pour l'ensemble des études de terrain, les bivalves encagés dans le site de référence ont été disséqués sur place, et les tissus ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide. Les glandes digestives et les branchies ont été conservées à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à ce qu'elles soient analysées.

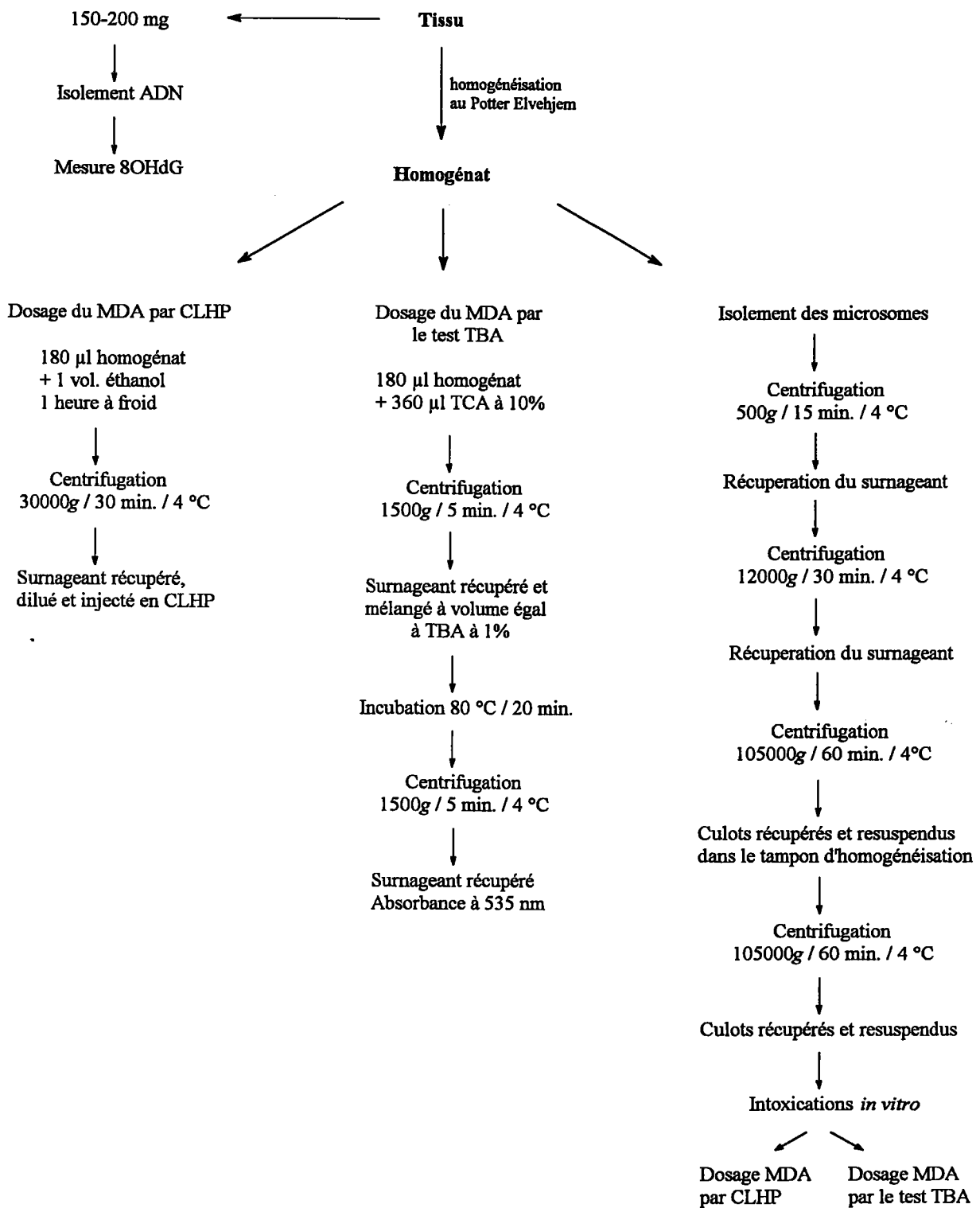


Figure 2 : Etapes de préparation des homogénats et des fractions microsomales.

Les bivalves ayant servi à l'optimisation des dosages ont été ramenés au laboratoire, transportés dans leur eau d'origine puis disséqués ; les organes ont été pesés et congelés comme décrit précédemment.

3.1.2.2 Préparation des homogénats de glandes digestives et de branchies pour le dosage du MDA

Les tissus sont d'abord rapidement décongelés puis pesés. L'ensemble des étapes d'homogénéisation sont réalisées sur glace. Les glandes digestives et les branchies sont homogénéisées manuellement à l'aide d'un Potter Elvehjem dans un tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7.6 respectivement par 3 et 6 tours de pillons. Pour 1000 mg de tissu, 2 ml de tampon d'homogénéisation sont ajoutés.

L'homogénat ainsi obtenu est immédiatement utilisé pour la détermination du MDA (figure 2).

3.1.2.3 Isolement des fractions microsomales de glandes digestives et de branchies

Les microsomes sont obtenus à partir des homogénats de tissus par ultracentrifugation différentielle. La fraction microsomale est constituée par un mélange hétérogène de vésicules membranaires issues du déchirement des membranes plasmiques et du réticulum endoplasmique au moment de l'homogénéisation des tissus. L'isolement de la fraction microsomale nécessite 3 centrifugations successives de l'homogénat total (figure 2) :

- une première centrifugation à 500g / 15 min. / 4 °C permet d'éliminer les débris cellulaires, les noyaux et les fragments de membrane (culot 500g). Le surnageant est constitué par le cytoplasme contenant les mitochondries, les microsomes, les peroxyosomes et les lysosomes.
- une deuxième centrifugation à 12000g / 30 min. / 4 °C du surnageant 500g permet une séparation de la fraction particulaire du cytoplasme. Le culot 12000g contient les mitochondries, les peroxyosomes et les lysosomes ; le surnageant 12000g (surnageant post-mitochondrial) contient les microsomes et les microperoxyosomes.
- une ultracentrifugation différentielle à 105000g / 60 min. / 4 °C du surnageant post-mitochondrial permet la sédimentation des culots microsomaux (culot 105000g), le surnageant 105000g renferme le cytosol pur.

Les culots microsomaux sont resuspendus dans le tampon d'homogénéisation et sont lavés par une seconde centrifugation à 105000g / 60 min. / 4 °C.

L'homogénéisation et toutes les étapes de préparation des microsomes ont été effectuées dans un tampon phosphate de potassium, 50 mM, pH 7.3, l'utilisation d'un tampon Tris-HCl, classiquement employé, est à éviter en raison de problèmes d'interférence lors de la mesure du MDA en CLHP.

3.1.2.4 Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé suivant la méthode de Bradford (1976). Il s'agit d'une méthode colorimétrique basée sur le suivi à 595 nm de la formation d'un complexe coloré entre les protéines contenues dans l'échantillon et un colorant : le bleu de Coomassie. L'intensité de la coloration bleue est proportionnelle à la quantité de protéines. La teneur en protéines est exprimée en se reportant à une gamme étalon effectuée dans les mêmes conditions à partir d'une solution de sérum albumine bovine.

3.2 Choix et optimisation des méthodes de dosage

3.2.1 Evaluation de la lipoperoxydation

3.2.1.1 Choix de la méthode

Nous avons choisi le dosage du MDA comme indice de lipoperoxydation. Ce sont les critères de pertinence, fiabilité (spécificité, sensibilité et reproductibilité) et faisabilité (rapidité) pour le screening qui ont orienté ce choix. Parmi les techniques existantes, nous avons retenu :

- la méthode spectrophotométrique décrite par Buege et Aust (1978) utilisant l'acide thiobarbiturique (TBA)
- une méthode basée sur la chromatographie liquide haute performance (CLHP)

3.2.1.2 Détermination du MDA par le test TBA

Le principe du test (cf. 2.10.1) consiste en une détermination spectrophotométrique de l'absorption à 535 nm du complexe MDA-TBA obtenu par condensation pendant 20 minutes à 80 °C du MDA avec la solution chlorhydrique d'acide thiobarbiturique.

Le protocole du test est le suivant :

- un volume d'échantillon (180 µl) est combiné à 360 µl d'acide trichloroacétique (TCA) à 10 % dans l'acide chlorhydrique (HCl) 0,25 N puis le mélange est centrifugé à 1500g / 5 min. afin de précipiter les protéines
- le surnageant est récupéré et mélangé à volume égal avec une solution d'acide thiobarbiturique à 1 % dans HCl 0,25 N
- le mélange réactionnel est incubé à 80 °C pendant 20 minutes
- après refroidissement sur la glace, l'ensemble est centrifugé à 1500g / 5 min.
- l'absorbance du surnageant est mesurée en microcuvettes à 535 nm contre un blanc contenant les réactifs sans l'échantillon.

La concentration en MDA est obtenue en se référant à une gamme d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions à partir d'une solution de MDA standard.

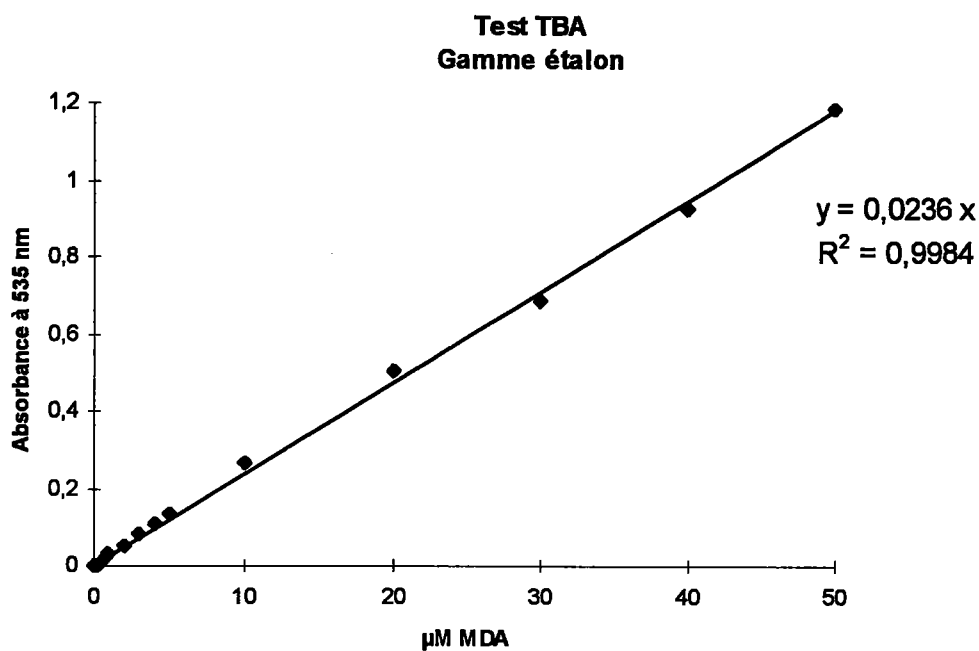


Figure 3 : Droite d'étalonnage obtenue par le test TBA sur des solutions de MDA standard de concentrations 0,1 à 50 µM.

Préparation de la solution MDA standard.

La solution standard de MDA est obtenue par hydrolyse acide de malonaldéhyde *bis*-diméthylacétal (Merck 805797). Une solution stock approximativement à 10 mM est préparée en additionnant 1 mM d'acétal à 100 ml d'acide sulfurique à 1 % (v/v). Après deux heures à température ambiante et à l'abri de la lumière, le volume de 5 ml de la solution est amené à 100 ml avec une solution d'acide sulfurique à 1 % afin d'obtenir une concentration d'environ 500 μ M. La concentration exacte en MDA est déterminée en mesurant l'absorbance à 245 nm en utilisant un coefficient d'extinction molaire de 13700 (Esterbauer *et al.*, 1984). Une solution à 50 μ M est utilisée pour la préparation des gammes étalons (dans un tampon phosphate de potassium, 50 mM, pH 7.6).

Les limites de validité du test TBA, la proportionnalité de l'absorption du complexe MDA-TBA en fonction de la concentration en MDA et les limites de sensibilité ont été étudiées. Le test a été réalisé sur des solutions de MDA standard de concentrations 0,1 à 50 μ M.

La proportionnalité des absorbances obtenues à 535 nm en fonction des concentrations MDA est respectée pour l'ensemble des concentrations testées comme le montre la droite d'étalonnage (figure 3). La limite de détection du test TBA est de l'ordre de 0,5 μ M.

3.2.1.3 Détermination du MDA par la méthode CLHP (Behrens et Madere, 1991)

3.2.1.3.a Protocole de la technique CLHP (Behrens et Madere, 1991)

Parmi les méthodes dosant le MDA basées sur la CLHP, la technique CLHP par appariement d'ions proposé par Behrens et Madere (1991) a été retenue pour sa sensibilité et sa spécificité.

Les conditions CLHP pour la séparation et la détection du MDA décrites par les auteurs sont les suivantes :

- colonne : phase reverse RPC18, 25 cm \times 4 mm (ID), 5 μ m équipée d'une précolonne RPC18, 1 cm \times 4 mm, 5 μ m
- phase mobile : tampon phosphate de sodium, 30 mM, pH 6.5 contenant 30 % d'éthanol et 1 mM de bromure de tétradécyltriméthylammonium
- débit : 1 ml/min.
- température : ambiante
- détection : 267 nm
- volume d'injection : 20 μ l

Le bromure de tétradécyltriméthylammonium est le réactif d'appariement d'ions, son rôle est d'éviter la polymérisation du MDA pendant sa séparation et sa détection (Bull et Marnett, 1985).

Le pourcentage d'éthanol de la phase mobile préconisé par les auteurs est de 30 %, néanmoins en raison de problèmes de surpression au niveau de la pompe du système CLHP, la proportion a été diminuée à 25 %.

Les étapes de préparation de l'échantillon avant séparation en CLHP sont les suivantes :

- déprotéinisation de l'échantillon par 50 % d'éthanol à 4 °C pendant 1 heure
- centrifugation à 30000g / 30 min. / 4 °C. Le surnageant 30000g (homogénat déprotéinisé) est dilué au ¼ dans un tampon phosphate de sodium, 30 mM, pH 5.5, contenant 25 % d'éthanol
- le surnageant dilué est purifié par passage sur une colonne amino-silice de 1 ml (Supelclean LC-NH₂, Supelco)
- un aliquot de 20 µl d'échantillon déprotéinisé et purifié est injecté en CLHP.

La quantité de MDA contenue dans les 20 µl injectés est déterminée par comparaison à une gamme étalon réalisée à partir d'une solution MDA standard préparée comme décrit précédemment. Les différentes concentrations de MDA standard sont obtenues par dilution d'une solution mère à 50 µM (dans le tampon phosphate de potassium, 50 mM, pH 7.6) par un tampon constitué d'un volume de tampon d'homogénéisation contenant 50 % d'éthanol et de 3 volumes de tampon phosphate de sodium, 30 mM, pH 5.5, contenant 25 % d'éthanol. Le tampon de dilution de la solution à 50 µM de MDA correspond ainsi au tampon dans lequel l'échantillon est dilué au moment de l'injection.

3.2.1.3.b Validation et optimisation de la technique de Behrens et Madere (1991)

La validation et l'optimisation de la technique nous ont conduit à tester les paramètres suivants :

- (1) la qualité de la séparation du MDA avec des standards de MDA et des échantillons biologiques en (i) vérifiant la proportionnalité de la réponse en aires des pics en fonction des concentrations en MDA sur des standards de MDA et des échantillons dopés en standards et en évaluant (ii) les limites de sensibilité
- (2) l'intérêt de la purification de l'échantillon sur la colonne amino-silice avant la séparation en CLHP
- (3) l'influence de la concentration du réactif d'appariement d'ions (0.5, 1.0, 1.5, 2 mM) dans la phase mobile sur la séparation du MDA.

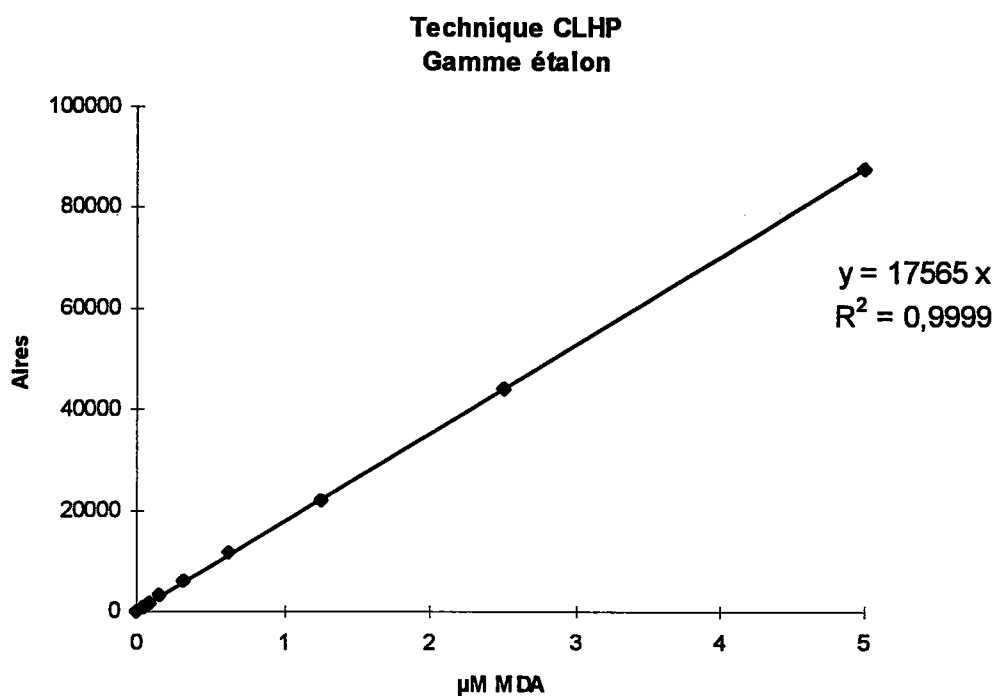


Figure 4 : Droite d'étalonnage obtenue par la technique CLHP sur des solutions de MDA standard de concentrations 0,04 µM à 5 µM (volume d'injection : 20 µl).

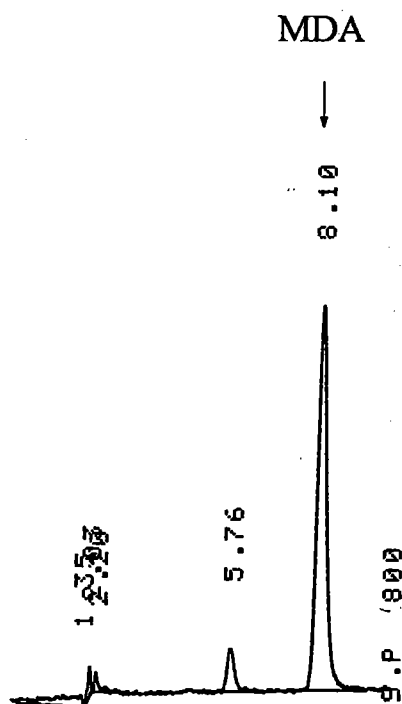


Figure 5 : Chromatogramme typique d'un standard de MDA (1,25 nM). Le volume d'injection est de 20 µl.

Ces optimisations ont été réalisées sur des homogénats de branchies et de glande digestive d'*Unio tumidus*.

(1) Etude des limites de sensibilité et d'un éventuel effet de la matrice biologique sur la séparation du MDA

La droite d'étalonnage (figure 4) montre que la réponse est linéaire pour les concentrations en MDA standard testées (de 0,04 à 5 μM) dont 20 μl ont été injectés en CLHP. La concentration en MDA la plus faible détectée avec une reproductibilité satisfaisante est de 0,8 pM dans les 20 μl injectés, soit une concentration de 0,04 μM en MDA standard. Un chromatogramme typique d'un standard est représenté sur la figure 5.

Afin de valider le protocole de préparation de l'échantillon et d'évaluer un éventuel effet de la matrice biologique, une gamme étalon a été réalisée dans les homogénats de branchies et de glande digestive par addition de standards de MDA de concentrations 0.3, 1.5 et 3 μM dès le début de la préparation des homogénats. Les pentes des droites étalons effectuées dans les échantillons biologiques se sont montrées comparables à celles obtenues pour les standards de MDA. De plus, les pourcentages de récupération du MDA pour les homogénats dopés ont été compris entre 80 et 107 %. Les résultats obtenus ont permis de conclure à l'absence d'effet de la matrice sur la linéarité de la réponse et ont validé le protocole de préparation des échantillons en terme de pourcentage de récupération des quantités de MDA ajoutées.

(2) Etape de purification sur colonne amino-silice

L'étape de purification sur colonne amino-silice ne semble pas être indispensable avant séparation en CLHP car peu de différences ont été observées quant au nombre de pics et à leurs aires respectives en comparant les profils chromatographiques obtenus pour des homogénats purifiés ou non. L'absence de purification n'entraîne pas l'apparition de pics supplémentaires et elle ne permet pas d'éliminer les pics tardifs éluant après le MDA, les temps d'analyse par échantillon restent de 30 minutes.

(3) Concentration du réactif d'appariement d'ions

Au cours d'essais sur des homogénats de glande digestive, la diminution de la concentration du réactif d'appariement d'ions de 1 mM à 0,5 mM a permis de résoudre un problème d'interférence dans la séparation du MDA : un pic parasite qui coélueait avec le pic de MDA a pu être ainsi séparé. Cette concentration de 0,5 mM a été retenue par la suite pour l'ensemble des échantillons.

Une série d'expériences a été réalisée avec une boucle d'injection de 100 μl au lieu de 20 μl , dans le but d'obtenir des hauteurs de pics supérieures et par conséquent de s'éloigner des limites de détection. Des composés interférents avec le MDA, qui n'étaient pas détectés pour un volume de 20 μl , sont apparus sur les chromatogrammes en injectant 100 μl d'échantillon.

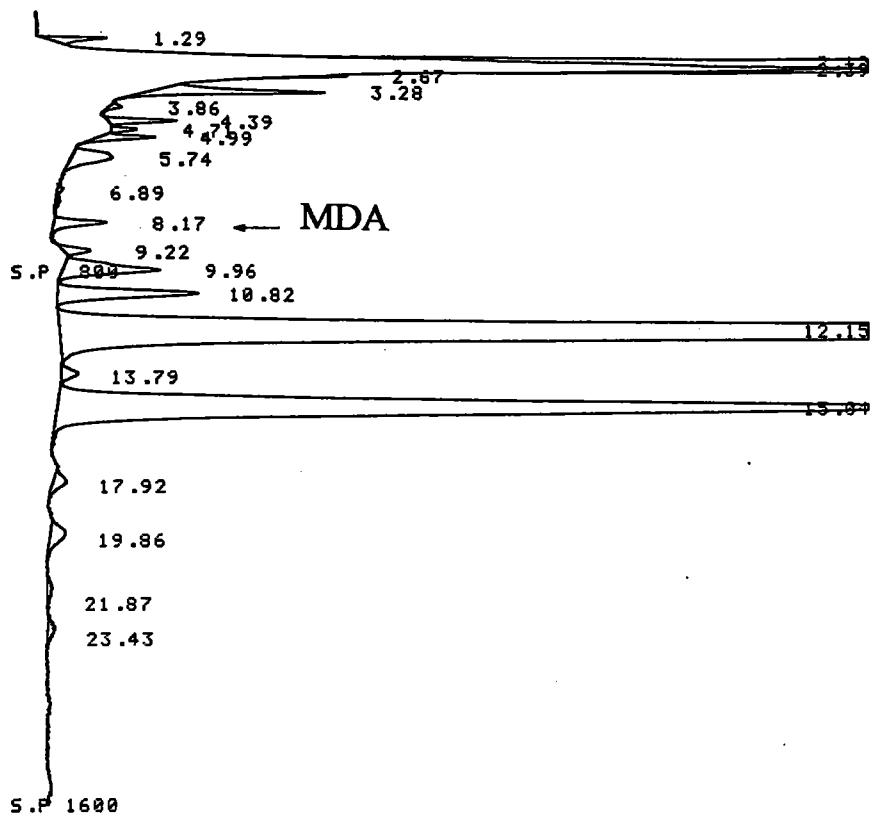


Figure 6 : Profil chromatographique obtenu après injection (20 μ l) d'un homogénat de glande digestive déprotéinéisé et dilué au 1/2.

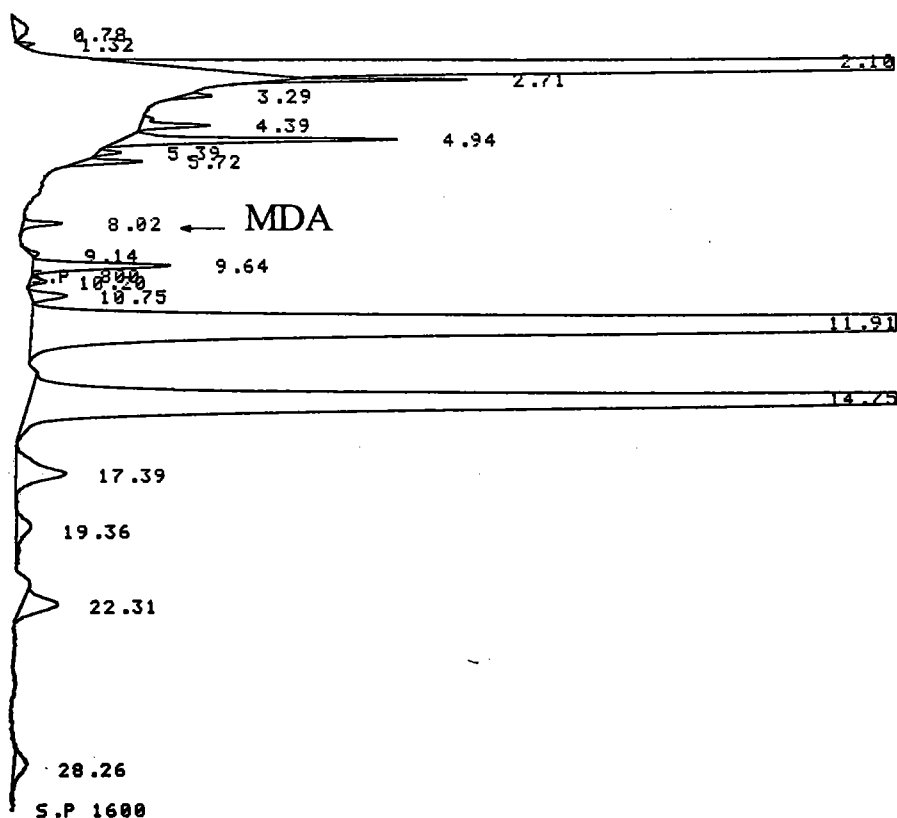


Figure 7 : Profil chromatographique obtenu après injection (20 μ l) d'un homogénat de branchie déprotéinéisé et dilué au 1/2.

MDA nM / mg protéine	Contrôles	tBOOH 0,75 mM	tBOOH 1,5 mM
Test TBA	1,94 ± 0,22*	2,76 ± 0,44	2,35 ± 0,04
	1,52 ± 0,10	1,98 ± 0,03	2,11 ± 0,05
CLHP	0,088 ± 0,013	0,159 ± 0,003	0,212 ± 0,003
	0,110 ± 0,004*	0,157 ± 0,004	0,180 ± 0,020

Tableau 1 : Induction de la lipoperoxydation *in vitro* sur fractions microsomales de branchies par l'exposition à 0,75 et 1,5 mM de tert-butylhydroperoxyde (tBOOH). Les suspensions ont été incubées pendant 1 heure en agitation (150 rpm) à 25 °C. Le symbole * signifie que l'intoxication a été réalisée sur la même suspension microsomale (n = 3).

Malheureusement ces problèmes de coélution n'ont pu être résolus, nous obligeant à revenir à un volume d'injection de 20 μ l.

En résumé les conditions retenues pour la séparation et la détection du MDA par CLHP sont les suivantes :

- déprotéinisation de l'échantillon (180 μ l) par l'éthanol (50 % pendant 1 heure à 4°C)
- centrifugation à 30000g / 30 min. / 4 °C. Le surnageant 30000g est dilué au 1/4 dans un tampon phosphate de sodium, 30 mM, pH 5.5, contenant 25 % d'éthanol. Il est possible de passer l'échantillon dilué au 1/2 si les profils ne sont pas trop chargés
- injection d'un aliquot de 20 μ l d'échantillon en CLHP.

Le MDA est élué par une phase mobile composée d'un tampon phosphate de sodium, 30 mM, pH 6.5, contenant 25 % d'éthanol et 0,5 mM de bromure de tétradécyltriméthylammonium, à un débit de 1 ml / min. et il est détecté à 267 nm. Les figures 6 et 7 représentent les profils chromatographiques obtenus pour un homogénat de glande digestive et de branchies dans ces conditions.

3.2.1.4 Essais de lipoperoxydation *in vitro* sur fractions microsomales

Des intoxications *in vitro* par le *tert*-butylhydroperoxyde (tBOOH), classiquement utilisé pour stimuler la lipoperoxydation, ont été effectuées afin de valider ces 2 techniques : nous avons cherché à vérifier qu'elles mettaient bien en évidence une augmentation des taux de malonaldéhyde.

Les essais ont été effectués sur des suspensions microsomales de branchies. La lipoperoxydation a été stimulée par le tBOOH à des concentrations finales de 0,75 mM et 1,5 mM. Les suspensions microsomales ont été incubées sous agitation (150 rpm) à 25 °C pendant 45 minutes. La réaction a été stoppée en plaçant les tubes sur glace et les taux de MDA ont été dosés simultanément par le test TBA et par la technique CLHP.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1. Une stimulation de la lipoperoxydation a été observée pour les deux méthodes : des taux de MDA plus élevés ont été mesurés dans les microsomes incubés en présence de tBOOH par le test TBA ($\times 1,2$ à $1,4$) et la technique CLHP ($\times 1,4$ à $2,4$) par rapport aux contrôles. Un effet dose-réponse a été observé uniquement lorsque le MDA a été quantifié par CLHP : les contenus sont augmentés en moyenne de $1,6$ à 2 aux concentrations respectives de 0,75 et 1,5 mM de tBOOH.

Les résultats montrent de plus que les valeurs de MDA pour les contrôles sont en moyenne 18 fois plus fortes pour le test TBA par rapport à la CLHP. Cette différence peut être expliquée par les interférences liées à la méthode au TBA.

*Ces essais *in vitro* ont par conséquent confirmé la capacité de ces deux méthodes de dosage du MDA à mettre en évidence une induction de la lipoperoxydation dans des échantillons biologiques soumis à des conditions de stress oxydant.*

3.2.2 Optimisation de la méthode de détermination de la 8OHdG

3.2.2.1 Choix de la méthode de détermination

La technique CLHP avec détection électrochimique (CLHP-EC) a été choisie en raison de sa sensibilité, de sa spécificité et de sa facilité de mise en œuvre parmi les autres méthodes disponibles dans la littérature pour la mesure de la 8OHdG. La méthode de Shigenaga *et al.* (1994) a été retenue car les étapes de préparation des échantillons sont particulièrement bien décrites.

Le principe de la CLHP-EC consiste en un isolement de l'ADN à partir des tissus, suivi par une hydrolyse enzymatique de l'ADN extrait en nucléosides correspondants. La 8OHdG est séparée par CLHP et détectée au moyen d'un détecteur électrochimique. Les niveaux de 8OHdG sont exprimés par rapport aux taux de déoxyguanosine non modifié quantifiés simultanément par détection UV.

3.2.2.2 Protocole de la méthode de Shigenaga *et al.* (1994)

Les étapes d'isolement et d'hydrolyse de l'ADN ainsi que les conditions chromatographiques pour la séparation et la détection de la 8OHdG décrites par Shigenaga *et al.* (1994) sont détaillées ci-dessous.

L'ADN est isolé d'après la méthode décrite par Gupta (1984) avec modifications. Les étapes d'isolement et d'hydrolyse de l'ADN sont les suivantes :

- 50 à 200 mg de tissus sont homogénéisés sur glace ou à 4 °C dans 1 ml de tampon d'homogénéisation (0,1 M NaCl, 30 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoéthanol, 0,5 % (v/v) Triton X-100) par un homogénéisateur verre-teflon (6 passages à 200 rpm). Les échantillons sont centrifugés à 1000g / 10 min. / 4 °C pour sédimenter les noyaux. Le culot est resuspendu et réhomogénéisé dans 1 ml de tampon d'extraction (0,1 M Tris pH 8, 0,1 M NaCl, 20 mM EDTA) et recentrifugé à 1000g / 10 min. / 4 °C. Le culot lavé est resuspendu dans 300 µl de tampon d'extraction à l'aide d'une pipette de précision P200 munie d'un cône à large orifice
- l'ARN est digéré par incubation 1 heure à 50 °C des échantillons avec 20 µl d'une solution contenant 50 U/ml RNase A (Boeringer Mannheim) et 100 U/ml de RNase T1 (Boeringer Mannheim). Les protéines sont digérées par incubation pendant 1 heure à 50 °C avec un mélange de 40 µl de sarkosyl à 10 % et 40 µl d'une solution de protéinase K ou pronase (Boeringer Mannheim) à 5 mg/ml préparée dans 10 mM Tris / 1 mM EDTA, pH 7.4
- 400 µl de phénol de haute pureté (Clonetech) saturé par le tampon d'extraction décrit précédemment, sont ajoutés et l'ensemble est agité vigoureusement au vortex pendant 1 minute. L'échantillon est centrifugé à température ambiante pour séparer les 2 phases (12000g / 10 min.), la phase aqueuse supérieure est transférée dans un nouvel tube Eppendorf, 400 µl de phénol saturé et 400 µl de Sevag (chloroforme : alcool isoamyl (24 : 1), v/v) y sont

ajoutés. Le tout est passé au vortex pendant 1 minute et centrifugé à 12000g / 10 min. à température ambiante. Après avoir transféré la phase aqueuse supérieure dans un nouveau tube, 400 µl de Sevag sont ajoutés pour extraire les traces de phénol résiduel de la phase aqueuse et les phases sont séparées par une nouvelle centrifugation comme décrit ci - dessus

- après avoir récupéré la phase aqueuse dans un tube Eppendorf froid, l'ADN est précipité par ajout de 40 µl d'acétate de sodium 3 M, pH 5 et 800 µl d'éthanol froid. L'ADN précipité peut être immédiatement centrifugé à 12000g / 15 min / 4 °C pour sédimenter l'ADN et rincé avec 1 ml d'éthanol à 70 % (v/v) (froid), ou placé à - 20 °C pendant une nuit pour faciliter une précipitation supplémentaire, en particulier si la récupération de l'ADN est faible. Après lavage du culot d'ADN par l'éthanol à 70 %, l'échantillon est centrifugé à 12000g / 15 min. / 4 °C et l'éthanol est éliminé. Les traces d'éthanol sont supprimées du culot d'ADN par centrifugation sous vide pendant 10-20 min. ou alternativement par un séchage à l'air d'environ 30 min.

- 20-500 µg d'ADN sont dissous dans 200 µl d'une solution 1 mM déféroxamine mésylate (DFAM) / 20 mM acétate de sodium pH 5. L'ADN est hydrolysé en nucléotides par incubation 10 min. à 65 °C avec 4 µl d'une suspension à 3,3 mg/ml de nucléase P1 (Boeringer Mannheim) préparée dans 20 mM d'acétate de sodium pH 5. Le pH du mélange résultant est ajusté à pH 8.5 par ajout de 20 µl de tampon Tris-HCl 1 M, pH 8.5 et hydrolysé en nucléosides correspondants par incubation avec 4 µl d'une solution à 1 U/µl de phosphatase alcaline (Boeringer Mannheim) pendant 1 heure à 37 °C. Après digestion par la phosphatase alcaline, le pH de l'hydrolysat d'ADN est à nouveau ajusté par ajout de 20 µl d'acétate de sodium 3 M, pH 5, suivi par l'addition de 20 µl d'une solution contenant 50 mM EDTA / 10 mM DFAM préparée dans l'eau distillée. Les hydrolysats sont transférés dans un système de filtration Ultra-Free 30000-Da cutoff Millipore et centrifugés à 10000g / 15-30 min. / 4 °C. Les filtrats sont ensuite injectés en CLHP.

Les conditions chromatographiques pour la séparation et la détection de la 8OHdG dans les hydrolysats d'ADN décrites par Shigenaga *et al.* (1994) sont les suivantes :

- colonne : Supelco LC-18 DB Supelcosil 3 µm, 15 cm × 4,6 mm équipée d'une précolonne LC-18 DB

- phase mobile : tampon phosphate KH_2PO_4 , 50 mM, pH 5.5 contenant soit 5 % de méthanol en séparation isocratique, soit 2,5 à 6,25 % en gradient linéaire. La séparation isocratique est suffisante pour des échantillons contenant plus de 20 µg d'ADN et a été utilisée dans notre cas.

- débit : 1 ml/min.

- température : ambiante

- détection : détecteur UV : 260 ou 290 nm pour le déoxyguanosine non modifié (dG)

détecteur électrochimique : Coulochem modèle 5100 équipé d'une cellule analytique 5011 pour la 8OHdG.

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

Voltagrammes hydrodynamiques

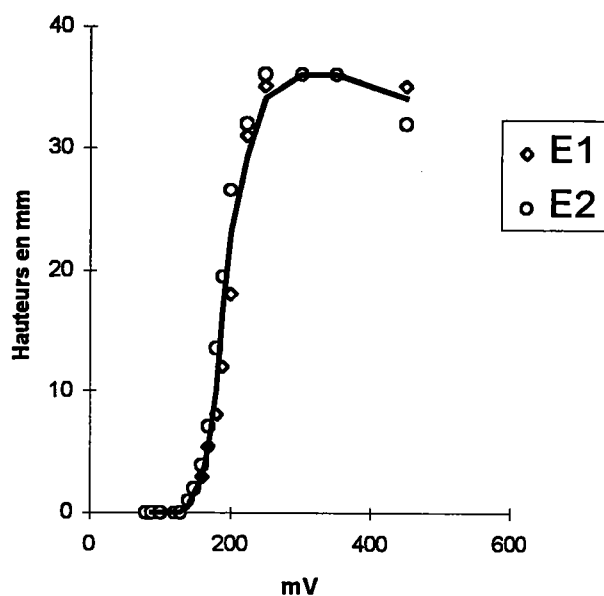


Figure 8 : Voltagrammes hydrodynamiques réalisés sur les électrodes E₁ et E₂ par injections répétées de 20 μ l d'une solution 8OHdG standard à 160 nM. Les hauteurs des pics obtenus sont indiquées en mm.

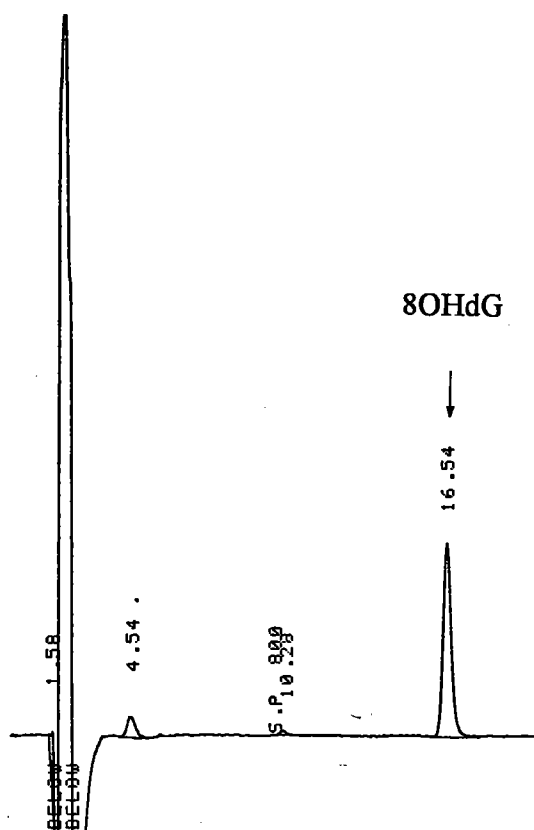


Figure 9 : Chromatogramme typique d'un standard de 8OHdG (80 nM). Les potentiels des électrodes E₁ et E₂ sont ajustés à 150 mV et 350 mV respectivement. La sensibilité est fixée à 50 nA. Le volume d'injection est de 20 μ l.

3.2.2.3 Validation et optimisation de la méthode de Shigenana *et al.* (1994)

L'application de cette technique à nos échantillons biologiques et son optimisation nous ont conduit à tester les paramètres suivants :

- la qualité de la séparation chromatographique de la 8OHdG pour des standards et des échantillons
- les conditions d'isolement de l'ADN (homogénéisation des tissus, digestion par les RNases et la protéinase K, extractions phénoliques, précipitation de l'ADN)
- les conditions d'hydrolyse de l'ADN (nucléase P1, phosphatase alcaline)
- la filtration des hydrolysats d'ADN sur Cutoff avant séparation CLHP
- l'utilisation de déféroxamine mésylate (DFAM), chelateur des ions de métaux de transition, au cours de la préparation des échantillons
- le fait d'isoler, de sécher et d'hydrolyser l'ADN en conditions anaérobies.

3.2.2.3a. Séparation chromatographique et détection de la 8OHdG

Le détecteur utilisé pour le dosage de la 8OHdG est un détecteur coulométrique ESA Coulochem modèle 5200A équipé d'une cellule de conditionnement (modèle 5021) et d'une cellule de mesure 5010 comprenant 2 électrodes E_1 et E_2 . Ces 2 électrodes de travail sont identiques et fonctionnent indépendamment l'une de l'autre. Les 2 électrodes ont été utilisées en mode Screen : le potentiel de E_1 a été ajusté de façon à ce que l'électrode oxyde les composés électroactifs indésirables ou interférents éventuels présents dans l'échantillon mais pas la 8OHdG ; le potentiel de l'électrode E_2 a été fixé à une valeur supérieure pour oxyder la 8OHdG. Ces conditions permettent de maximaliser la sensibilité et la sélectivité de la détection électrochimique. La cellule de conditionnement est placée entre la colonne et la cellule de mesure, elle est utilisée comme une troisième électrode ajoutant une extra sélectivité à l'analyse. Elle permet de traiter l'effluent chromatographique avant qu'il n'atteigne la cellule de mesure : elle élimine en les oxydant les impuretés électroactives présentes dans la phase mobile diminuant ainsi le courant de base et réduisant le bruit de fond.

Une série d'essais sur des standards de 8OHdG (gracieusement fournie par Dr. T. Douki, Scib. Lab. Acides Nucl., CEA, Grenoble) a été réalisée afin de :

- définir les potentiels d'oxydation optimaux pour la détection de la 8OHdG en établissant un voltogramme hydrodynamique
- vérifier la proportionnalité des réponses en aires de pics en fonction des concentrations en 8OHdG injectées.

Gamme étalon 8OHdG

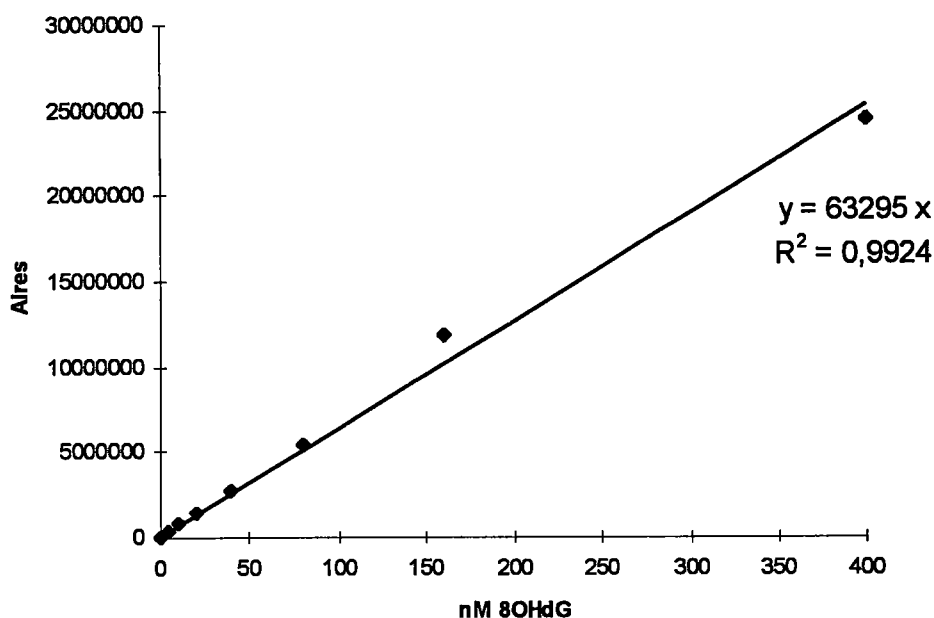


Figure 10 : Droite d'étalonnage obtenue par injection de 20 μ l de solutions de 8OHdG standard de concentrations 1 à 160 nM. Les potentiels des électrodes E_1 et E_2 sont ajustés respectivement à 150 mV et 350 mV. La sensibilité sur les 2 électrodes est fixée à 50 nA.

Gamme étalon dG

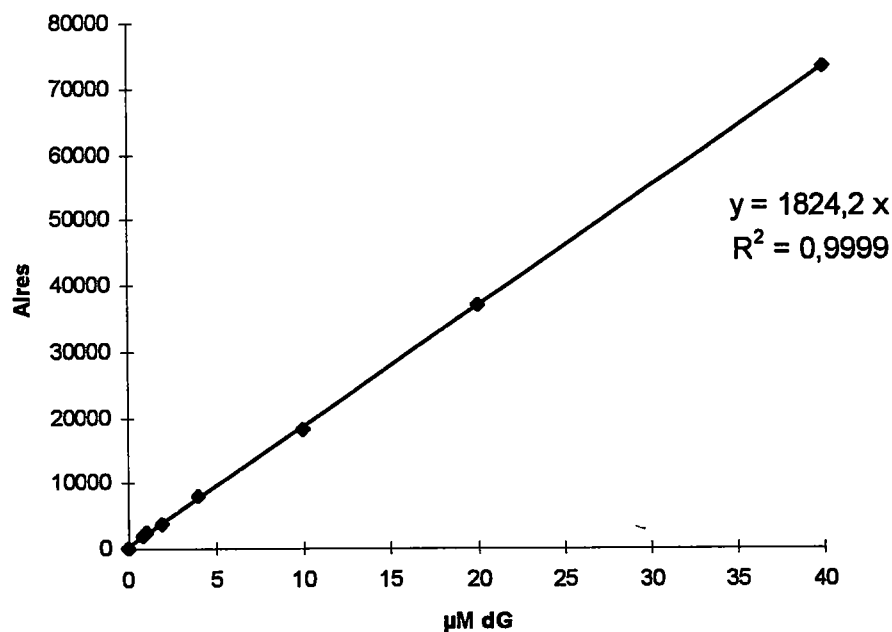


Figure 11 : Droite d'étalonnage obtenue par injection de 20 μ l de solutions dG standard de concentrations 0,75 à 40 μ M. La détection s'effectue en UV à 290 nm.

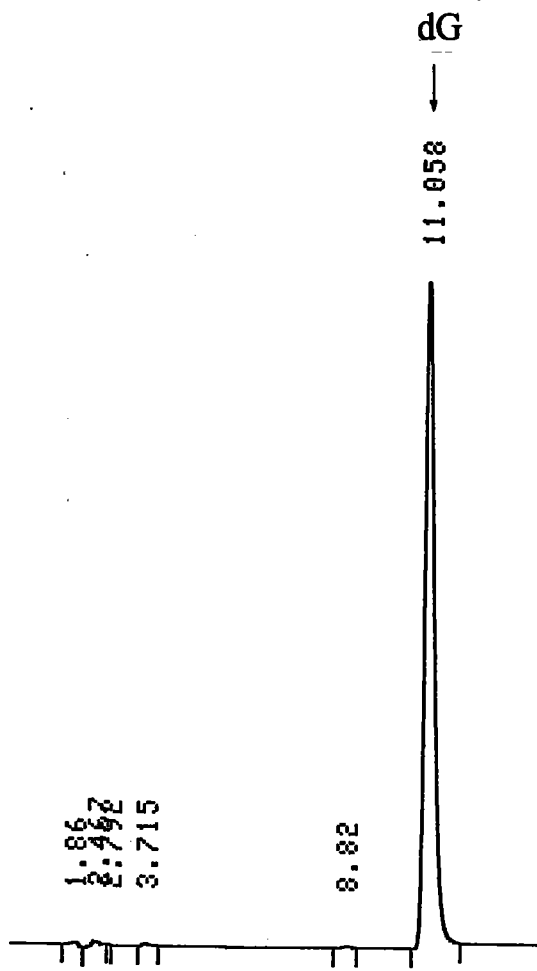


Figure 12 : Chromatogramme typique d'un standard de dG (20 μ M). Le volume d'injection est de 20 μ l.

- Un voltogramme hydrodynamique sur l'électrode E_2 a été obtenu par injections répétées de 20 μl d'une solution de 8OHdG de concentration constante (160 nM) en augmentant graduellement les potentiels appliqués à l'électrode E_2 (100 mV à 450 mV), l'électrode E_1 placée à un potentiel de -50 mV ne contribue pas l'oxydation (figure 8). Un voltogramme a été réalisé également sur E_1 pour vérifier que l'électrode E_1 oxydait la 8OHdG de manière identique à l'électrode E_2 (figure 8).

Les courbes montrent que l'oxydation de la 8OHdG commence aux alentours de 125 mV, puis elle augmente rapidement atteignant un plateau à partir de 300 mV. Le potentiel au point d'inflexion est de 200 mV.

L'établissement des voltogrammes nous a permis de fixer les potentiels appliqués aux deux électrodes pour la mesure de la 8OHdG : un potentiel de 150 mV est appliqué à l'électrode E_1 , l'électrode E_2 sur laquelle est dosée la 8OHdG est soumise à un potentiel de 350 mV, correspondant au potentiel maximal d'oxydation. Le potentiel appliqué à la cellule de conditionnement est de 100 mV.

- Une gamme d'étalonnage a été réalisée dans ces conditions pour contrôler la stabilité du signal en électrochimie et vérifier la linéarité de la réponse en aires en fonction des quantités de 8OHdG standard injectées (20 μl).

Le pic 8OHdG élue aux alentours de 16 min. selon la température ambiante (figure 9). La droite représentée sur la figure 10 montre que la proportionnalité des aires des pics est respectée pour des concentrations de 1 à 160 nM de solutions de 8OHdG standard. Des gammes d'étalonnage effectuées sur plusieurs jours ont confirmé la reproductibilité et la répétabilité du signal électrochimique. La sensibilité a été fixée à 50 nA sur chacune des deux électrodes, et les courants résultant du bruit de fond sont respectivement de l'ordre de 14 nA et 30 nA sur E_1 et E_2 . La limite de détection dans ces conditions est de 1,25 nM de 8OHdG standard soit 25 fM pour 20 μl injectés.

Parallèlement, des gammes d'étalonnage du déoxyribonucléotide non modifié (dG) ont été faites en UV à 290 nm. Des solutions de dG standards de concentrations de 0,75 à 40 μM ont été injectées en CLHP (20 μl).

Les aires des pics obtenues sont proportionnelles aux taux de dG pour toutes les concentrations testées (figure 11). Le temps de rétention pour un standard dG est environ de 11 min (figure 12). La concentration la plus faible mesurée est de 0,2 μM , soit 4 pM dans 20 μl injectés.

Les taux de 8OHdG sont exprimés en valeurs relatives par rapport au contenu en déoxynucléoside non modifié (8OHdG/10⁵ dG).

	6 passages		2 passages	
	1000g / 10 min.	5000g / 10 min.	1000g / 10 min.	5000g / 10 min.
mg de tissu	181 ± 0	181 ± 0	192 ± 0	192 ± 0
µg ADN	40 ± 0	43 ± 0	136 ± 2	125 ± 12
A ₂₆₀ / A ₂₈₀	1,7	1,7	1,7	1,7
8OHdG/10 ⁵ dG	2,6 ± 0,2	2,4 ± 0,5	2,8 ± 0,3	3,1 ± 0,4

Tableau 2 : Comparaison de différents protocoles d'homogénéisation de la glande digestive avant isolement de l'ADN. Les tissus ont été homogénéisés respectivement par 6 et 2 passages de potter motorisé (n = 3). Le volume d'injection pour la mesure de la 8OHdG est de 100 µl.

	2 passages motorisés	2 coups de potter Elvehjem
mg de tissu	153 ± 0	132 ± 0
µg ADN	80 ± 27	81 ± 19
A ₂₆₀ / A ₂₈₀	1,7	1,7
8OHdG/10 ⁵ dG	4,9 ± 0,2	4,3 ± 0,5

Tableau 3 : Comparaison entre une homogénéisation motorisée (2 passages) et manuelle (2 coups) de la glande digestive avant isolement de l'ADN (n = 3). Le volume d'injection pour la mesure de la 8OHdG est de 100 µl.

	6 passages motorisés	6 coups de potter Elvehjem
mg de tissu	110 ± 0	164 ± 0
µg ADN	57 ± 3	81 ± 2
A ₂₆₀ / A ₂₈₀	1,8 ± 0	1,8 ± 0
8OHdG/10 ⁵ dG	36,5 ± 1,6	31,9 ± 3,5

Tableau 4 : Comparaison entre une homogénéisation motorisée (6 passages) et manuelle (6 coups) du tissu branchial avant isolement de l'ADN (n = 3). Le volume d'injection pour la mesure de la 8OHdG est de 20 µl.

3.2.2.3b Optimisation des étapes d'isolement de l'ADN

Nous avons cherché à vérifier que les conditions d'isolement de l'ADN décrites par Shigenaga *et al.* (1994) étaient optimales pour les glandes digestives et les branchies d'*Unio tumidus*.

Les étapes d'homogénéisation des tissus, de digestion de l'ARN et des protéines, et d'extractions phénoliques ont été successivement testées.

Des essais préliminaires sur tissu branchial nous ont montré que le fait de centrifuger l'ADN après l'avoir laissé précipiter une nuit à - 20 °C dans l'éthanol, permettait de récupérer 4 fois plus d'ADN par rapport à la centrifugation immédiate après ajout de l'éthanol. Nous avons par conséquent opéré systématiquement de cette manière pour l'ensemble des essais sur branchies et glandes digestives.

- Homogénéisation des tissus.

Des rendements d'ADN variables et en moyenne trois fois plus faibles pour les glandes digestives comparé aux branchies nous ont amené à reconsidérer l'étape d'homogénéisation. La glande digestive étant un tissu moins structuré que les branchies, il est possible que l'homogénéisation des tissus soit trop forte et que la centrifugation à 1000g / 10 min. ne soit plus suffisante pour sédimenter les noyaux.

Différents protocoles d'homogénéisation ont été comparés :

- 2 passages au lieu de 6 passages avec le Potter motorisé (200 rpm)
- 2 coups de Potter Elvehjem (homogénéisation manuelle douce) au lieu 2 passages avec le Potter motorisé.

Les résultats reportés dans le tableau 2 montrent qu'une homogénéisation par 2 passages, comparé à 6 passages, avec le Potter motorisé permet de multiplier par 3 les rendements d'ADN. On estime que le rapport A_{260}/A_{280} pour un ADN pur se situe aux alentours de 1,8. Les rapports A_{260}/A_{280} sont de l'ordre de 1,7 pour les deux protocoles et les taux de 8OHdG sont comparables. Une centrifugation à 5000g / 10 min. au lieu de 1000g / 10 min. ne modifie pas significativement les quantités d'ADN récupérées.

Les rendements plus faibles pour les glandes digestives étaient par conséquent effectivement liés à une perte de matériel au niveau de la sédimentation des culots.

L'homogénéisation manuelle avec le Potter Elvehjem fournit des rendements comparables à ceux obtenus avec le Potter motorisé (2 passages) (tableau 3). Les concentrations de 8OHdG n'ont pas été modifiées par les différents protocoles d'homogénéisation. Le Potter Elvehjem est également utilisé dans la préparation des homogénats de tissus pour la mesure du MDA, et c'est cette homogénéisation manuelle qui a été appliquée dans la suite des essais.

RNases A + T1	20 µl / 1h	40 µl / 1h	20 µl / 2h30	40 µl / 2h30
mg de tissu	127 ± 0	127 ± 0	127 ± 0	127 ± 0
µg ADN	112 ± 1	108 ± 1	114 ± 4	116 ± 1
A ₂₆₀ / A ₂₈₀	1,7 ± 0	1,7 ± 0	1,7 ± 0	1,7 ± 0
8OHdG/10 ⁵ dG	4,4 ± 0,3	4,6 ± 0,3	4,1 ± 0,3	5,1 ± 0

Tableau 5 : Différentes modalités pour la digestion de l'ARN dans les homogénats de glande digestive. La température d'incubation est de 50 °C pour l'ensemble des modalités. Le volume d'injection pour la mesure de la 8OHdG est de 20 µl.

RNases A + T1 protéinase K	20 µl / 1h	40 µl / 1h	20 µl / 2h30	40 µl / 2h30	20 µl / 2h30 40 µl / 2h30
mg de tissu	150 ± 0	150 ± 0	150 ± 0	150 ± 0	150 ± 0
µg ADN	68 ± 10	71 ± 2	67 ± 1	61 ± 0	51 ± 1
A ₂₆₀ / A ₂₈₀	1,7 ± 0	1,7 ± 0	1,7 ± 0	1,7 ± 0	1,7 ± 0
8OHdG/10 ⁵ dG	39,6 ± 1,8	37,7 ± 2,0	50,4 ± 0,3	45,9 ± 2,8	51,2 ± 1,7

Tableau 6 : Différentes modalités pour la digestion de l'ARN dans les homogénats de branchies. La température d'incubation est de 50 °C pour l'ensemble des modalités. Le volume d'injection pour la mesure de la 8OHdG est de 20 µl.

Dans le but d'uniformiser les protocoles de préparation des échantillons pour les deux tissus étudiés, une comparaison entre une homogénéisation motorisée (6 passages) et manuelle (6 coups de Potter Elvehjem) a été effectuée pour les branchies.

Les résultats sont regroupés dans le tableau 4 et confirment que la quantité et la pureté de l'ADN isolé sont similaires dans les deux cas. Les niveaux de base de 8OHdG dans les tissus ne sont pas affectés par la différence de préparation des homogénats.

En résumé, le protocole d'homogénéisation retenu est le suivant :

- 2 coups de Potter Elvehjem pour les glandes digestives
- 6 coups de Potter Elvehjem pour les branchies

- Digestion de l'ARN et des protéines.

- La digestion de l'ARN et des protéines se fait respectivement par incubation à 50 °C avec 20 µl de RNases A (50 U/ml) et T1 (100 U/ml) et avec 40 µl de protéinase K (5mg/ml) en présence de 40 µl de sarkosyl à 10 %. Une série d'expériences a consisté à modifier les volumes d'enzymes ajoutés et les temps d'incubation afin d'optimiser les rendements et la pureté de l'ADN isolé.

Remarque : la solution de RNase A (50 U/ml) a été préalablement bouillie pendant 15 minutes afin de dénaturer les DNases qui peuvent être présentes en tant que contaminants.

Les homogénats de branchies et de glande digestive ont été incubés en présence de 20 µl ou 40 µl de RNases pendant 1 heure ou 2 heures 30 à 50 °C, les conditions pour la digestion des protéines restant inchangées.

Les résultats montrent que les rendements et la pureté de l'ADN isolé sont comparables pour les deux tissus dans l'ensemble des conditions testées (tableaux 5 et 6). Les taux de 8OHdG dans les glandes digestives sont équivalentes quelque soit le volume de RNases ajouté et le temps d'incubation. Pour les branchies, par contre, l'incubation prolongée (2 h 30) avec les RNases A et T1 (20 ou 40 µl) a tendance à augmenter les niveaux de bases de 8OHdG dans les échantillons.

Dans un second temps, les modalités pour la digestion des protéines ont été modifiées : 40 ou 80 µl de protéinase K à 5 mg/ml ont été ajoutés aux homogénats après digestion de l'ARN, et les échantillons ont été incubés 1 heure, 2 heures 30 ou 1 nuit complète à 50 °C.

Les quantités d'ADN récupérées sont comparables que les échantillons aient été incubés 1 ou 2 heures 30 avec 40 ou 80 µl de protéinase K pour les glandes digestives et les branchies. Les

Protéinase K	40 µl / 1h	80 µl / 1h	40 µl / 2h30	80 µl / 2h30	40 µl / 1 nuit
mg de tissu	132 ± 0 150 ± 0	132 ± 0 —	132 ± 0 —	132 ± 0 —	— 150 ± 0
µg ADN	74 ± 5 68 ± 10	52 ± 1 —	62 ± 1 —	54 ± 1 —	— 47 ± 1
A ₂₆₀ / A ₂₈₀	1,7 1,7	1,7 —	1,7 —	1,7 —	— 1,7
8OHdG/10 ⁵ dG	44,1 ± 1,2 39,6 ± 1,8	42,4 ± 1,7 —	48,4 ± 2,2 —	44,8 ± 3,0 —	— 67,1 ± 1,4

Tableau 7 : Différentes modalités pour la digestion des protéines dans les homogénats de branchies. La température d'incubation est de 50°C pour l'ensemble des modalités. Le volume d'injection pour la mesure de la 8OHdG est de 50 µl.

Protéinase K	40 µl / 1h	80 µl / 1h	40 µl / 2h30	80 µl / 2h30	40 µl / 1 nuit
mg de tissu	303 ± 0	303 ± 0	303 ± 0	303 ± 0	303 ± 0
µg ADN	91 ± 2	86 ± 12	85 ± 7	85 ± 4	73 ± 3
A ₂₆₀ / A ₂₈₀	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
8OHdG/10 ⁵ dG	3,0 ± 0,3	2,4 ± 0,2	2,7 ± 0,1	2,1 ± 0,2	5,6 ± 0,4

Tableau 8 : Différentes modalités pour la digestion des protéines dans les homogénats de glande digestive. La température d'incubation de 50 °C pour l'ensemble des modalités. Le volume d'injection pour la mesure de la 8OHdG est de 100 µl. (Pour ces essais, la glande digestive a été homogénéisée par 6 passages de potter motorisé)

rapports A_{260}/A_{280} sont de l'ordre de 1,7 indépendamment du traitement pour les deux tissus (tableaux 7 et 8). Les taux de 8OHdG mesurés sont similaires pour une incubation de 1 heure ou 2 heures 30, par contre le fait de prolonger la digestion pendant une nuit, double les concentrations de 8OHdG dans les glandes digestives et les branchies, sans pour autant améliorer les rendements ou la pureté de l'ADN.

En conclusion, les essais réalisés dans le but de tester l'efficacité du protocole d'isolement de l'ADN, ont indiqué que les concentrations des solutions de RNases et de protéinase K, ainsi que les temps d'incubation décrites par Shigenaga et al. (1994) sont optimaux pour nos échantillons biologiques. Il est préférable d'éviter une digestion prolongée par la protéinase K des homogénats puisqu'elle induit une augmentation des taux de 8OHdG à la fois dans les glandes digestives et les branchies.

- Extractions phénoliques.

Des travaux contradictoires ont été publiés sur l'induction de la formation de la 8OHdG par l'utilisation du phénol pour l'extraction des protéines pendant l'isolement de l'ADN. Claycamp (1992), par exemple, a reporté que le phénol sensibilisait l'ADN à la formation de 8OHdG. Shigenaga *et al.* (1994) ont précisé qu'aucune augmentation des taux de 8OHdG liée à l'extraction par le phénol n'a été observée. Des essais ont été réalisés par les auteurs comparant les niveaux de 8OHdG obtenus après extraction par du phénol frais de haute pureté, du vieux phénol, ou du Sevag comme substitut : ils n'ont révélé essentiellement aucune différence dans les taux de 8OHdG mesurés.

Nous avons cependant comparé la technique utilisée jusqu'à présent à une procédure d'extraction modifiée utilisant l'hydroxytoluène butylé (BHT) comme antioxydant (Devanaboyina et Gupta, 1996).

Les étapes d'extraction phénolique décrites par Devanaboyina et Gupta (1996) sont les suivantes :

- une solution de BHT à une concentration finale de 30 mM est ajoutée aux échantillons juste avant les extractions phénoliques
- les échantillons sont extraits une fois à volume égal avec un mélange phénol:Sevag (chloroforme:alcool isoamyl, 24:1) (1:1). Le phénol est distillé et saturé par un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8. Les phases aqueuses sont récupérées par centrifugation et extraites deux fois par 3 volumes de Sevag.

	Branchies		Glande digestive		
	phénol normal	BHT 30 mM	phénol normal	BHT 30 mM	BHT 15 mM
mg de tissu	150 ± 0	150 ± 0	154 ± 0	173 ± 0	-
	144 ± 0	144 ± 0	156 ± 0	156 ± 0	156 ± 0
µg ADN	99 ± 3	58 ± 9	197 ± 29	168 ± 8	-
	78 ± 5	53 ± 5	180 ± 4	199 ± 13	184 ± 8
A ₂₆₀ / A ₂₈₀	1,8 ± 0	1,7 ± 0	1,7 ± 0	1,7 ± 0	-
	1,8 ± 0	1,8 ± 0	1,7 ± 0	1,7 ± 0	1,7 ± 0
8OHdG/10 ⁵ dG	34,9 ± 1,5	37,5 ± 3,2	3,7 ± 0,3	7,3 ± 0,2	-
	32,2 ± 0,5	37,3 ± 1,8	3,4 ± 0,2	4,8 ± 0,1	5,1 ± 0,4

Tableau 9 : Comparaison des protocoles d'extraction phénolique de Shigenaga *et al.* (1994) (phénol normal) et de Desavaboyina et Gupta (1996) (BHT) dans les tissus de branchies et de glande digestive. Les volumes d'injection pour la mesure de la 8OHdG sont de 20 µl et 100 µl respectivement pour les branchies et les glandes digestives.

Cette procédure est censée minimiser la formation de 8OHdG car elle élimine l'extraction initiale par le phénol seul et elle ajoute un antioxydant avant de commencer les extractions.

Les résultats présentés dans le tableau 9, indiquent que les taux de 8OHdG restent en général inchangés dans les branchies que l'ADN soit extrait selon le protocole de Shigenaga et al. (1994) ou suivant les modifications apportées par Devanaboyina et Gupta (1996). Le protocole de ces derniers semble par contre affecter les rendements d'ADN car ils sont en moyenne 1,6 fois plus faibles. La pureté de l'ADN est équivalente pour les deux protocoles avec des rapports A_{260}/A_{280} compris entre 1,7 et 1,8.

Quant aux glandes digestives et de manière surprenante, les concentrations de 8OHdG mesurées sont systématiquement plus fortes ($\times 1,4$ à $2,7$) en suivant le protocole d'extraction de Devanaboyina et Gupta (1996). Les modifications apportées par ces auteurs - extraction initiale par phénol:Sevag au lieu de phénol seul et présence d'un antioxydant - stimulent plutôt qu'elles ne minimisent la production de 8OHdG dans nos échantillons biologiques. Le fait de diminuer la concentration finale de BHT à 15 mM n'empêche pas la formation artéfactuelle de la 8OHdG au niveau de l'ADN hépatique.

Parallèlement, des extractions d'ADN ont été effectuées selon la technique de Shigenaga et al. (1994) mais en présence de 30 mM de BHT. Les résultats ont montré que l'ajout de BHT ne diminuait pas les taux de 8OHdG dans l'ADN branchial. Dans les glandes digestives le nombre de résidus de 8OHdG a augmenté ou est resté inchangé en présence de BHT selon les essais.

Par conséquent, en raison du manque d'effet bénéfique du BHT, la technique d'extraction précédemment utilisée (Shigenaga et al., 1994) a été conservée dans la suite des essais.

Les résultats des études portant sur l'utilisation du BHT sont assez contradictoires. Adachi et al. (1995) ont reporté que l'ajout de BHT diminuait de l'ordre de 30 % les niveaux de 8OHdG dans l'ADN de foie de rat isolé par la méthode au phénol ou la méthode pronase / éthanol. Il a précisé également qu'en absence de BHT, il était difficile de récupérer l'ADN après précipitation par l'éthanol car il apparaissait sous forme de fragments. Nous avons observé à l'inverse qu'en présence de BHT, et en particulier pour les glandes digestives, le culot d'ADN ne sédimentait pas correctement dans le fond du tube Eppendorff mais se déposait le long des parois du tube suggérant que l'ADN était fragmenté. Hu et Shih (1997) ont montré en accord avec nos résultats que le BHT n'inhibait pas les lésions induites par un système fer / acide ascorbique dans l'ADN de foie de rat. Kahl (1991) a précisé que bien que le BHT soit capable de piéger divers espèces radicalaires et de chélater les métaux, il s'est révélé être un cancérigène et un promoteur de tumeurs à fortes doses. En outre, les antioxydants phénoliques comme le BHT peuvent être convertis en radicaux phénoxy qui peuvent être à la base d'une cascade d'événements prooxydants. Des métabolites quinoniques peuvent être

Nucléase P1	Branchies		Glande digestive	
	4 µl / 10 min.	8 µl / 10 min.	4 µl / 10 min.	8 µl / 10 min.
µg ADN	56 ± 3	58 ± 4	43 ± 3	43 ± 3
8OHdG pg / 20 µl	137 ± 1	144 ± 5	6,8 ± 0,5	7,1 ± 0,2
dG ng / 20 µl	381 ± 20	405 ± 12	244 ± 20	243 ± 22
8OHdG/10 ⁵ dG	36,2 ± 2,2	35,6 ± 0,4	2,8 ± 0,3	2,9 ± 0,2

Tableau 10 : Différentes conditions pour la digestion de l'ADN en déoxynucléotides correspondants par la nucléase P1. La température d'incubation pour l'ensemble des modalités est de 65 °C. Les volumes d'injection pour la mesure de la 8OHdG sont de 20 µl et 100 µl respectivement pour les branchies et les glandes digestives. (Ils ont été rapportés à 20 µl pour les glandes digestives afin de simplifier la présentation des résultats.)

Phosphatase alcaline	4 µl / 1h	8 µl / 1h	4 µl / 2h	8 µl / 2h
µg ADN	156 ± 22	178 ± 15	161 ± 7	171 ± 6
8OHdG pg / 20 µl	48 ± 4	47 ± 2	57 ± 4	51 ± 8
dG ng / 20 µl	1023 ± 49	1001 ± 5	969 ± 35	1011 ± 48
8OHdG/10 ⁵ dG	4,7 ± 0,2	4,7 ± 0,2	5,9 ± 0,3	5,4 ± 0,4

Tableau 11 : Différentes conditions pour la digestion de l'ADN en déoxynucléosides correspondants par la phosphatase alcaline dans l'ADN de glande digestive. La température d'incubation pour l'ensemble des modalités est de 37 °C. Le volume d'injection pour la mesure de la 8OHdG est de 100 µl. (Il a été rapporté à 20 µl afin de simplifier la présentation des résultats.)

Phosphatase alcaline	4 µl / 1h	8 µl / 1h	4 µl / 2h	8 µl / 2h
µg ADN	90 ± 1	92 ± 1	92 ± 4	94 ± 5
8OHdG pg / 20 µl	227 ± 22	260 ± 31	233 ± 16	203 ± 24
dG ng / 20 µl	578 ± 9	577 ± 6	580 ± 12	551 ± 25
8OHdG/10 ⁵ dG	39,3 ± 4,2	45,0 ± 6	40,2 ± 3,6	36,8 ± 2,8

Tableau 12 : Différentes conditions pour la digestion de l'ADN en déoxynucléosides correspondants par la phosphatase alcaline dans l'ADN branchial. La température d'incubation pour l'ensemble des modalités est de 37 °C. Le volume d'injection pour la mesure de la 8OHdG est de 20 µl.

également formés. La production de H_2O_2 a ainsi été mise en évidence dans les microsomes de foie et particulièrement de poumon en présence de BHT.

Il semble, dans notre cas, qu'en fonction de la matrice biologique le BHT puisse exercer des propriétés prooxydantes.

3.2.2.3.c Optimisation des étapes d'hydrolyse de l'ADN isolé

Afin de vérifier que l'ADN isolé était complètement hydrolysé par la nucléase P1 et la phosphatase alcaline en déoxynucléosides avant la séparation et la détection électrochimique, nous avons augmenté les quantités d'enzymes ajoutées et les temps d'incubation par rapport aux conditions expérimentales indiquées par les auteurs. Pour la nucléase P1, les échantillons ont été incubés avec 4 ou 8 μ l d'une suspension à 3,3 mg/ml pendant 10 minutes à 65 °C. L'incubation à 65 °C n'a pas été prolongée à plus de 10 minutes car les auteurs ont précisé que des temps d'incubation excédant 15 minutes provoquaient une oxydation artéfactuelle de 8OHdG.

Les résultats reportés dans le tableau 10 indiquent que le fait de doubler la concentration de nucléase P1 dans les échantillons ne modifie ni les quantités de dG récupérées en fin d'hydrolyse, ni les niveaux de 8OHdG mesurés dans l'ADN des glandes digestives et des branchies.

De manière similaire, les volumes de la solution de phosphatase alcaline (1U/ μ l) ont été doublés, et l'incubation étendue à 2 heures (37 °C).

La déphosphorylation des nucléotides n'est pas influencée par ces modifications (tableaux 11 et 12) qu'il s'agisse de l'ADN des glandes digestives ou des branchies. Les taux de 8OHdG pour ces différentes conditions, restent inchangés dans l'ADN branchial, mais ils sont légèrement plus élevés dans l'ADN hépatique lorsque la digestion est poursuivie pendant 2 heures.

Les conditions d'hydrolyse de l'ADN par la nucléase P1 et la phosphatase alcaline fixées par les auteurs ne semblent pas être limitantes et elles ont été par conséquent employées par la suite.

	Branchies		Glande digestive	
	sous air	sous azote	sous air	sous azote
mg de tissu	203 ± 9	208 ± 11	188 ± 7	195 ± 11
µg ADN	106 ± 3	108 ± 9	76 ± 3	101 ± 24
A ₂₆₀ / A ₂₈₀	1,8 ± 0	1,8 ± 0	1,7 ± 0	1,7 ± 0
8OHdG pg / 50 µl	584 ± 43	274 ± 6	143 ± 3	150 ± 40
dG ng / 50 µl	1644 ± 112	1549 ± 51	1040 ± 50	1370 ± 353
8OHdG/10 ³ dG	35,5 ± 0,9	17,8 ± 1,7	13,8 ± 0,9	11,0 ± 0,4

Tableau 13 : Comparaison entre l'isolement et l'hydrolyse de l'ADN dans les glandes digestives et les branchies sous air et sous azote. Tous les tampons ont été dégazés sous azote, ainsi que tous les mélanges réactionnels. Les culots d'ADN ont également été séchés sous azote. Les volumes d'injection pour la mesure de la 8OHdG sont de 50 µl.

3.2.2.3.d Filtration des hydrolysats d'ADN avant injection en CLHP

Au cours des premiers essais, les hydrolysats ont été filtrés sur des systèmes de microfiltration (Ultrafree Eppendorf 30000 Da cutoff Millipore) avant injection en CLHP. Cette microfiltration permet de retenir les protéines utilisées au cours de l'hydrolyse de l'ADN.

Nous avons vérifié tout d'abord que le passage sur Cutoff n'occasionnait pas de pertes au niveau de la 8OHdG et/ou de la dG, puis nous l'avons comparé à une précipitation des protéines par le chloroforme (Douki *et al.*, 1996). Plus précisément, 114 µl de chloroforme ont été ajoutés aux hydrolysats d'ADN, l'ensemble a été passé au vortex pendant 30 secondes, puis centrifugé à 12000g / 5 min. / 4 °C. La phase aqueuse a été récupérée et injectée pour la séparation et la détection de la 8OHdG.

Les résultats ont indiqué que les taux de 8OHdG et de dG étaient équivalents avant et après passage sur le tube de microfiltration, et la comparaison des profils chromatographiques a montré que la précipitation des protéines par le chloroforme semblait plus efficace que la microfiltration. La purification des hydrolysats par le chloroforme présente également l'avantage d'être plus simple, plus rapide et moins onéreuse ; ce mode de purification a donc été retenu dans les essais qui ont suivi.

3.2.2.3.e Isolement et hydrolyse de l'ADN sous atmosphère d'azote

Plusieurs auteurs ont précisé qu'ils procédaient à l'isolement et à l'hydrolyse de l'ADN en absence d'oxygène (Fraga *et al.*, 1990 ; Kasai *et al.*, 1989 ; Shen *et al.*, 1995 ; Liu *et al.*, 1996b ; Trischer *et al.*, 1996). Nous avons, par conséquent, cherché à vérifier si le fait de travailler en conditions anaérobies pour l'ensemble des étapes de préparation de l'échantillon, permettait de diminuer les niveaux de bases de 8OHdG.

Tous les tampons utilisés au cours de l'isolement et de l'hydrolyse de l'ADN ont été dégazés par l'azote, ainsi que tous les mélanges réactionnels : l'ensemble des incubations a été réalisé en absence d'oxygène. Les culots d'ADN ont été séchés sous flux d'azote et non sous air comme habituellement. Les hydrolysats purifiés ont été dégazés par l'azote avant d'être injectés en CLHP.

Les résultats reportés dans le tableau 13 indiquent qu'en absence d'oxygène, les taux de 8OHdG sont divisés par 2 dans l'ADN de branchies. L'effet est moins marqué dans l'ADN de glande digestive. Les rendements et la pureté de l'ADN ne sont pas modifiés par la présence d'azote quelque soit le tissu.

Il est fort probable que les niveaux de 8OHdG plus élevés, obtenus précédemment après incubations prolongées avec les RNAses et la protéinase K, soient liés à une production artéfactuelle due à la présence d'oxygène dans les mélanges réactionnels.

	Branchies		Glande digestive	
	+ DFAM	- DFAM	+ DFAM	- DFAM
µg ADN	149 ± 2	146 ± 14	92 ± 18	120 ± 31
8OHdG pg / 50 µl	536 ± 10	411 ± 63	58 ± 18	58 ± 4
dG ng / 50 µl	2146 ± 13	1925 ± 150	1470 ± 353	1793 ± 403
8OHdG/10 ⁵ dG	25,0 ± 0,3	21,3 ± 2,7	3,8 ± 0,3	3,4 ± 0,6

Tableau 14 : Comparaison entre les taux de 8OHdG mesurés pour des culots d'ADN branchial et de glande digestive repris dans un tampon acétate de sodium en présence ou en absence de 1 mM de DFAM. Les étapes d'isolement et d'hydrolyse de l'ADN ont été effectuées sous azote quelque soit les conditions. Les volumes d'injection pour la mesure de la 8OHdG sont de 50 µl et 100 µl respectivement pour les branchies et les glandes digestives.

	Extraction le 6/10 - DFAM				Extraction le 10/09 + DFAM			
	GD 1	GD 2	GD 3	GD 4	GD 1	GD 2	GD 3	GD 4
mg tissu	198 ± 12	249 ± 12	214 ± 34	208 ± 17	217 ± 18	190 ± 7	214 ± 12	218 ± 1
µg ADN	108 ± 14	139 ± 0	156 ± 7	121 ± 0	133 ± 0	81 ± 6	189 ± 19	151 ± 6
Rend. ^t 1/	1880	1786	1384	1721	1629	2096	1151	1453
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1,7 ± 0	1,7 ± 0	1,7 ± 0	1,7 ± 0	1,7 ± 0	1,7 ± 0	1,7 ± 0	1,7 ± 0
8OHdG/ 10 ⁵ dG	4,3 ± 0,1	5,1 ± 0,4	2,8 ± 0,5	3,0 ± 0,2	5,7 ± 0,2	4,4 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,6 ± 0,1

Tableau 15 : Comparaison des niveaux de 8OHdG mesurés dans l'ADN de 4 glandes digestives extraites à un mois d'intervalle, les culots étant repris dans le tampon acétate de sodium (20mM, pH 5) en présence ou en absence de 1 mM de DFAM. Les étapes d'isolement et d'hydrolyse de l'ADN ont été effectuées sous azote quelque soit les conditions. Les volumes d'injection pour la mesure de la 8OHdG sont de 50 µl (10/09) et 100 µl (6/10).

La 8OHdG a été mesurée dans l'ADN d'une série de 14 branchies et de 14 glandes digestives dans ces conditions afin d'évaluer la variabilité sur les valeurs des contrôles :

	8OHdG en 8OHdG/10 ⁵ dG	Rendement d'extraction mg ADN / g de tissu
Branchies	23,0 ± 3,5	1 / 1,5 ± 0,2
Glandes digestives	3,9 ± 1,1	1 / 1,9 ± 0,7

Pour chaque tissu, le dosage a été effectué en duplicats ou triplicats, la variation sur la mesure de la 8OHdG et les rendements n'excède pas en moyenne respectivement 6 % et 9 %. La variabilité entre individus est plus forte en général dans les glandes digestives que dans les branchies, qu'il s'agisse des taux de 8OHdG ou des rendements d'extraction de l'ADN. Concernant les rendements d'extraction pour les glandes digestives, des essais ont été réalisés afin de s'assurer que les variations étaient liées au tissu lui-même et non au protocole expérimental.

Il est intéressant de remarquer que les concentrations de 8OHdG dans l'ADN branchial sont toujours très supérieures à celles mesurées dans l'ADN de glande digestive même en travaillant sous azote.

3.2.2.3.f Utilité de l'ajout de déféroxamine mésylate (DFAM) au cours de la préparation des échantillons

Travaillant en conditions anaérobies pour l'ensemble des étapes de préparation des tissus, nous avons cherché à vérifier s'il était toujours nécessaire d'utiliser le chélateur d'ions métalliques DFAM. Nous avons comparé les taux de 8OHdG mesurés dans des culots d'ADN repris en présence ou en absence de DFAM

Le tampon acétate de sodium (20 mM, pH 5) dans lequel est repris le culot d'ADN au moment de l'hydrolyse en déoxynucléosides contient 1 mM de DFAM. L'addition de DFAM présente l'inconvénient d'allonger les temps d'analyse en raison de l'éluion d'un pic tardif.

Les résultats montrent qu'en isolant et en hydrolysant l'ADN sous azote, les concentrations en 8OHdG sont comparables, pour les deux tissus, que le DFAM soit ajouté ou non dans le tampon acétate de sodium (20 mM, pH 5) (tableau 14).

S'affranchir de l'addition de DFAM permet également de réduire les temps d'analyse : un échantillon peut être ainsi injecté toutes les 20 minutes et non toutes les 40-45 minutes. Les

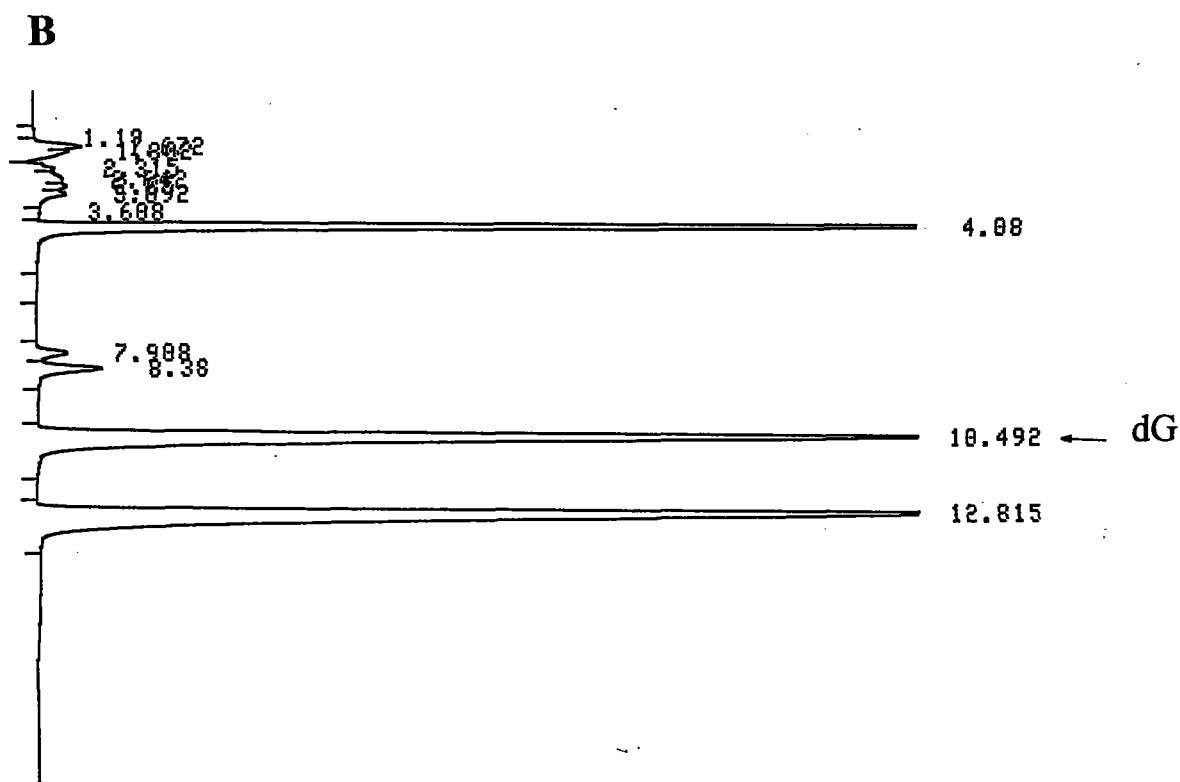
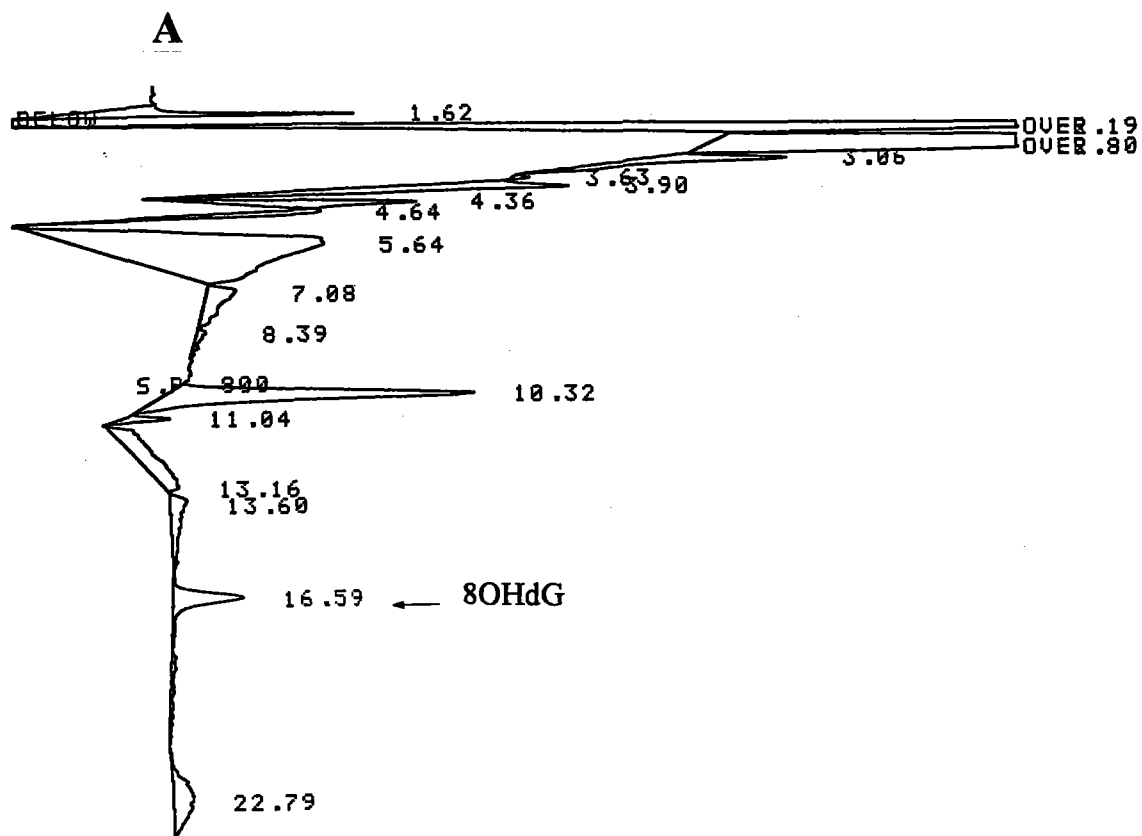


Figure 13 : Profils chromatographiques UV et électrochimique d'un hydrolysate d'ADN de glande digestive obtenu après injection de 100 µl d'échantillon. (A) Chromatogramme avec détection électrochimique ($E_1 = 150$ mV, $E_2 = 350$ mV, 50 nA). (B) Chromatogramme avec détection UV à 290 nm. 8OHdG : 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine, dG : déoxyguanosine.

figures 13 et 14 représentent respectivement les profils chromatographiques d'un hydrolysate d'ADN de glande digestive et de branchies obtenus dans ces conditions.

Des glandes digestives ont été coupées en 2 portions. L'ADN de la première portion a été isolé immédiatement, dissous dans le tampon acétate de sodium en présence de DFAM et analysé. L'ADN de la seconde portion a été isolé un mois plus tard et repris dans le tampon acétate de sodium en absence de DFAM. Dans les deux cas, l'ensemble des étapes a été réalisé sous azote. Les rendements d'extraction et les taux de 8OHdG obtenus sont reportés dans le tableau 15.

La variation pour un même tissu n'excède pas 15 % pour les rendements d'extraction de l'ADN et les taux de 8OHdG. L'absence de DFAM n'augmente pas les taux de 8OHdG mesurés.

3.2.2.3.g Validation de la technique de dosage de la 8OHdG par des essais d'intoxication *in vitro*

- Des essais d'intoxication *in vitro* avec un mélange réactionnel reconnu pour induire la formation de 8OHdG dans l'ADN isolé ont été effectués. L'ADN isolé de branchies et de glande digestive a été incubé (pendant une heure à 37 °C) en présence de sels de cuivre (CuSO₄, 25 µM), de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, 2,8 mM) et d'acide ascorbique (100 µM) (Aruoma *et al.*, 1991).

De même que les ions du fer, les ions du cuivre catalysent la réaction d'Haber-Weiss produisant le radical hydroxyl ; en fait, les sels cuivreux génèrent les radicaux hydroxyl à partir de H₂O₂ plus rapidement que les ions ferreux (Halliwell et Gutteridge, 1984). Notre choix s'est porté sur les ions Cu²⁺ plutôt que les ions Fe³⁺ car les travaux de Aruoma et collaborateurs (1991) ont montré que H₂O₂ en présence de Cu²⁺ entraîne la formation de plus de lésions à l'ADN qu'en présence d'ions Fe³⁺.

Le protocole d'intoxication de l'ADN employé est le suivant :

- le mélange réactionnel contenait, dans un volume final de 450 µl, les réactifs suivants: l'ADN (~ 100 µg / 450 µl) en solution dans un tampon KH₂PO₄ / KOH (10 mM, pH 7.4), CuSO₄ (25 µM), H₂O₂ (2,8 mM) et l'acide ascorbique (100 µM). Les concentrations indiquées correspondent aux concentrations finales. Le mélange a été incubé pendant une heure à 37 °C. (La solution mère de CuSO₄ a été préparée dans l'eau distillée en raison de problèmes de précipitation dans le tampon phosphate)

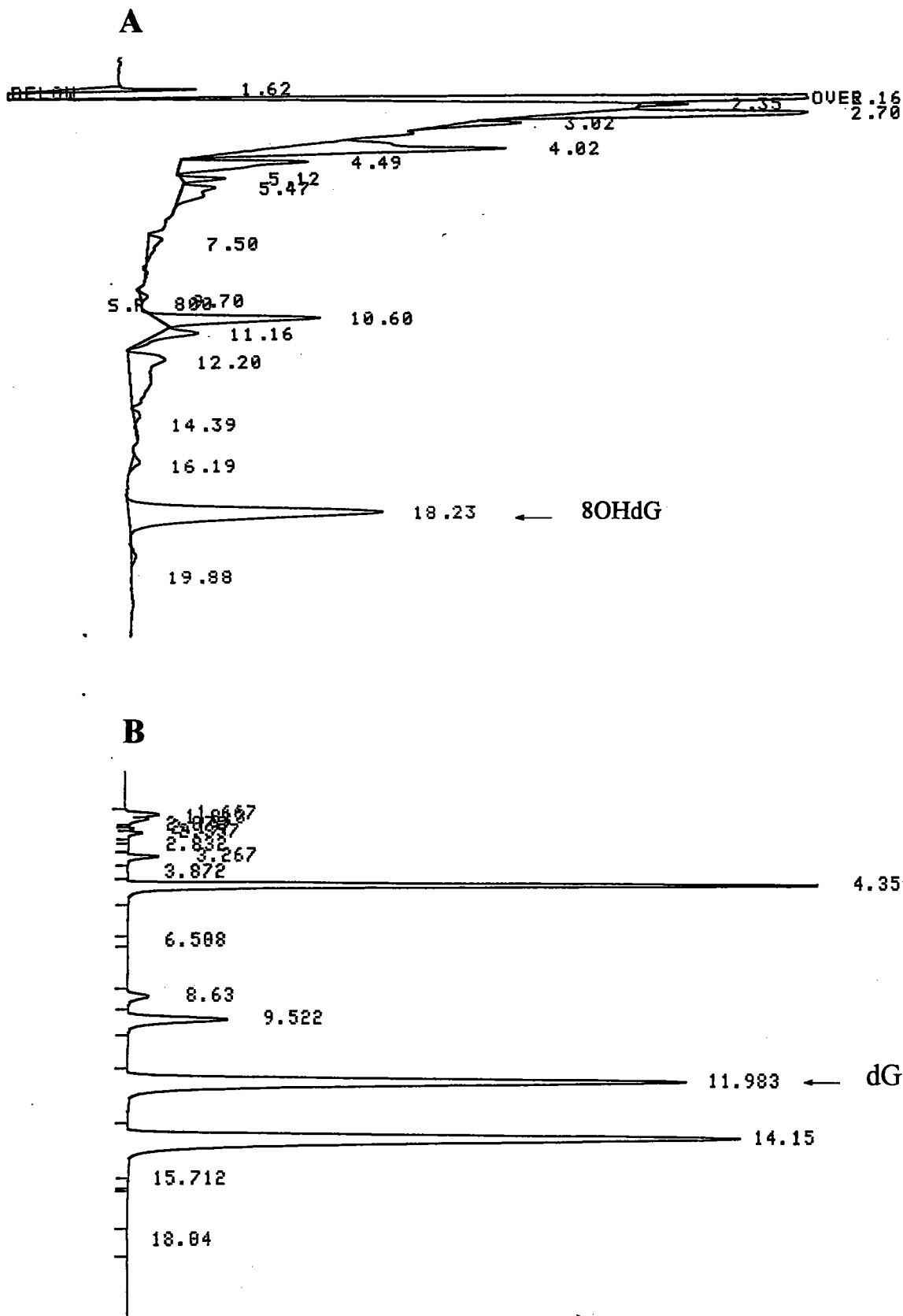


Figure 14 : Profils chromatographiques UV et électrochimique d'un hydrolysate d'ADN de branchies obtenu après injection de 100 μ l d'échantillon. (A) Chromatogramme avec détection électrochimique ($E_1 = 150$ mV, $E_2 = 350$ mV, 50 nA). (B) Chromatogramme avec détection UV à 290 nm. 8OHdG : 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine, dG : déoxyguanosine.

- la réaction a été stoppée par ajout de 45 μ l d'acétate de sodium (3 M, pH 5) et 900 μ l d'éthanol froid (placé à - 20 °C). L'ADN a été maintenu une nuit à -20°C pour faciliter la précipitation

- les culots d'ADN ont été récupérés par une centrifugation à 12000g / 15 min., puis rincés par 1 ml d'éthanol à 70 % et recentrifugés à 12000g / 15 min. L'éthanol a été éliminé et les culots d'ADN ont été séchés sous azote. Ils ont été repris dans 200 μ l de tampon acétate de sodium (20 mM, pH 5) et l'ADN a été hydrolysé en déoxynucléosides correspondants par l'action de la nucléase P1 (4 μ l / 10 min. / 65 °C) et la phosphatase alcaline (4 μ l / 1 h / 37 °C). Les protéines ont été ensuite précipitées par le chloroforme (114 μ l) et les hydrolysats injectés en CLHP pour la séparation et la détection de la 8OHdG.

L'ensemble des étapes d'isolement et d'hydrolyse de l'ADN a été effectué sous azote, comme décrit précédemment (3.2.2.3.e). Deux contrôles ont été réalisés parallèlement : un contrôle à $t = 0$ (C_0) correspondant aux niveaux de base dans l'ADN branchial et de glande digestive avant l'incubation et un contrôle à $t = 1$ h (C_{1h}) correspondant aux valeurs de 8OHdG dans les contrôles après une heure d'incubation dans le tampon KH_2PO_4 / KOH seul (en absence de CuSO_4 / H_2O_2 / acide ascorbique). Un triplicat a été effectué pour chaque modalité.

Les résultats montrent, tout d'abord, que l'incubation de l'ADN à 37 °C pendant une heure chez les témoins dans le tampon phosphate, n'induit pas la formation de 8OHdG : les concentrations en 8OHdG des contrôles C_0 et C_{1h} sont équivalentes pour l'ADN de branchies et de glande digestive (figure 15, tableau 16). La 8OHdG est donc stable et aucune oxydation artéfactuelle des résidus guanine de l'ADN n'est observable dans ces conditions.

*L'incubation de l'ADN en présence du mélange CuSO_4 / H_2O_2 / acide ascorbique stimule fortement la production de 8OHdG dans l'ADN branchial et de glande digestive. Les augmentations ne sont cependant pas les mêmes dans les deux tissus : pour une même quantité d'ADN, les taux de 8OHdG sont respectivement $\times 23$ et $\times 521$ dans l'ADN de glande digestive et l'ADN branchial par rapport aux contrôles. La formation de 8OHdG est 22 fois plus stimulée dans l'ADN branchial. Aruoma *et al.* (1991) ont indiqué que les taux de 8OHdG mesurés par CG-SM, dans l'ADN de thymus de veau (225 μ g) intoxiqué par le mélange CuSO_4 / H_2O_2 / acide ascorbique étaient 47 fois plus élevés par rapport aux contrôles. Les résultats que nous avons obtenus dans l'ADN de glande digestive sont du même ordre de grandeur.*

D'autre part, l'ADN branchial semble avoir été fortement endommagé par le traitement car les quantités d'ADN récupérées après l'intoxication, sont 2 à 3 fois inférieures à celles introduites au départ. Ceci est en accord avec le fait que les mélanges d'ions Cu^{2+} et H_2O_2 en présence d'acide ascorbique, sont impliqués dans la production de cassures étendues à l'ADN. Les cassures se produisent souvent près des résidus guanine, et il a été suggéré que le cuivre se

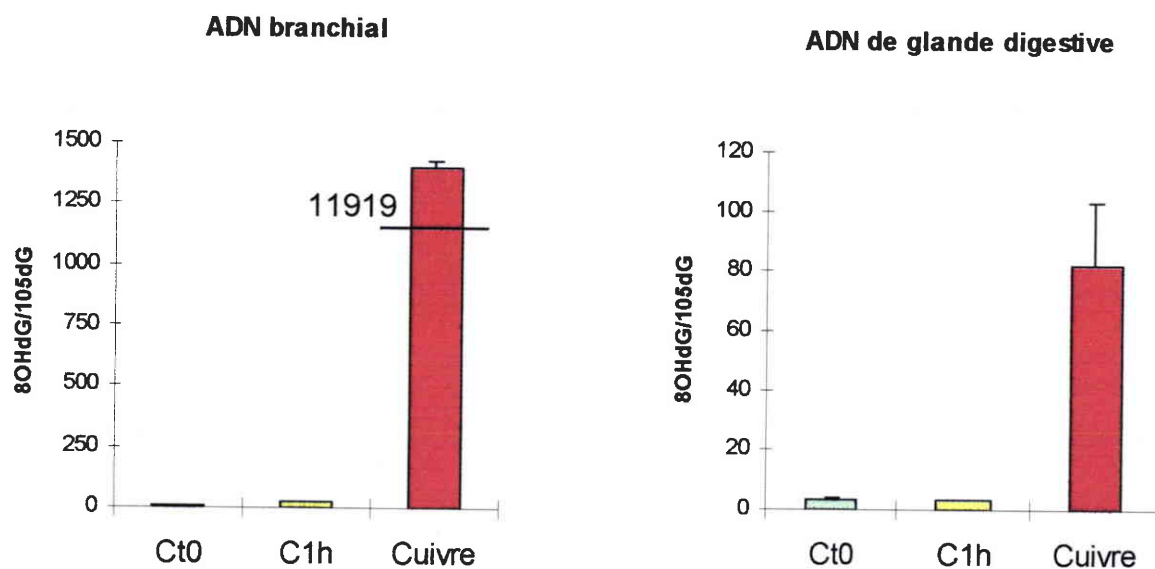


Figure 11 : Intoxication *in vitro* de l'ADN isolé de glande digestive et de branchies par le mélange $\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2 /$ acide ascorbique (Cuivre). Les échantillons ont été incubés pendant 1 h à 37 °C (n = 3). Deux contrôles ont été réalisés simultanément : C₀ : contrôle à t = 0 et C_{1h} : contrôles après 1 heure d'incubation à 37 °C. Les concentrations finales sont de 25 μM pour CuSO_4 , 2,8 mM pour H_2O_2 et 100 μM pour l'acide ascorbique.

		Contrôles	Contrôles incubés	$\text{CuSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2/\text{acide ascorbique}$
ADN branchial		21.2	21.2	11708
		24.9	23.9	12254
		22.9	23.5	11795
ADN hépatique		3.9	3.2	96.6
		3.7	3.6	52.6
		3.6	3.8	97.1
Moyenne	Br	23.0 ± 1.5	22.9 ± 1.2	11919 ± 240
	GD	3.7 ± 0.1	3.5 ± 0.2	82.1 ± 20.9

Tableau 16 : Valeurs obtenues au cours de l'intoxication *in vitro* de l'ADN isolé de glande digestive et de branchies par le mélange $\text{CuSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2/\text{acide ascorbique}$.

liait à l'ADN au niveau de ces sites (Aruoma *et al.*, 1991). L'ADN branchial est probablement hautement fragmenté après le traitement par le mélange $\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2 /$ acide ascorbique, occasionnant des pertes au moment de la sédimentation des culots.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la différence de sensibilité à l'intoxication par les mêmes toxiques entre l'ADN branchial et l'ADN de glande digestive.

Aruoma *et al.* (1991) ont suggéré que les ions Cu^{2+} se liaient à l'ADN, en particulier au niveau des résidus guanine, et causaient des lésions en générant OH^\cdot par des réactions « site spécifique ». Le fait que les résidus guanine de l'ADN branchial soient plus accessibles à la fixation des ions Cu^{2+} , et par conséquent à la génération de OH^\cdot , pourrait justifier une production accrue de 8OHdG. Au moment de la précipitation par l'éthanol, l'ADN branchial apparaît *de visu* généralement sous la forme de petits morceaux à la différence de l'ADN de glande digestive qui se présente le plus souvent sous la forme d'un filament enroulé. Le protocole d'isolement de l'ADN utilisé, produit peut-être un ADN plus fragmenté pour le tissu branchial. Il est vraisemblable que l'ADN branchial soit effectivement plus accessible à l'attaque radicalaire. Une confirmation par électrophorèse avec révélation au bromure d'éthidium, de ces différences structurales de l'ADN isolé à partir des deux tissus serait nécessaire.

Aruoma *et al.* (1991) ont utilisé de l'ADN de thymus de veau pour l'intoxication *in vitro*, préalablement traité par une résine Chelex afin d'éliminer les ions métalliques contaminants, en particulier les ions du fer. Cette étape de purification n'a pas été appliquée dans notre cas : il est possible que les ions métalliques liés à l'ADN isolé puissent réagir également avec H_2O_2 produisant OH^\cdot et stimuler la formation de la 8OHdG. Une proportion plus importante d'ions métalliques au niveau de l'ADN branchial pourrait expliquer en partie la stimulation beaucoup plus forte de la formation de 8OHdG par rapport à l'ADN de glande digestive. Il aurait été intéressant d'incuber de l'ADN de branchies et de glande digestive en présence de H_2O_2 et d'acide ascorbique mais en absence de Cu^{2+} , afin de comparer les taux obtenus pour les deux types d'ADN.

D'autre part, la 8OHdG ne représente qu'un exemplaire parmi la vingtaine de produits issus de l'attaque radicalaire de l'ADN. Il n'est pas exclu que d'autres produits d'oxydation des bases de l'ADN soient formés dans l'ADN de glande digestive traité par le mélange $\text{CuSO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2 /$ acide ascorbique, les taux plus faibles de 8OHdG ne signifient pas forcément que ce dernier soit moins sensible à l'attaque des espèces radicalaires.

3.3 Protocoles expérimentaux optimisés

3.3.1 Protocoles pour la détermination du MDA

3.3.1.1 Test TBA

Le protocole du test est le suivant :

- un volume d'homogénat (180 μ l) est combiné à 360 μ l d'acide trichloroacétique (TCA) à 10 % dans l'acide chlorhydrique (HCl) 0,25 N puis le mélange est centrifugé à 1500g / 5 min. afin de précipiter les protéines
- le surnageant est récupéré et mélangé à volume égal avec une solution d'acide thiobarbiturique à 1 % dans HCl 0,25 N
- le mélange réactionnel est incubé à 80 °C pendant 20 minutes
- après refroidissement sur la glace, l'ensemble est centrifugé à 1500g / 5 min.
- l'absorbance du surnageant est mesurée en microcuvettes à 535 nm contre un blanc contenant les réactifs sans l'échantillon.

3.3.1.2 Technique CLHP

Le protocole utilisé pour l'ensemble des études de terrain et des expérimentations au laboratoire est le suivant :

Préparation de l'échantillon :

- déprotéinisation de l'homogénat (180 μ l) par 50 % (v/v) d'éthanol pendant 1 heure à 4 °C
- centrifugation à 30000g / 30 min. / 4 °C. Le surnageant 30000g est dilué au ¼ dans un tampon phosphate de sodium, 30 mM, pH 5.5, contenant 25 % d'éthanol. Une dilution de l'échantillon au ½, augmentant la hauteur des pics, est possible dans le cas où les profils ne sont pas trop chargés
- injection d'un aliquot de 20 μ l d'échantillon en CLHP.

Conditions de séparation CLHP :

- colonne : phase reverse RPC18, 25cm \times 4 mm (ID), 5 μ m (Interchim K5OD2*25C) avec une précolonne RPC18, 1cm \times 4mm, 5 μ m (Merck 1.50962)
- phase mobile : tampon phosphate de sodium, 30 mM, pH 6.5 contenant 25 % d'éthanol et 0,5 mM de bromure de tétradécyltriméthylammonium
- débit : 1 ml/min.
- température : ambiante
- détection : 267 nm
- volume d'injection : 20 μ l

3.3.2 Protocole pour la détermination de la 8OHdG

Toutes les étapes d'isolement et d'hydrolyse de l'ADN ont été réalisées sous atmosphère d'azote : l'ensemble des tampons utilisés et des milieux réactionnels a été saturé par l'azote.

Isolement et hydrolyse de l'ADN des glandes digestives et des branchies :

- 150 à 200 mg de tissus sont homogénéisés sur glace dans 1 ml de tampon d'homogénéisation (0,1 M NaCl, 30 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoéthanol, 0,5 % (v/v) Triton X-100) par un potter Ehvehjem par 2 et 6 tours de pilons respectivement pour les glandes digestives et les branchies. Les échantillons sont centrifugés à 1000g / 10 min. / 4 °C pour sédimenter les noyaux. Le culot nucléaire est resuspendu et homogénéisé dans 1 ml de tampon d'extraction (0,1 M Tris pH 8, 0,1 M NaCl, 20 mM EDTA), puis recentrifugé à 1000g / 10 min. / 4 °C. Le culot lavé est resuspendu dans 300 µl de tampon d'extraction à l'aide d'une P200

- l'ARN est digéré par incubation 1 heure à 50 °C des échantillons avec 20 µl d'une solution contenant 50 U/ml RNase A (Boeringer Mannheim) et 100 U/ml de RNase T1 (Boeringer Mannheim). Les protéines sont digérées par incubation pendant 1 heure à 50 °C avec un mélange de 40 µl de sarkosyl à 10 % et 40 µl d'une solution de protéinase K (Boeringer Mannheim) à 5 mg/ml préparée dans 10 mM Tris / 1 mM EDTA, pH 7.4

- 400 µl de phénol de haute pureté et saturé (Amresco 0945) sont ajoutés et l'ensemble est vortexé vigoureusement pendant 1 minute. L'échantillon est centrifugé à température ambiante pour séparer les 2 phases (12000g / 10 min.), la phase aqueuse supérieure est transférée dans un nouvel tube Eppendorf, 400 µl de phénol et 400 µl de Sevag (chloroforme : alcool isoamyl (24 :1, v/v) y sont ajoutés. Le tout est agité au vortex vigoureusement pendant 1 minute et centrifugé à 12000g / 10 min. à température ambiante. Après avoir transféré la phase aqueuse supérieure dans un nouveau tube, 400 µl de Sevag sont ajoutés pour extraire les traces de phénol résiduel de la phase aqueuse et les phases sont séparées comme décrit ci-dessus. Cette étape est répétée une seconde fois

- après avoir récupéré la phase aqueuse dans un tube Eppendorf froid, l'ADN est précipité par ajout de 40 µl d'acétate de sodium 3 M, pH 5 et 800 µl d'éthanol froid (placé à - 20 °C). Il est maintenu une nuit à - 20 °C avant d'être centrifugé à 12000g / 15 min. / 4 °C. Après lavage du culot d'ADN par l'éthanol à 70 %, l'échantillon est centrifugé à 12000g / 15 min. / 4 °C et l'éthanol est décanté et les culots sont séchés sous flux d'azote

- les culots d'ADN sont dissous dans 200 µl dans une solution d'acétate de sodium 20 mM, pH 5. La solution d'ADN est quantifiée par la mesure de l'absorbance à 260 nm en considérant que $A_{260} = 1$ correspond à une concentration de 50 µg/ml. La pureté de l'ADN isolé est estimée par le calcul du rapport A_{260}/A_{280} . L'ADN est hydrolysé en nucléotides par incubation 10 min. à 65 °C avec 4 µl d'une suspension à 3,3 mg/ml de nucléase P1 (Boeringer Mannheim) préparée dans 20 mM d'acétate de sodium pH 5. Le pH du mélange résultant est ajusté à pH

8.5 par ajout de 20 μl de tampon Tris-HCl 1 M, pH 8.5 et hydrolysé en nucléosides correspondants par incubation avec 4 μl d'une solution à 1U/ μl de phosphatase alcaline (Boeringer Mannheim) pendant 1 heure à 37 °C. A l'issue de l'incubation, 114 μl de chloroforme sont ajoutés et le tout est vortexé (pendant 30 secondes) puis centrifugé à 12000g / 5 min. / 4 °C. La phase aqueuse est récupérée, dégazée par l'azote et injectée en CLHP.

Conditions chromatographiques :

- colonne : Supelco LC-18 DB Supelcosil 3 μm , 15 cm \times 4,6 mm équipée d'une précolonne LC-18 DB

- phase mobile : tampon phosphate KH_2PO_4 , 50 mM, pH 5.5 contenant 5 % de méthanol

- débit : 1 ml/min.

- température : ambiante

- détection : détecteur UV : 290 nm pour le déoxyguanosine non modifié (dG)

détecteur électrochimique : Coulochem ESA modèle 5100 équipé d'une cellule analytique 5010 avec les potentiels des électrodes 1 et 2 ajustés à 150 mV et 350 mV respectivement pour la 8OHdG. La sensibilité est fixée à 50 nA sur les 2 électrodes. Le potentiel de la cellule de conditionnement est de 100mV avec une sensibilité de 1 μA .

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

- volume d'injection : 100 μl

Remarque : des volumes d'injections de 20 et 50 μl peuvent également être employés pour l'ADN branchial. Quant à l'ADN isolé de glande digestive, le volume d'injection de l'échantillon peut être réduit à 50 μl , néanmoins des hauteurs de pics moins satisfaisantes sont obtenues.

Ces conditions mises en œuvre pour la mesure de la 8OHdG, seront utilisées pour l'étude des bivalves transférés sur le site du Lot et Garonne lors de la seconde campagne d'octobre 1997.

4 Résultats

4 Résultats

4.1 Introduction

4.2 Etudes de terrain

4.2.1 Principe et protocole des études de transfert

4.2.2 Présentation des différents sites

4.2.3 Niveaux de contamination des sédiments prélevés sur les différents sites

4.2.4 Réponses des organismes transférés en terme de cytotoxicité et de génotoxicité

4.2.4.1 Site de la Fensch

4.2.4.2 Site des Vosges

4.2.4.3 Site du Lot et Garonne

- Première étude de transfert (juillet 96)

- Seconde étude de transfert (octobre 1997)

4.2.4.4 Site de la Sarthe

4.3 Intoxications au laboratoire

4.3.1 Protocole expérimental

4.3.2 Résultats

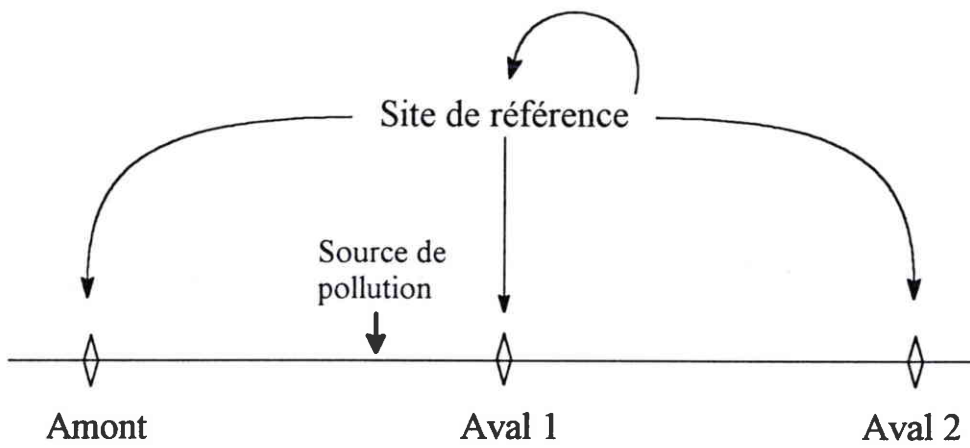


Figure 1 : Principe des études de transfert.

4.1 Introduction

Des études de transfert des bivalves sur différents sites et des essais en laboratoire ont été réalisés afin d'évaluer le potentiel du malonaldéhyde et de la 8OHdG à traduire de manière précoce les effets toxiques des polluants et des substances chimiques sur les organismes exposés.

Des sites caractérisés par différents profils de contamination ont été étudiés afin de comparer les réponses des paramètres suivis. Une étude *in situ* incluant le facteur temps a également été mise en œuvre pour estimer le degré de réversibilité à plus long terme des modifications enregistrées.

Pour l'ensemble de ces expérimentations, des paramètres antioxydants - glutathion peroxydases, glutathion réductase, catalase, superoxyde dismutase, glutathion - ont été mesurés simultanément par deux collègues (Carole Leguille-Cossu et Marie-Cécile Jacquin) et ont permis d'examiner la relation entre la déplétion de la défense antioxydante et le développement du processus délétère de la lipoperoxydation et de ses effets sur l'ADN.

4.2 Etudes de terrain

4.2.1 Principe et protocole des études de transfert

Des études de terrain ont été effectuées au cours desquelles des bivalves issus d'un site sain, ont été transférés en amont et en aval de différentes sources de pollution.

Une étude préliminaire a d'abord été réalisée dans la vallée sidérurgique de la Fensch (Moselle) en juin 1995, suivie par une étude définitive sur le même site en septembre 1995. Trois autres études de transfert *in situ* ont été mises en œuvre en juillet et octobre 1996 au niveau de 3 sites caractérisés par différents profils de contamination, localisés dans le Lot et Garonne, la Sarthe, et les Vosges. Enfin, le site du Lot et Garonne a fait l'objet d'un second transfert en octobre 1997.

Le principe des transferts pour l'ensemble des études *in situ* est représenté sur la figure 1. Pour chaque étude, les *Unio* ont été prélevés dans le site de référence (Manom, Moselle) et immédiatement transférés sur les sites étudiés où ils ont été mis en cages. Pour les sites les plus éloignés (Lot et Garonne et Sarthe), les organismes et les cages ont été envoyés par transporteurs et transférés dans les 24 heures suivant leur échantillonnage. Les cages (40 × 30 × 10 cm) contenant 5 moules (3 pour le préliminaire) ont été placées en amont et en aval de la source de pollution. Bien que les bivalves soient encagés, ils peuvent s'enfoncer dans le sédiment. Deux points en aval ont été systématiquement considérés : le point aval 1 proche de la source de pollution et le point aval 2 plus en aval par rapport au rejet. Les bivalves, encagés dans le site de référence ont servi de contrôles. Les cages ont été laissées sur place pendant une semaine pour l'étude préliminaire, deux semaines pour les 5 autres études de transfert. Pour le

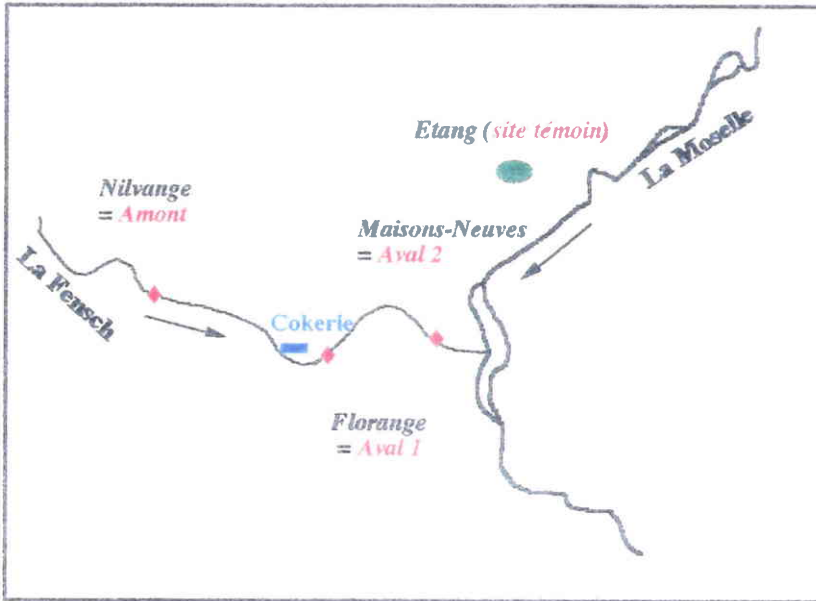


Figure 2 : Sites de la Fensch

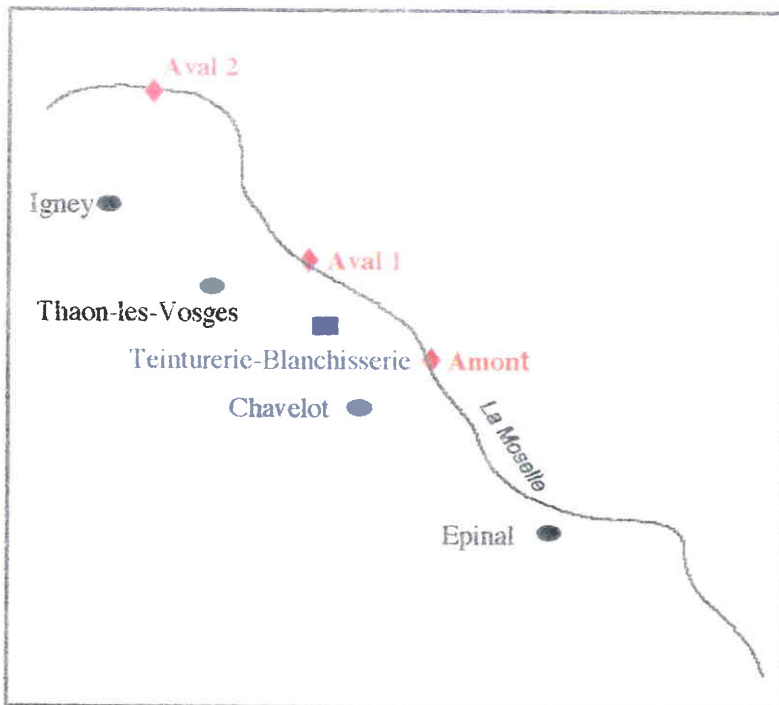


Figure 3 : Sites des Vosges

site de la Fensch (seconde étude), l'effet temps a été évalué : les cages ont été placées en amont et en aval de la source de pollution pendant 2 et 4 semaines.

A la fin de chaque étude, les bivalves ont été récupérés et disséqués sur place. Les branchies et les glandes digestives ont été immédiatement congelées à -196°C dans l'azote liquide et conservées jusqu'à ce qu'elles soient dosées. Les tissus ont été analysés séparément et non poolés. Les protocoles de préparation des homogénats et des essais biochimiques sont les mêmes que ceux décrits précédemment (cf. 3.3.). Les tissus sont homogénéisés dans un tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7.6 contenant 1 mM d'un mélange sérine-borate et 1 mM de phénylméthylsulfonyl fluorure qui agissent comme inhibiteurs de protéases et sont indispensables pour préserver les enzymes antioxydantes. L'homogénat total est utilisé pour la mesure du MDA par le test TBA et la technique CLHP. La 8OHdG est quantifiée dans l'ADN isolé à partir de 150 à 200 mg de tissu préalablement mis de côté. Les paramètres antioxydants sont déterminés au niveau des fractions subcellulaires (Carole Leguille-Cossu, 1996 ; Marie-Cécile Jacquin-Porretaz, 1996).

Des sédiments ont été prélevés sur les différents sites (excepté pour l'essai préliminaire) aux points amont, aval 1 et aval 2 ainsi que dans le site de référence. Des analyses physico-chimiques ont été réalisées sur la fraction fine des sédiments ($< 1\text{ mm}$) afin de déterminer les niveaux de contamination. Les analyses ont été effectuées par le Centre d'analyses et de recherches, Département Hydrologie et Environnement, Illkirch Graffenstaden dirigé par le Professeur Exinger. Les HAPs ont été analysés par CLHP et identifiés par spectrofluorométrie, les composés organochlorés ont été mesurés par CG avec capture d'électrons. Les métaux ont été quantifiés par spectroscopie d'absorption atomique.

Pour l'ensemble de ces sites, des tests de toxicité à court terme (Microtox) ont été effectués sur l'eau échantillonnée aux points amont et aval : aucune toxicité aiguë n'a été mise en évidence quelque soit le site considéré.

4.2.2 Présentation des différents sites

4.2.2.1 Site de la Fensch (rivière : la Fensch)

Une représentation cartographique des différents sites dans lesquels les bivalves ont été transférés, est présentée sur les figures 2-5.

Le rejet d'une cokerie (Florange-Serrémange, Moselle) constitue la source de pollution identifiée sur ce site. Les points en amont et en aval considérés sont les suivants :

- la petite agglomération de Nilvange représente le point amont. Elle se situe en amont de l'ensemble des activités sidérurgiques encore présentes dans la vallée de la Fensch. La ville ne possède pas de station d'épuration, les rejets domestiques sont déversés directement dans la rivière

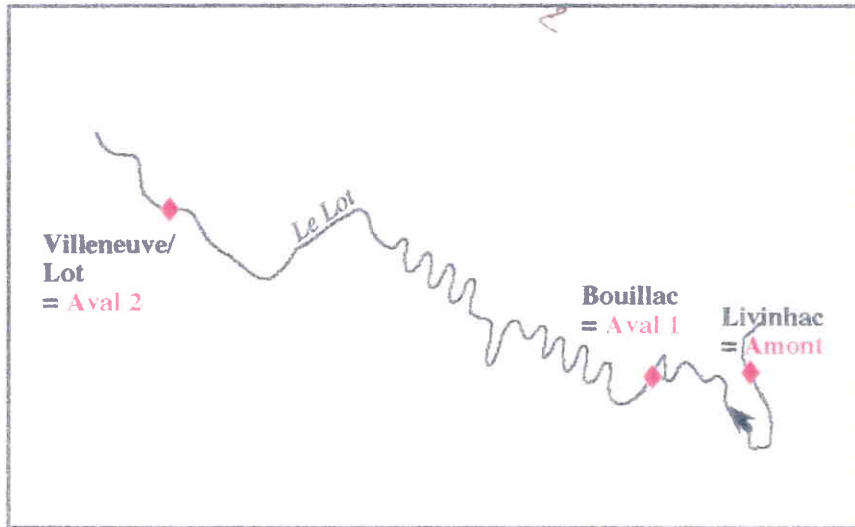


Figure 4 : Sites du Lot et Garonne

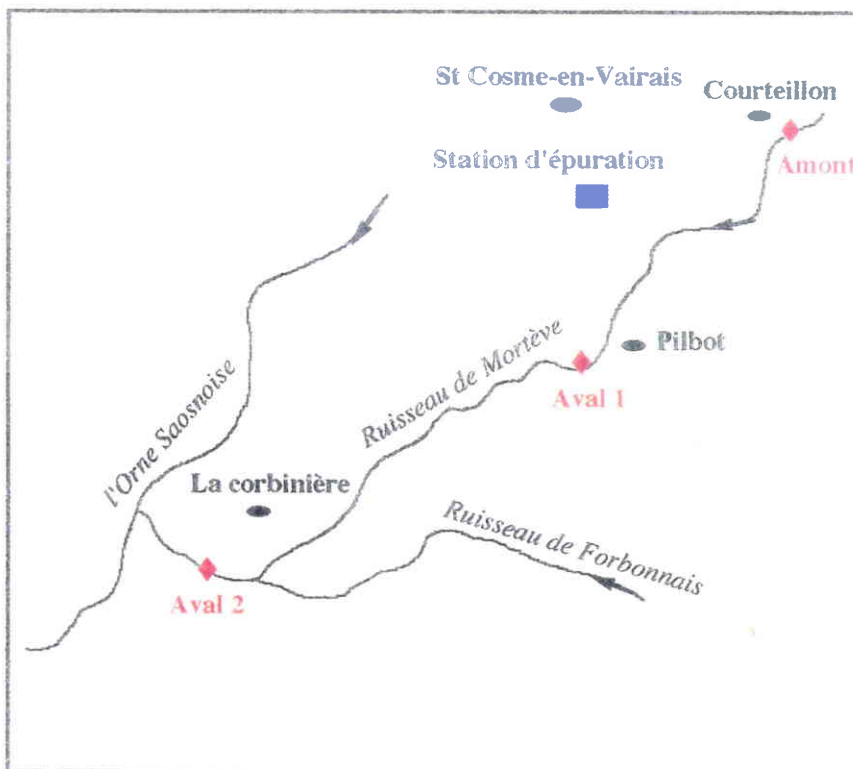


Figure 5 : Sites de la Sarthe

- le point aval 1 est localisé au niveau du rejet de la cokerie à Florange -Serrémange
- le point aval 2 est placé à Maisons-Neuves, 2.5 km en aval du rejet de la cokerie, après une station d'épuration.

4.2.2.2 Site des Vosges (rivière : la Moselle)

Ce site est pollué par les rejets de la blanchisserie - teinturerie de Thaon-les-Vosges.

Les points amont et aval étudiés sont les suivants :

- le point amont est situé à Chavelot. Ce site est également pollué par la ville d'Epinal placée plus en amont et par les rejets de l'usine Golbey
- le point aval 1 proche de la blanchisserie est localisé dans l'agglomération de Thaon-les-Vosges
- le point aval 2 est situé à Igney près d'une sablière gravière, 5 km en aval de l'usine.

4.2.2.3 Site du Lot et Garonne (rivière : le Lot)

Une fonderie a été en activité pendant de nombreuses années dans cette vallée du Lot et Garonne, une pollution diffuse persiste provenant des bassins de rétention.

Les transferts ont été réalisés au niveau des localités suivantes :

- à Livinhac pour le point amont
- à Bouillac pour le point aval 1, à quelques centaines de mètres de l'endroit où se jette le « Rio morte », cours d'eau apportant les rejets métallifères dans le Lot
- à Villeneuve-sur-Lot pour le point aval 2, environ 150 km en aval du rejet.

Les mêmes points amont et aval ont été considérés pour les deux études *in situ* de juillet 1996 et octobre 1997.

4.2.2.4 Site de la Sarthe (rivière : affluent de l'Orne Saosnoise)

Les sites sélectionnés pour l'étude de transfert sont localisés dans une région agricole. Une station d'épuration est présente à proximité.

Les points étudiés le long du ruisseau de Mortève sont placés au niveau des villages suivants :

- Courteillon pour le point amont
- Pilbot pour le point aval 1
- La Corbinière pour le point aval 2, environ 5 km par rapport à Pilbot.

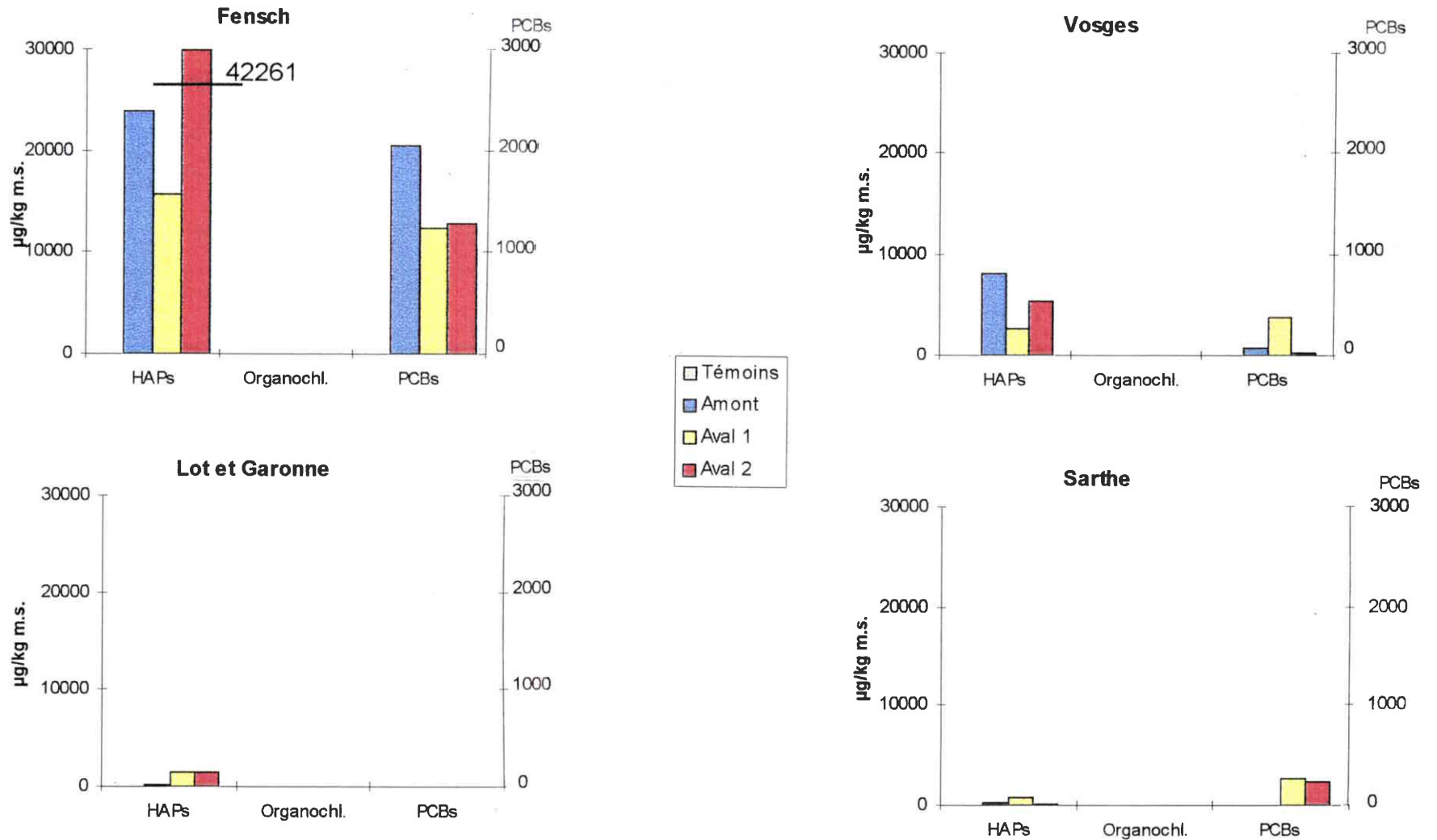


Figure 6 : Teneurs en HAPs, composés organochlorés (pesticides et chlorophénols) et PCBs mesurées sur la fraction fine (< 1mm) des sédiments prélevés en amont et en aval des sources de pollution sur les différents sites de transfert ainsi que dans le site de référence. Les concentrations sont exprimées en µg/kg m.s..

4.2.3 Niveaux de contamination des sédiments prélevés sur les différents sites

Les résultats des analyses physico-chimiques sont présentés sur les figures 6 et 7 et détaillés en annexes I - VI.

4.2.3.1 Comparaison des profils de contamination des différents sites

Les sédiments prélevés dans le site de référence (Manom, Moselle), dans lequel les bivalves ont été échantillonnés, sont selon notre attente très peu contaminés : les taux de HAPs n'excèdent pas 49 µg/kg matière sèche (m.s.), les concentrations de chlorophénols et de PCBs sont en dessous des limites de détection, les teneurs en pesticides organochlorés ne dépassent pas 59 µg/kg m.s et les métaux sont présents à des taux très faibles.

Le site de la Fensch est le plus contaminé parmi les 4 sites considérés pour les études de transfert : les taux de HAPs y sont entre 5 et 52 fois plus élevés (42261 µg/kg m.s., **aval 2**), les teneurs en PCBs étant 5 à 7 fois supérieures (2059 µg/kg m.s., **amont**) par rapport aux autres sites. Les métaux comme le mercure, le plomb, le cuivre et le chrome sont présents dans les sédiments aux plus fortes concentrations reportées pour les 4 sites. Il faut préciser que l'analyse physico-chimique n'a été réalisée que lors de la seconde étude sur ce site.

Le site des Vosges est essentiellement pollué par les HAPs et les PCBs, dont les teneurs relevées dans les sédiments, respectivement 8240 µg/kg m.s. (**amont**) et 386 µg/kg m.s. (**aval 1**), sont les plus fortes après celles de la Fensch. Les métaux tels que le plomb, le mercure, le cadmium et le zinc sont rencontrés à des concentrations entre 5 et 13 fois plus fortes comparé au site de référence.

Les sédiments prélevés dans le Lot et Garonne sont principalement contaminés par les métaux, et les HAPs (1500 µg/kg m.s., **aval 1 et 2**). Les teneurs en HAPs sont inférieures d'un facteur 5,5 à celles des sédiments des Vosges. Les concentrations en zinc, étain et arsenic sont les plus élevées des 4 sites étudiés, le taux de plomb est équivalent à celui des Vosges, la teneur en mercure étant la plus forte après celle de la Fensch.

La pollution organique au niveau du site de la Sarthe est lié à la présence de HAPs (807 µg/kg m.s., **aval 1**) et de PCBs (260 µg/kg m.s., **aval 1 et 2**) dont les taux sont relativement faibles par rapport aux autres sites. Quant à la pollution métallique, les teneurs en cadmium, cuivre et chrome sont supérieures à celles rencontrées dans les sites de la Fensch, des Vosges et du Lot et Garonne. La concentration en zinc est aussi élevée que dans le Lot et Garonne.

4.2.3.2 Site de la Fensch

Parmi les 4 sites étudiés, les sédiments prélevés dans le site de la Fensch présentent les plus forts taux de HAPs, de PCBs et de certains métaux en particulier le plomb, le mercure, le cuivre et le chrome. Il est important de rappeler que les analyses physico-chimiques n'ont été faites qu'au cours de la seconde étude en septembre 1995. Nous avons observé *de visu* une détérioration du

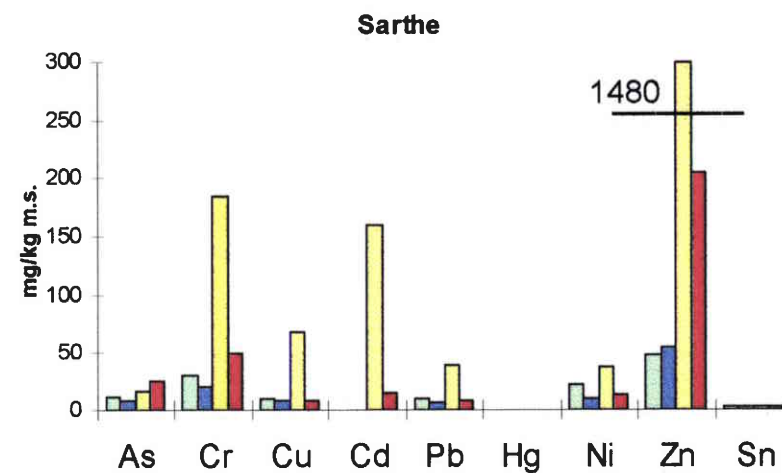
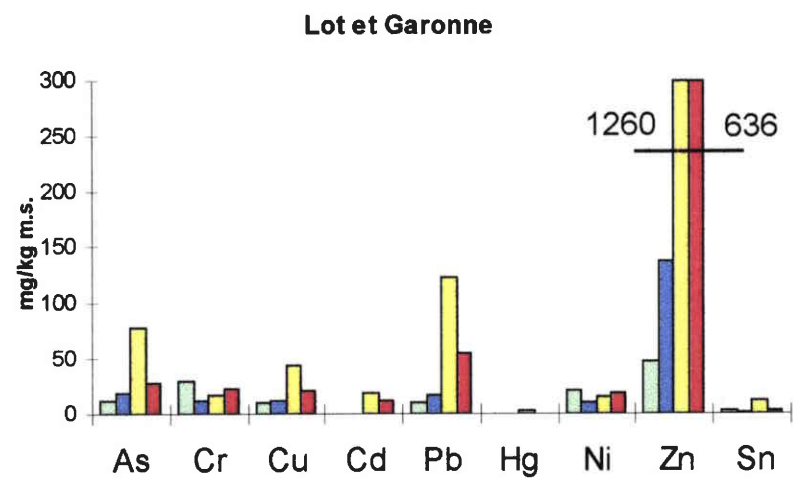
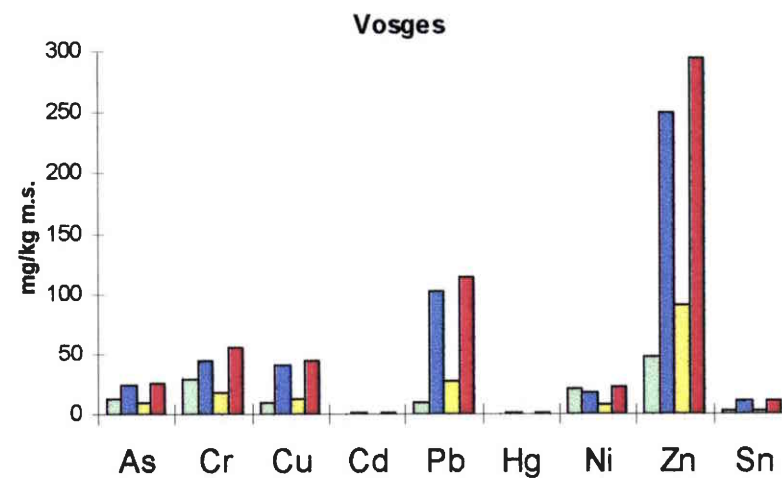
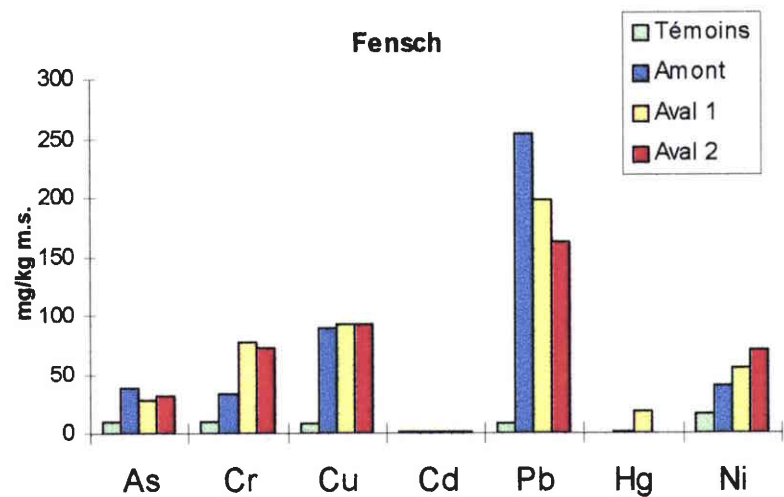


Figure 7 : Teneurs en métaux mesurées sur la fraction fine (< 1mm) des sédiments prélevés en amont et en aval des sources de pollution sur les différents sites de transfert ainsi que dans le site de référence. Les concentrations sont exprimées en mg/kg m.s..

site et plus particulièrement en **aval 2**, par rapport à la première étude de transfert menée trois mois plus tôt, au mois de juin 1995.

Les concentrations en HAPs atteignent 42, 24 et 16 mg/kg m.s. respectivement aux points **aval 2**, **amont** et **aval 1**. Concernant les PCBs, les taux les plus forts ont été mesurés en **amont** de la cokerie avec 2 mg/kg m.s., les sédiments des points **aval 1 et 2** contenant de l'ordre de 1,3 mg/kg m.s.. Le point **amont** n'est par conséquent pas exempt de contamination organique. Les niveaux de chlorophénols et de pesticides organochlorés sont comparables au site de référence pour tous les points considérés.

Les teneurs en métaux dans les sédiments sont du même ordre de grandeur en **amont** et en **aval** de la cokerie, et sont par rapport au site de référence :

- 3 à 4 fois plus élevées pour l'arsenic et le nickel
- 7 et 12 fois plus fortes pour le chrome et le cuivre
- 20 à 30 supérieures pour le plomb
- 368 fois plus importantes pour le mercure.

Les concentrations en chrome sont cependant doublées aux points **aval** ($\times 7$) par rapport au point **amont** ($\times 3$). Les taux de mercure sont nettement plus élevés en **aval 1** (18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.s.) comparé à l'**amont** (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.s.) et à l'**aval 2** (0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.s.), le mercure n'étant pas détecté dans le site de référence ($< 0,05$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.s.).

4.2.3.3 Site des Vosges

Les résultats des analyses physico-chimiques montrent que comme précédemment les sédiments du point **amont** ne sont pas dépourvus de contaminants organiques et minéraux. Les taux de HAPs les plus importants ont, en effet, été observés en **amont** (8,2 mg/kg m.s.) ; les PCBs ne sont pas négligeables également puisqu'ils sont présents à des taux de 83 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.s.. Les teneurs en métaux sont supérieures à celles reportées dans le site de référence :

- doublées pour l'arsenic
- 3 à 4 fois plus fortes pour l'étain et le cuivre
- 5 fois plus élevées pour le zinc
- de 10 à 13 fois plus importantes pour le cadmium, le plomb et le mercure.

Le niveau de contamination pour le point **aval 2** est comparable à celui du point **amont** pour les métaux, les taux de HAPs et PCBs sont néanmoins en moyenne 2 fois plus faibles.

Le point **aval 1** est le moins pollué des 3 sites par les HAPs (2,7 mg/kg m.s.) et les métaux mais le plus contaminé par les PCBs (386 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.s.). Les teneurs en métaux sont comparables au site de référence excepté pour le zinc, le cuivre et plomb dont les taux sont doublés et le mercure dont les concentrations sont multipliées par 4.

Pour les points **amont** et **aval**, les pesticides organochlorés et les chlorophénols contenus dans les sédiments sont à des niveaux similaires à ceux mesurés dans le site de référence.

4.2.3.4 Site du Lot et Garonne

Le site du Lot et Garonne est majoritairement contaminé par les métaux, les polluants organiques sont à des taux relativement faibles, comparé aux sites de la Fensch et des Vosges.

Le niveau de contamination du point **amont** est comparable à celui du contrôle pour les composés organochlorés (pesticides, chlorophénols, PCBs) et les métaux, à l'exception de l'arsenic et du plomb ($\times 2$), du zinc ($\times 3$), et du cadmium ($\times 7$). Les taux de HAPs sont doublés comparé aux sédiments du site de référence.

Les points **aval 1 et 2** sont contaminés par des taux équivalents de HAPs de l'ordre de 1,5 mg/kg m.s. soit 30 fois supérieurs au contrôle. Les concentrations de PCBs sont semblables à celles mesurées dans le site de référence. Les données physico-chimiques ont mis en évidence un gradient de contamination pour les métaux entre les points **aval 1 et aval 2** : les teneurs en métaux sont diminuées de moitié au point **aval 2**, le plus éloigné de la source de pollution, par rapport au point **aval 1**. En **aval 1**, les teneurs sont largement supérieures à celles du site de référence :

- 4 et 6 fois plus élevées pour le cuivre et l'arsenic
- 8 et 12 fois plus fortes pour l'étain et le plomb
- 26 fois supérieures pour le zinc
- 48 fois plus importantes pour le mercure
- 190 fois augmentées pour le cadmium.

Le site du Lot et Garonne a fait l'objet d'une seconde étude (octobre 97) au cours de laquelle des sédiments ont également été prélevés en amont et en aval de la source de contamination. Des sédiments ont été échantillonnés simultanément dans le site de référence. Les résultats des analyses physico-chimiques sont reportées en annexe IV. Les niveaux de contamination, à une année d'intervalle, sont du même ordre de grandeur pour le site témoin et pour le site pollué ; quelques changements ont néanmoins été observés :

- les taux de HAPs dans les sédiments du site de référence ont diminué de moitié et les teneurs en pesticides organochlorés sont inférieures aux limites de détection pour l'analyse d'octobre 97 ; les concentrations en métaux ont en moyenne doublé comparé à juillet 96 à l'exception du mercure dont les taux sont deux fois plus faibles,
- les taux de HAPs sont équivalents en amont et en aval 2, mais ils ont été multipliés par 4 en aval 1 pour la seconde étude. La contamination par les pesticides organochlorés est plus faible qu'en octobre 96. Comme pour le site de référence, les teneurs en métaux dans les sédiments du site du Lot et Garonne ont globalement augmenté aux points amont et aval : les teneurs sont de 1,3 à 4,3 fois plus élevées au moment de la seconde étude de transfert. Seul l'étain est présent à des concentrations moitié plus faibles dans les sédiments prélevés aux point amont et aval 1, les taux de mercure étant comparables en aval 2 pour les 2 études.

4.2.3.5 Site de la Sarthe

Les sédiments du point **amont** présentent des niveaux de contamination similaires au site de référence pour les composés organochlorés et les métaux sauf pour le mercure dont les taux sont triplés. Les concentrations en HAPs (361 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.s.) sont 7 fois supérieures à celles du site de référence.

Les teneurs en PCBs, de l'ordre de 260 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.s., sont comparables pour les **deux points en aval** ; les taux de HAPs, par contre, sont plus élevés en **aval 1** (807 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.s.) par rapport au point aval 2 (97 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.s.). Un gradient a été mis en évidence pour la pollution métallique entre les deux points aval. Les concentrations des métaux dans les sédiments prélevés en **aval 2** sont, en général, inférieures à celles reportées en **aval 1**, à l'exception du mercure dont la teneur est multipliée par 8. Les augmentations pour les teneurs en métaux en aval 1 comparé au site de référence sont d'un facteur :

- 4 pour le plomb
- 6 à 7 pour le chrome et le cuivre
- 31 pour le zinc
- 1590 pour le cadmium.

Les pesticides organochlorés et les chlorophénols contenus dans les sédiments des points **amont** et **aval** sont du même ordre de grandeur que dans le site de référence.

Dans le but de confirmer les premières analyses physico-chimiques, des sédiments ont été prélevés à nouveau pour analyse, aux points **amont** et **aval** (octobre 97). Les résultats de l'analyse physico-chimique sont présentés en annexe VI. Ils montrent que des taux comparables de contamination métallique ont été obtenus à l'issue du second échantillonnage. Seuls les taux de fer sont deux fois plus élevés aux points **amont** et **aval 2**, et quatre fois plus forts en **aval 1**. Quant à la pollution organique, la seconde analyse physico-chimique a montré que les sédiments récupérés au niveau des 3 points de transfert, étaient moins contaminés par les HAPs ($\times 0,6$ à $\times 0,3$) et les PCBs ($\times 0,1$ à $\times 0,06$).

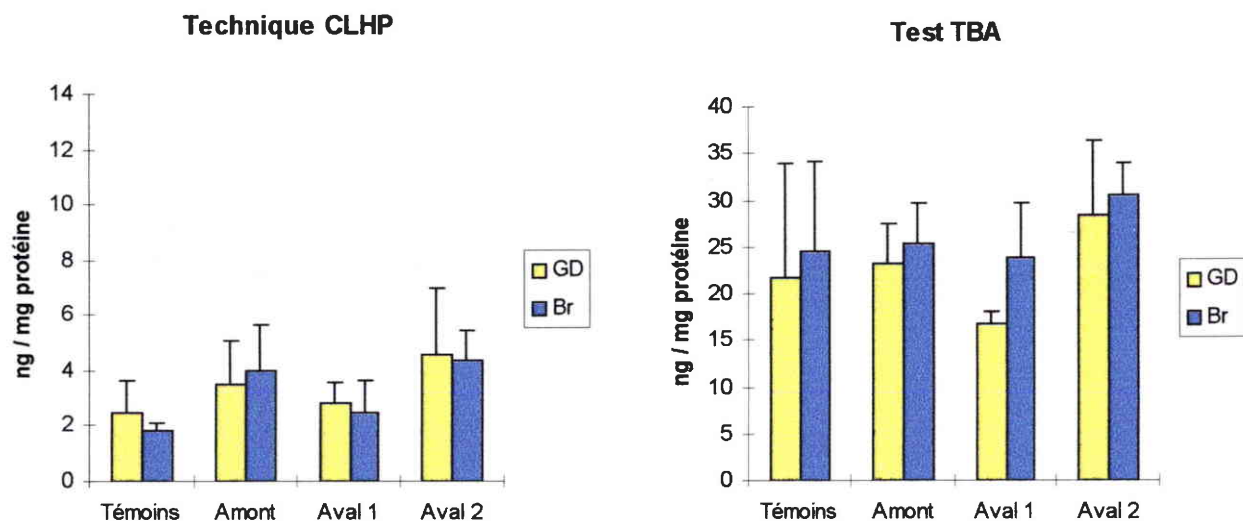


Figure 8 : Taux de MDA mesurés dans les glandes digestives et les branchies par la technique CLHP et le test TBA chez les bivalves transférés (n = 3) pendant une semaine dans le site de la Fensch (étude préliminaire). GD : glande digestive, Br : branchies.

	Amont		Aval 1		Aval 2	
	GD	Br	GD	Br	GD	Br
SeGPx	-	-	↓	↓	↓	-
Se ind.GPx	-	-	-	↑	-	-
GRd	-	-	↓	↓	↓	↓
Cat	-	-	-	-	-	-
SOD	-	-	-	-	-	-
GSH	-	-	↓	↓	↓	↓
GSSG	-	-	↓	-	-	↑

Table 1 : Modifications des paramètres antioxydants observées dans les glandes digestives (GD) et les branchies (Br) des bivalves transférés pendant 1 semaine sur le site de la Fensch (préliminaire). ↓ : diminution jusqu'à 55 % par rapport aux contrôles, ↓ : diminution comprise entre 55 et 84 % comparé aux contrôles, - : comparable aux contrôles.

4.2.4 Réponses des organismes transférés en terme de cytotoxicité et de génotoxicité

Les résultats présentés sur les figures 8 à 15 correspondent à la valeur moyenne des paramètres mesurés sur 5 individus placés au niveau de chaque point de transfert. L'écart-type indiqué correspond à la variabilité sur les 5 bivalves transférés. Chaque dosage a été effectué en duplicats pour le dosage du MDA et de la 8OHdG (annexes VII à XV). La significativité des différences entre les taux mesurés chez les bivalves encagés dans le site référence et ceux obtenus pour les individus transférés dans les sites contaminés a été déterminée par le *t*-test de Dunnett. Les tests évaluant la normalité des valeurs et l'analyse ANOVA ont été réalisés en premier lieu.

4.2.4.1 Site de la Fensch

- La première étude de transfert sur ce site a été un préliminaire pour lequel trois bivalves ont été encagés par point (amont, aval 1 et aval 2) pendant une semaine. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 8. Les données brutes sont répertoriées en annexe VII.

On remarque, tout d'abord, que les taux de MDA mesurés par le test TBA sont en moyenne 10 fois supérieurs à ceux quantifiés par la méthode CLHP dans les deux tissus. Aucune différence n'a été observée entre les taux de MDA estimés par le test TBA quelque soit le site de transfert considéré pour les branchies et les glandes digestives. De même, aucun changement significatif n'a été mis en évidence par la technique CLHP pour les bivalves transférés en amont ou en aval du rejet de la cokerie. Une tendance semble pourtant se dégager dans les branchies et les glandes digestives : la moyenne des concentrations en MDA est plus élevée pour les organismes placés en amont et en aval 2 par rapport aux bivalves encagés dans le site de référence ; un individu en aval 2, en particulier, possède des taux de MDA trois fois plus forts pour les deux organes comparé aux contrôles.

Le transfert des bivalves en amont et en aval du rejet d'une cokerie pendant une semaine n'a pas provoqué d'induction de la lipoperoxydation au niveau des glandes digestives et des branchies. Il faut remarquer, cependant, que le nombre d'individus transférés est relativement faible et il est possible que, compte-tenu de la variabilité inter-individus, des modifications plus marquées aient été observées en augmentant la taille de la population.

Les paramètres antioxydants mesurés chez les bivalves encagés en amont avaient des activités enzymatiques antioxydantes et des taux de glutathion similaires à ceux du site de référence (table 1). Par contre, les activités de la glutathion peroxydase sélénium dépendante (SeGPx) et de la glutathion réductase (GRd) ont diminué chez les organismes transférés en aval 1 et 2 ; au niveau hépatique, cette diminution est d'autant plus marquée que les individus sont proches du point rejet de la cokerie. Les contenus en glutathion réduit (GSH) se sont montrés plus faibles dans les deux organes aux deux points aval. Les taux de glutathion oxydé (GSSG) ont augmenté

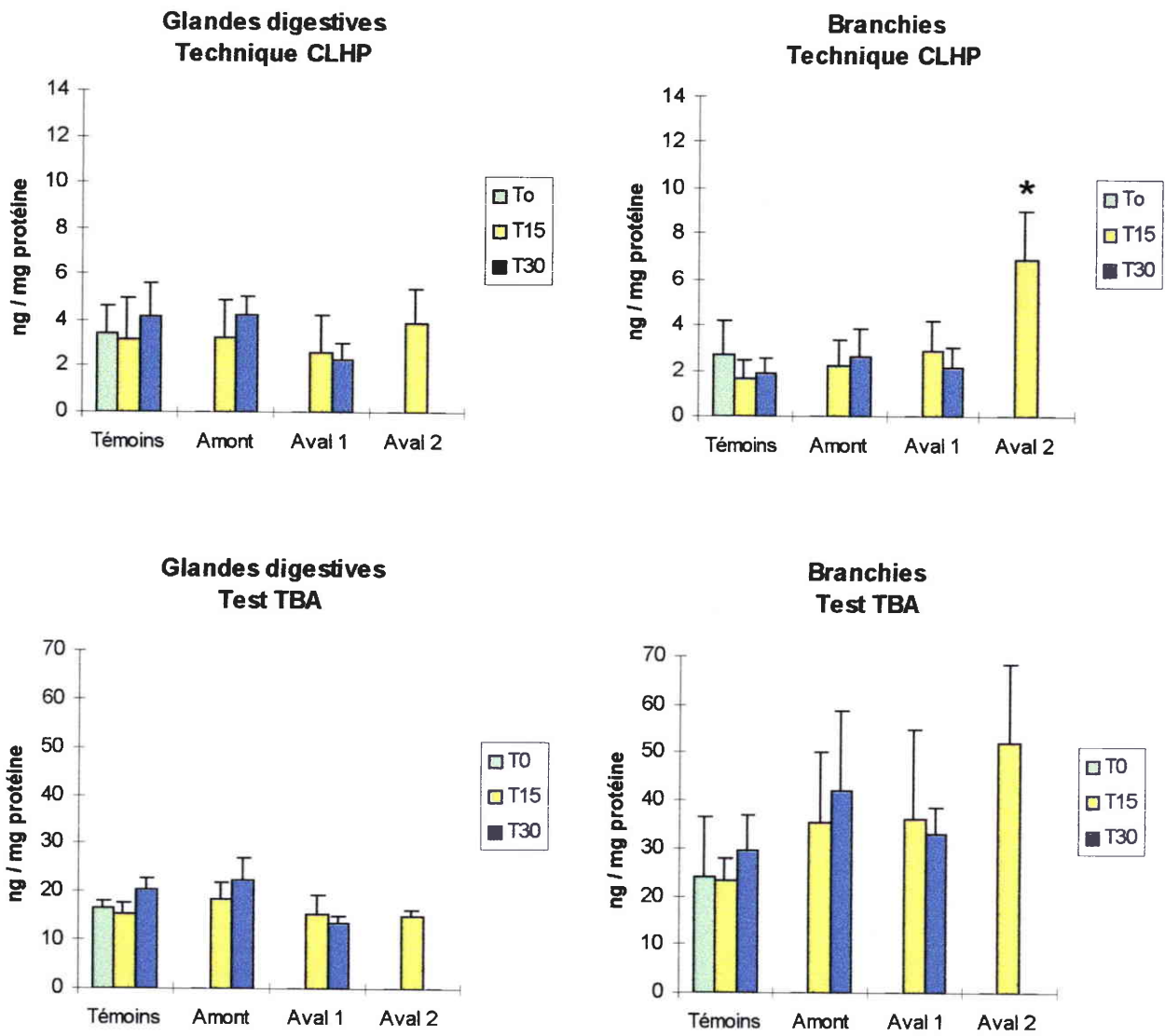


Figure 9 : Taux de MDA mesurés dans les glandes digestives et les branchies par la technique CLHP et le test TBA chez les bivalves transférés (n = 5) sur le site de la Fensch pendant 15 et 30 jours (seconde étude). Le symbole * indique une augmentation significative par rapport aux contrôles.

	Amont		Aval 1		Aval 2	
	GD	Br	GD	Br	GD	Br
SeGPx	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Se ind.GPx	-	-	-	↓ (↑)	↓	↓
GRd	-	↓	↓	↓	↓	↓
Cat	-	-	-	- (↑)	↓	↓
SOD	-	-	-	-	↓	↓
GSH	-	↓	↓	↓	↓	↓
GSSG	-	-	↓	- (↑)	-	↓

Table 2 : Modifications des paramètres antioxydants observées dans les glandes digestives (GD) et les branchies (Br) des bivalves transférés pendant 15 et 30 jours sur le site de la Fensch (seconde étude). Les changements à T₃₀ sont les mêmes que ceux reportés à T₁₅, excepté pour ceux indiqués entre parenthèses. ↓ : diminution jusqu'à 55 % par rapport aux contrôles, ↓ : diminution comprise entre 55 et 84 % comparé aux contrôles, - : comparable aux contrôles.

légèrement dans les branchies mais uniquement en aval 2. Les activités de la catalase et de la SOD sont restées inchangées.

Il semble par conséquent que les systèmes antioxydants soient restés suffisamment efficaces pour protéger les individus exposés aux polluants et empêcher le développement de la lipoperoxydation en dépit d'un certain degré de déplétion.

- Une seconde étude a été réalisée sur le même site trois mois plus tard, en y incluant l'influence du facteur temps : la durée d'exposition de 2 semaines, a été prolongée à 4 semaines afin d'étudier la toxicité à plus long terme et d'estimer si, au contraire, une adaptation des organismes et une réversibilité des effets pouvaient avoir lieu. Pour cette étude, cinq moules ont été placées dans chaque cage. Au moment de la collecte des bivalves sur le site de référence, 5 individus ont été immédiatement disséqués (T_0), et leurs tissus ont été congelés dans l'azote liquide. Les taux de MDA mesurés chez ces individus correspondent aux valeurs témoins au début de l'expérimentation. Ces valeurs ont été comparées aux niveaux de MDA chez les témoins engagés pendant 2 et 4 semaines dans le site de référence pour évaluer une quelconque variation pendant la durée de l'étude de terrain.

Les résultats, représentés sur la figure 9, indiquent en premier lieu, que les taux de MDA sont comparables pour les bivalves engagés dans le site de référence à T_0 et après 2 et 4 semaines (T_{15} et T_{30}), quelque soit la méthode de dosage utilisée.

Dans les branchies, les contenus en MDA sont équivalents en amont et en aval 1 et comparables aux taux reportés dans le site de référence pour le test TBA et la technique CLHP. En revanche, une induction de la lipoperoxydation a été mise en évidence par la technique CLHP en aval 2 à T_{15} dans les branchies, comme le montrent les taux augmentés de MDA : ils sont significativement 3 et 4 fois plus élevés respectivement par rapport à l'amont et au site témoin (annexes VIII et IX). Trois individus ont été particulièrement sensibles à l'exposition aux sédiments contaminés puisque leurs contenus branchiaux en MDA ont été multipliés par 4 en moyenne comparé au point amont. Une élévation des taux de MDA ($\times 1,6$ à $\times 2$) a été également enregistrée en aval 2 à T_{15} par le test TBA, mais elle n'est pas aussi marquée et par conséquent non significative statistiquement.

Au niveau des glandes digestives, les concentrations en MDA sont restées inchangées que les bivalves aient été placés en amont ou en aval de la source de pollution ; elles ne sont pas significativement différentes de celles des contrôles

Les paramètres antioxydants ont été dosés simultanément dans les tissus des mêmes organismes. Les résultats peuvent expliquer ceux obtenus pour les concentrations de MDA : les altérations les plus importantes des systèmes antioxydants ont été reportées chez les bivalves transférés en

aval 2 à T₁₅ et particulièrement dans les branchies, pour lesquelles la lipoperoxydation a été induite (table 2).

Les activités enzymatiques antioxydantes et les taux de glutathion n'ont pas varié chez les témoins mis en cage pendant toute la durée de l'expérimentation. Les paramètres antioxydants ont été peu altérés en amont du rejet de la cokerie. En aval, des profils de réponse comparables ont été observés pour les glandes digestives et les branchies, avec des effets néanmoins plus marqués au niveau branchial : en aval 1 et 2, les activités de la SeGPx et la GRd ainsi que les niveaux de GSH ont diminué. Les déplétions se sont révélées nettement plus accentuées en aval 2. Au point aval 2 à T₁₅, les activités de la SOD et de la catalase (Cat), pourtant plus résistantes, ont également diminué au niveau hépatique et branchial.

A T₃₀ au niveau branchial, une augmentation des activités de la catalase et de la glutathion peroxydase sélénium indépendante (Se ind.GPx) a été notée au point aval 1, ce qui peut refléter une réponse compensatoire des organismes face au stress induit par les sédiments contaminés.

Aucune modification significative des taux de MDA n'a été observée entre 2 et 4 semaines en amont et en aval 1. Nous n'avons pas de résultats pour les individus transférés en aval 2 à T₃₀ car les cages ont été volées à deux reprises sur le site. Une stimulation de la lipoperoxydation a été notée à T₁₅ et il aurait été intéressant de voir si elle se serait maintenue à T₃₀.

En résumé, la seconde étude réalisée sur le site de la Fensch a montré que :

- au niveau branchial, une augmentation significative des taux de MDA a été mise en évidence par la technique CLHP, pour les individus placés en aval 2 à T₁₅ ; l'induction de la lipoperoxydation dans les branchies a été associée à une forte déplétion de l'ensemble des enzymes antioxydantes et des taux de glutathion réduit. Il semble que les systèmes antioxydants aient atteint au niveau branchial un seuil d'affaiblissement tel qu'ils ne puissent plus protéger efficacement les bivalves exposés aux polluants et qu'ils permettent l'apparition de la peroxydation lipidique

- dans les glandes digestives, le transfert des bivalves en amont ou en aval de la cokerie n'a entraîné aucun changement dans les taux de MDA, quelque soit la méthode de dosage utilisée ; les réponses des différents paramètres antioxydants ont été également moins marquées au niveau hépatique que celles reportées au niveau branchial

- les niveaux de MDA n'ont pas été modifiés par la durée d'exposition (T₀, T₁₅ et T₃₀) chez les individus engagés dans le site de référence, en amont ou en aval 1 du rejet de la cokerie. Nous n'avons pu conclure quant à la réversibilité ou l'aggravation des effets en aval 2 à T₃₀ car les cages n'ont pas pu être récupérées.

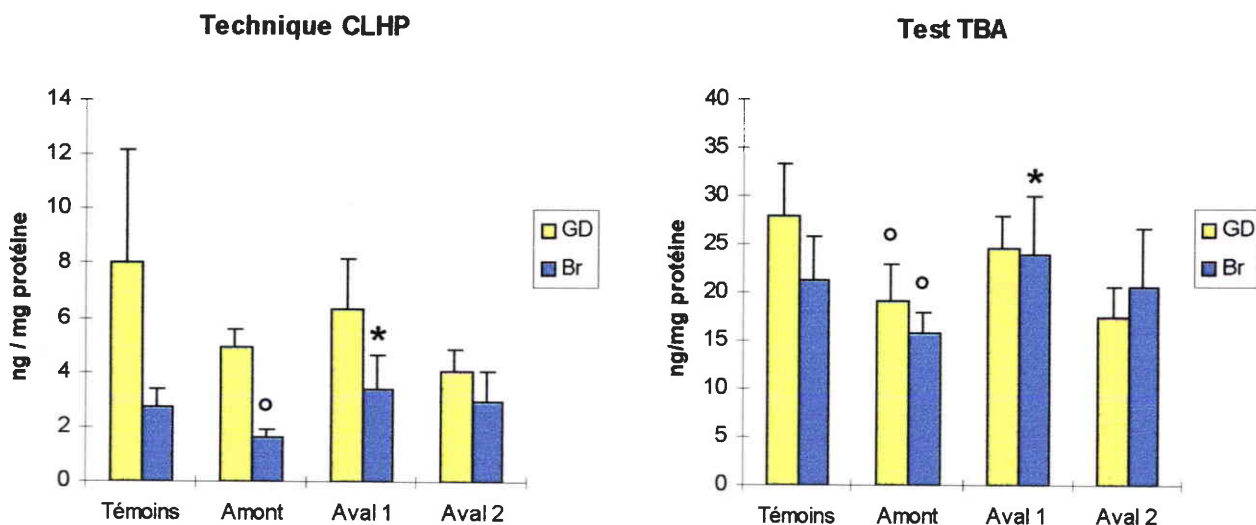


Figure 10 : : Taux de MDA mesurés dans les glandes digestives et les branchies par la technique CLHP et le test TBA chez les bivalves transférés pendant deux semaines dans le site des Vosges (n = 5). Le symbole * indique une augmentation significative par rapport à l'amont. Le symbole ° indique une diminution significative par rapport aux contrôles. GD : glande digestive, Br : branchies.

	Amont		Aval 1		Aval 2	
	GD	Br	GD	Br	GD	Br
SeGPx	-	-	↓	↓	-	↓
Se ind.GPx	-	-	↑	↑	↑	-
GRd	-	-	↓	↓	-	↓
GSH	-	-	↓	↓	↑	↓
GSSG	-	-	↑	↑	-	-

Table 3 : Modifications des paramètres antioxydants observées dans les glandes digestives (GD) et les branchies (Br) des bivalves transférés pendant deux semaines sur le site des Vosges. ↓ : diminution jusqu'à 55 % par rapport aux contrôles, ↓ : diminution comprise entre 55 et 84 % comparé aux contrôles, - : comparable aux contrôles.

4.2.4.2 Site des Vosges

Les organismes ont été transférés en amont et en aval de la blanchisserie - teinturerie pendant 2 semaines. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 10 et détaillés en annexe X.

Dans les branchies, le même profil de réponses a été obtenu pour les deux méthodes de détermination du MDA : les concentrations branchiales chez les bivalves transférés en aval 1 sont plus élevées, comparé au point amont ; la différence est plus accentuée pour la technique CLHP ($\times 2$) que pour le test TBA ($\times 1,5$). Aucune modification n'a été enregistrée chez les organismes placés en aval 2.

Les paramètres antioxydants (SeGPx, GRd, GSH) ont été diminués en aval 1 dans les deux tissus, mais de façon plus intense au niveau branchial comme pour le site de la Fensch (table 3). Ces altérations, plus marquées dans les branchies, sont associées à une induction de la lipoperoxydation. La déplétion des teneurs en GSH s'accompagne d'une augmentation du glutathion oxydé ; seule l'activité de la Se ind.GPx est stimulée en aval 1 dans les deux organes. En aval 2, au niveau branchial, les diminutions des activités de la SeGPx et de la GRd et des taux de GSH sont moins accentuées qu'au point aval 1 ; dans ce cas, les taux de MDA n'ont pas augmenté. Au niveau hépatique par contre, une élévation du contenu en GSH a été notée, et l'augmentation de l'activité de la Se ind.GPx observée en aval 1 s'est confirmée.

Dans les glandes digestives, les taux de MDA mesurés par le test TBA et la technique CLHP ne sont pas significativement différents chez les individus transférés en amont ou en aval de la source de contamination comparé au site de référence. La moyenne des concentrations de MDA dosées par CLHP en aval 1 est supérieure de 30 % à celle obtenue en amont : 4 bivalves sur 5 présentent des taux multipliés par 1,5 en moyenne, mais la différence n'est pas significative statistiquement pour l'ensemble du groupe.

En résumé, l'étude de transfert réalisée sur le site des Vosges a montré que :

- au niveau branchial, les concentrations de MDA ont augmenté chez les individus engagés en aval 1 comparé à l'amont. Ces variations ont été mises en évidence par les deux méthodes de dosage, mais elles sont plus accentuées pour la technique CLHP que pour le test TBA*
- les effets au niveau des paramètres antioxydants sont plus marqués dans les branchies par rapport aux glandes digestives, et particulièrement en aval 1 près du rejet de la blanchisserie-teinturerie. Les fortes diminutions des activités antioxydantes et des taux de glutathion réduit en aval 1 sont associées à une induction de la lipoperoxydation. En aval 2, les déplétions sont moins accentuées et la lipoperoxydation ne s'est pas développée*
- les taux de MDA n'ont pas été modifiés dans les glandes digestives des bivalves transférés en amont ou en aval de la source de pollution, quelque soit la méthode de dosage employée.*

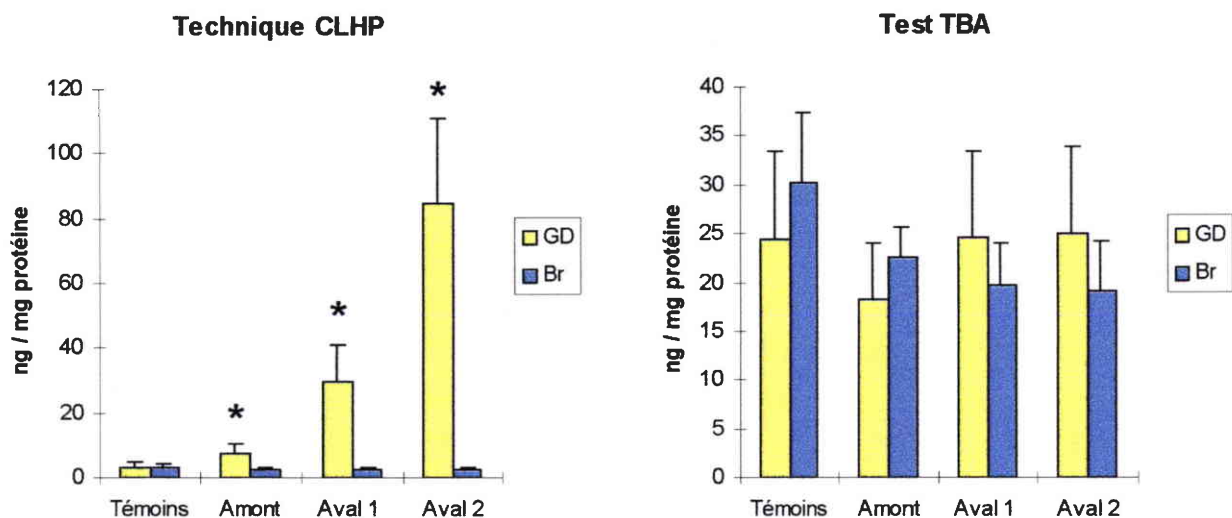


Figure 11 : Taux de MDA mesurés dans les glandes digestives et les branchies par la technique CLHP et le test TBA chez les bivalves transférés pendant deux semaines dans le site du Lot et Garonne (1^{ère} étude, n = 5). Le symbole * indique une augmentation significative par rapport aux contrôles. GD : glande digestive, Br : branchies.

	Amont		Aval 1		Aval 2	
	GD	Br	GD	Br	GD	Br
SeGPx	-	-	↓	↑	↓	-
Se ind.GPx	-	-	↓	-	-	-
GRd	-	-	↓	↓	↓	↓
GSH	-	-	↓	↑	↓	↑
GSSG	-	-	↓	↑	↑	↑

Table 4 : Modifications des paramètres antioxydants observées dans les glandes digestives (GD) et les branchies (Br) des bivalves transférés pendant 15 jours sur le site du Lot et Garonne (1^{ère} étude). ↓ : diminution jusqu'à 55 % par rapport aux contrôles, ↓ : diminution comprise entre 55 et 84 % comparé aux contrôles, - : comparable aux contrôles.

4.2.4.3 Site du Lot et Garonne

- Première étude de transfert (juillet 96)

De manière similaire au site des Vosges, les bivalves ont été exposés aux sédiments contaminés du site du Lot et Garonne pendant 2 semaines (figure 11, annexe XI).

Au niveau hépatique, de fortes augmentations des taux de MDA ont été reportées chez les organismes placés en amont, et aux deux points aval. Les contenus en MDA ont été multipliés par 2,6 au point amont par rapport au site témoin. Dans les glandes digestives des individus placés en aval 1, les taux de MDA sont 10 fois supérieurs à ceux du site de référence, l'augmentation est encore plus marquée en aval 2 puisqu'elle atteint un facteur 28. De telles stimulations de la lipoperoxydation n'ont été enregistrées que par la technique CLHP.

Des variations interindividuelles ont été mises en évidence : un organisme, parmi les 5 encagés en aval 1, avait un taux de MDA seulement doublé, tandis que les 4 autres avaient des taux multipliés par 12 en moyenne. L'induction de la lipoperoxydation était également plus ou moins forte en aval 2 selon les individus : elle varie de $\times 19$ à $\times 44$. En amont, les augmentations des taux de MDA sont comprises entre $\times 1,8$ et $\times 3,8$ par rapport au site de référence.

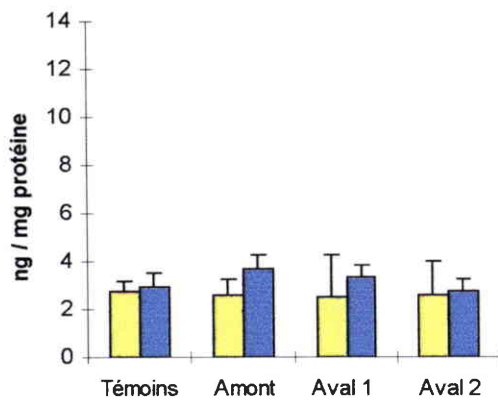
Ces inductions marquées de la lipoperoxydation ont été associées dans les glandes digestives à d'importantes altérations des paramètres antioxydants (table 4). Les activités de la SeGPx et de la GRd ainsi que les taux de GSH ont diminué très fortement dans les glandes digestives en aval 1 et en aval 2 ; une amplification des effets a été observée en aval 2 par rapport à l'aval 1, excepté pour la SeGPx : les diminutions en aval 2 de l'activité de la GRd et des taux de GSH atteignent respectivement 79 % et 75 % par rapport aux contrôles.

Aucune modification des taux de MDA n'a été enregistrée par contre dans les branchies que les bivalves aient été encagés en amont, près de la source de pollution (aval 1), ou plus en aval (aval 2). Concernant les paramètres antioxydants, seule l'activité de la GRd a diminué alors que l'activité de la SeGPx et les taux de GSH et de GSSG ont augmenté aux points aval ; les modifications ont tendance à être moins marquées en aval 2 sauf pour le GSSG.

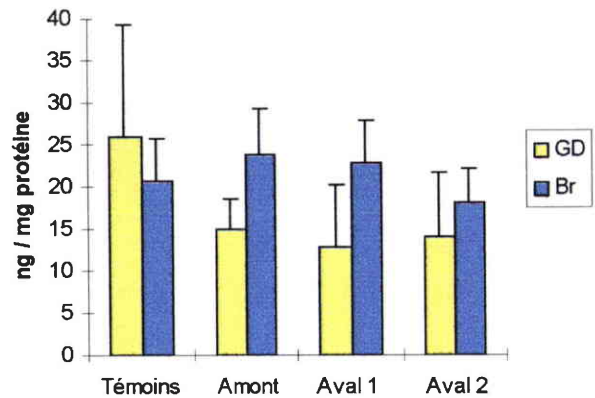
Nous retiendrons de cette première étude transfert sur le site du Lot et Garonne que :

- *de fortes augmentations des concentrations de MDA ont été reportées dans les glandes digestives des bivalves encagés près de la source de pollution (aval 1) et plus en aval (aval 2) ; les effets sont d'autant plus marqués que l'on s'éloigne de la source de contamination et la lipoperoxydation d'autant plus intense que l'activité des systèmes antioxydants est diminuée*
- *différents degrés d'induction de la lipoperoxydation ont été mis en évidence pour des bivalves exposés aux mêmes sédiments, ce qui reflète des différences de sensibilité, face à des conditions de stress identiques*
- *aucune modification des taux de MDA n'a été notée dans les branchies des organismes transférés en amont et en aval de la source de pollution par rapport au site de référence*

Technique CLHP



Test TBA



8OHdG

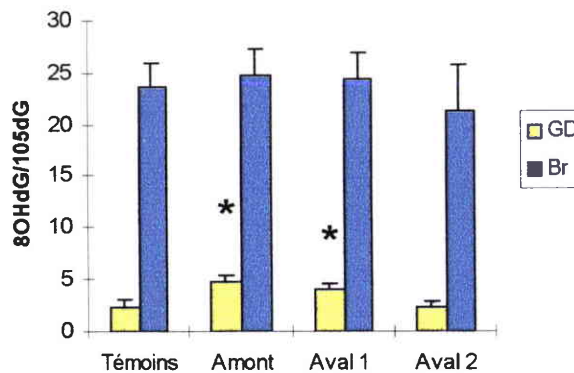


Figure 12 : Taux de 8OHdG et de MDA mesurés dans les glandes digestives et les branchies chez les bivalves transférés pendant deux semaines dans le site du Lot et Garonne (2^{ème} étude, 2^{ème} mise en cage) (n = 5 ou 7). Le symbole * indique une augmentation significative par rapport aux contrôles. GD : glande digestive, Br : branchies.

	Amont		Aval 1		Aval 2	
	GD	Br	GD	Br	GD	Br
SeGPx	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Se ind.GPx	↑	-	↓	↑	↓	-
GRd	↓	↓	↓	-	↓	-
GSH	↑	↓	↑	↓	↑	-
GSSG	↓	-	↓	↑	↓	↑

Table 5 : Modifications des paramètres antioxydants observées dans les glandes digestives (GD) et les branchies (Br) des bivalves transférés pendant 15 jours sur le site du Lot et Garonne (2^{ème} étude). ↓ : diminution jusqu'à 55 % par rapport aux contrôles, ↓ : diminution comprise entre 55 et 84 % comparé aux contrôles, - : comparable aux contrôles.

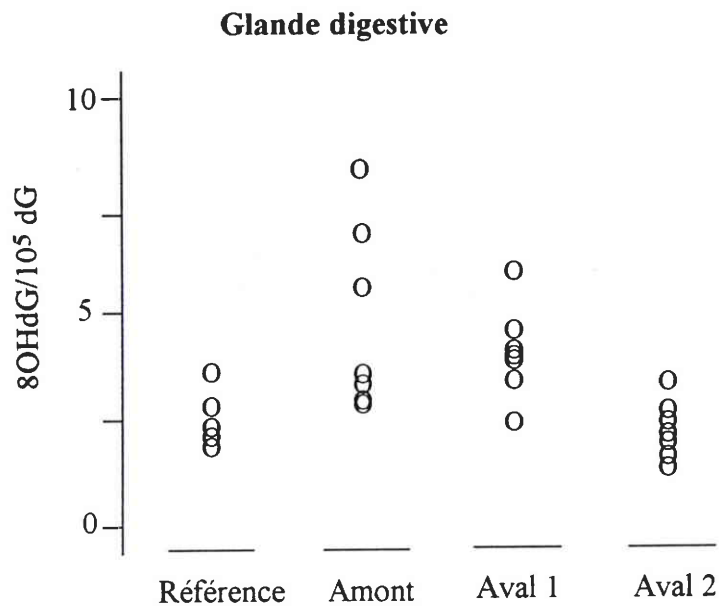


Figure 13 : Variabilité interindividuelle des taux de 8OHdG dans l'ADN de glande digestive des bivalves transférés pendant 2 semaines dans le site du Lot et Garonne (2^{ème} étude, 2^{ème} mise en cage).

- les teneurs en MDA hépatique et branchiale obtenues par le test TBA sont restées inchangées quelque soit le point de transfert.

- Seconde étude de transfert (octobre 1997)

Pour ce second transfert sur le site du Lot et Garonne, sept bivalves ont été engagés en amont et en aval de la source de contamination.

La détermination de la 8OHdG a été réalisée pour cette étude *in situ*. Les taux de 8OHdG mesurés chez les bivalves du site de référence sont comparables à ceux obtenus précédemment chez les témoins ayant servi à la validation de la technique CLHP-EC : ils sont respectivement de 2,4 8OHdG/10⁵dG et de 23,6 8OHdG/10⁵dG dans l'ADN de glande digestive et de branchies (figure 12, annexe XII et XIII). Le nombre de résidus de 8OHdG présents dans l'ADN branchial est toujours en moyenne 10 fois supérieur à celui reporté au niveau hépatique.

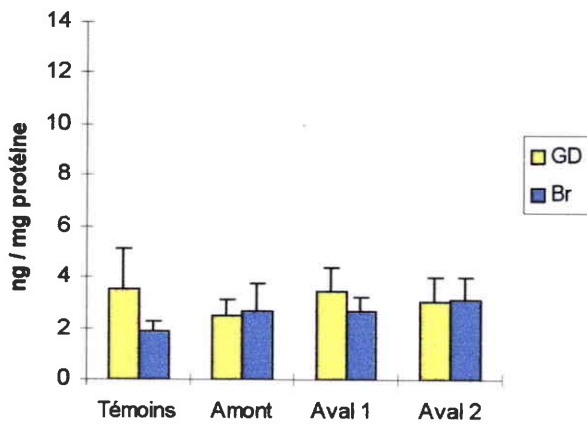
Un doublement des taux de 8OHdG a été reporté dans l'ADN hépatique des organismes transférés en amont et en aval près de la source de contamination. La stimulation de la production de la 8OHdG est plus ou moins accentuée selon les bivalves : les augmentations sont comprises entre $\times 1,5$ et $\times 3,5$ en amont, et entre $\times 1,5$ et $\times 2,5$ en aval 1. Certains individus se sont révélés plus résistants car leurs taux de 8OHdG ne sont pas différents des contrôles. La variabilité interindividuelle est la plus marquée pour les bivalves engagés en amont (figure 13).

Les niveaux de 8OHdG dans l'ADN branchial sont restés comparables aux niveaux de base mesurés chez les bivalves engagés dans le site de référence pour l'ensemble des points de transfert.

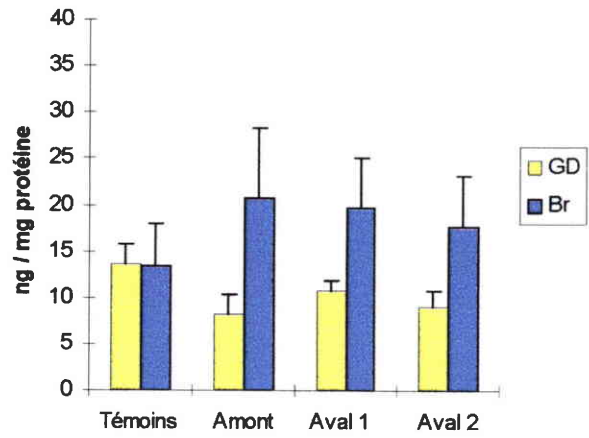
A l'issue des deux semaines d'exposition aux sédiments contaminés, aucune induction de la lipoperoxydation n'a été par contre observée dans les tissus des bivalves transférés en amont ou en aval de la source de pollution à la différence de la première étude sur ce site. Le test TBA et la technique CLHP ont fourni des résultats équivalents. Au niveau des glandes digestives seuls deux individus (l'un en aval 1 et l'autre en aval 2), présentaient des taux doublés de MDA comparé aux bivalves engagés dans le site témoin. Un bivalve sur les sept transférés en aval 2 a montré une induction par deux de la peroxydation lipidique au niveau branchial.

Les paramètres antioxydants mesurés simultanément sur les mêmes organismes sont concordants avec l'absence d'induction de la lipoperoxydation (table 5) : les activités enzymatiques antioxydantes et les taux de glutathion sont modérément altérés au niveau hépatique et peu affectés au niveau branchial chez les bivalves transférés dans le site. Dans les glandes digestives, les altérations les plus marquées ont été obtenues en amont avec des activités de la SeGPx et de la GRd diminuées en moyenne de 40 % tandis que l'activité de la Se indGPx a été doublée. L'activité de la SeGPx a également été réduite en aval 1 et aval 2 respectivement de 40 et 27 %. Les diminutions de l'activité de la GRd sont moitié moins fortes en aval 1 par rapport à l'amont. Pour l'ensemble des points amont et aval, une augmentation des taux de GSH (~ 37 %) associée

Technique CLHP



Test TBA



8OHdG

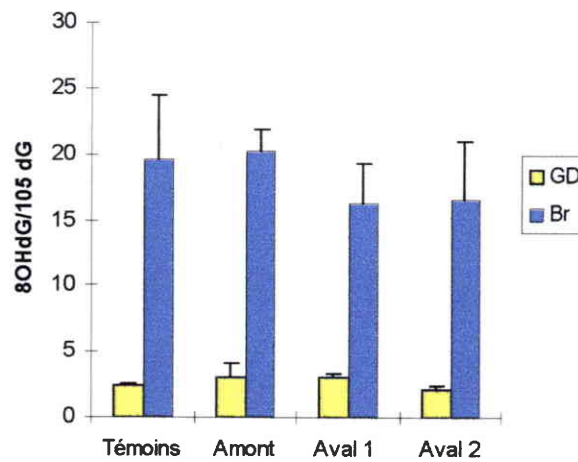


Figure 14 : Taux de 8OHdG et de MDA mesurés dans les glandes digestives et les branchies chez les bivalves transférés pendant deux semaines dans le site du Lot et Garonne (2^{ème} étude, 1^{ère} mise en cage) (n = 5). GD : glande digestive, Br : branchies.

à une diminution des taux de GSSG (~ 26 %) a été observée. Dans les branchies, les perturbations les plus importantes ont été enregistrées en amont de la fonderie : les activités de la SeGPx et de la GRd ont été diminuées de l'ordre de 25 % et les taux de GSH ont baissé de 15 %.

Une première tentative de transfert avait été effectuée 15 jours auparavant sur le même site : les bivalves utilisés n'avaient pas été transportés dans de bonnes conditions. Les individus après échantillonnage sur le site de référence ont été placés dans une glacière contenant du sable de Fontainebleau et de l'eau de l'étang additionnée d'algues mais des problèmes de transport étaient survenus, la glacière étant arrivée sans eau sur le lieu du transfert. Les tissus de ces bivalves ont cependant été récupérés, conservés et analysés.

Les résultats ont montré que des réponses comparables ont été obtenues pour les taux de MDA et de 8OHdG (figure 14, annexes XII et XIV). Les concentrations de MDA déterminées par le test TBA et la technique CLHP sont équivalentes à celles précédemment reportées et aucune modification n'a été observée en fonction des points d'encagement. Les mauvaises conditions de transport des individus n'ont par conséquent pas provoqué d'induction de la lipoperoxydation. Nous ne pouvons pas conclure quant à un éventuel effet sur les paramètres antioxydants car les dosages n'ont pas pu être effectués simultanément.

Les teneurs de 8OHdG dans l'ADN hépatique chez les bivalves transférés en amont et en aval 1 sont supérieures à celles obtenues pour les contrôles comme indiqué pour l'étude menée 15 jours plus tard, néanmoins ces différences ne sont pas significatives. Il est possible le stress occasionné par le transport ait pu provoquer une induction des systèmes de réparation de l'ADN expliquant une résistance plus prononcée des organismes.

En conclusion, les résultats de cette seconde étude sur le site du Lot et Garonne ont montré que :

- un doublement des taux de 8OHdG dans l'ADN hépatique a été indiqué chez les bivalves encagés en amont et en aval 1 comparé au site de référence*
- les glandes digestives ont été plus affectées par l'exposition aux sédiments contaminés que les branchies, comme pour la première étude*
- aucune induction de la lipoperoxydation n'a été mise en évidence dans les tissus des organismes transférés en amont et en aval de la source de pollution, quelque soit la méthode de détermination du MDA*
- les altérations des paramètres antioxydants ont été modérées et les modifications les plus marquées ont été enregistrées en amont et au niveau hépatique*

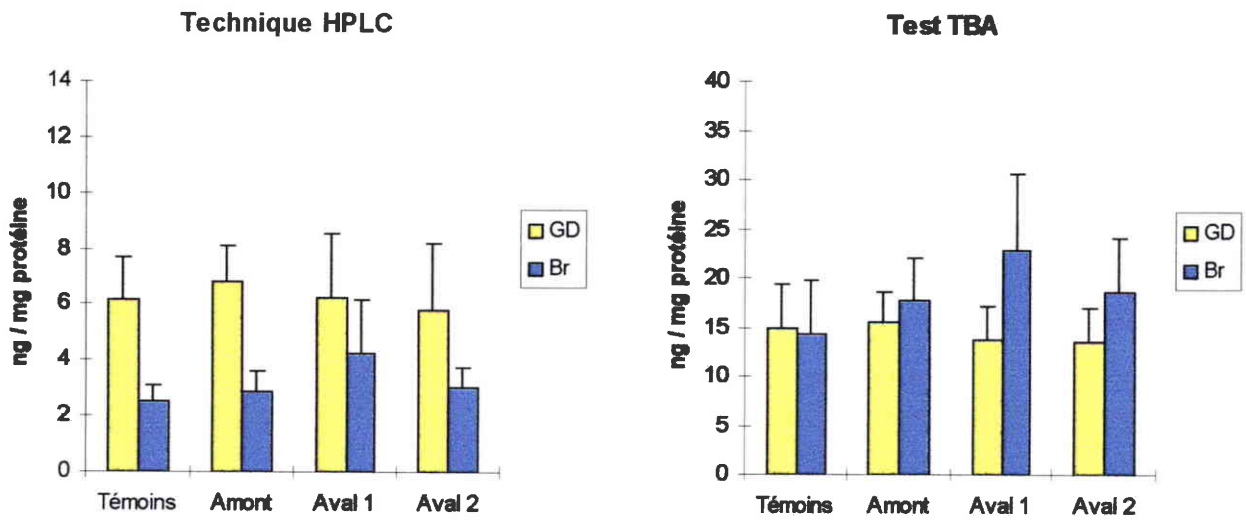


Figure 15 : Taux de MDA mesurés dans les glandes digestives et les branchies par la technique CLHP et le test TBA chez les bivalves transférés pendant deux semaines dans le site de la Sarthe (n = 5). GD : glande digestive, Br : branchies.

4.2.4.4 Site de la Sarthe

Les taux de MDA mesurés dans les tissus des bivalves transférés sur le site de la Sarthe sont restés similaires à ceux des bivalves encagés dans le site de référence (figure 15, annexe XV). Le test TBA et la technique CLHP n'ont mis en évidence aucune modification en amont ou en aval de la source de contamination. De même, aucune altération des paramètres antioxydants ne s'est produite, indépendamment du tissu considéré.

Seuls deux individus, l'un encagé en aval 1 et l'autre en aval 2, ont répondu différemment à l'exposition aux sédiments contaminés : au niveau hépatique, des augmentations des taux de MDA de l'ordre de $\times 1,7$ (CLHP) ont été associées à des diminutions des activités de la SeGPx (- 30 %) et de la GRd (- 48 %) ainsi qu'à des déplétions des taux de GSH (- 43 %) simultanément à une élévation des contenus en GSSG ($\times 2$). Les modifications dans les glandes digestives ont été accompagnées de perturbations au niveau branchial uniquement pour l'individu transféré en aval 1 : les contenus de MDA ont été multipliés par 3 parallèlement à une faible diminution des taux de GSH (- 10 %) et une augmentation des taux de GSSG (+ 22 %).

Les élévations des taux de MDA pour ces individus ont également été reportées par le test TBA mais sont de moindre ampleur : elles sont respectivement de $\times 1,4$ et $\times 2,5$ pour les glandes digestives et les branchies.

4.2.5 Analyse statistique : analyse en composantes principales (ACP)

Une ACP a été réalisée sur les données centrées réduites de l'ensemble des paramètres biologiques étudiés - MDA, paramètres antioxydants - et des analyses physico-chimiques pour les sites de la Fensch (seconde étude), des Vosges, et du Lot et Garonne (première étude). Les cercles de corrélation sont représentés en annexes XVIII-XXIII.

Concernant le site de la Fensch, le cercle des corrélations montre que dans les branchies, les taux de MDA sont inversement liés aux activités des enzymes antioxydantes et aux contenus en glutathion : nous avons précédemment observé que l'induction de la lipoperoxydation, reflétée par l'augmentation des taux de MDA, n'était observée que lorsque les paramètres antioxydants étaient fortement diminués. Les taux de MDA apparaissent par contre reliés aux concentrations de fluoranthène et benzo(b)fluoranthène : ces deux HAPs sont présents dans les sédiments du point aval 2 à des taux très supérieurs à ceux reportés au niveau des autres points de transfert, respectivement 23 mg/kg m.s. et 11 mg/kg m.s. C'est uniquement en aval 2 que les concentrations de MDA ont été multipliées par quatre par rapport aux contrôles. Ce lien n'est par conséquent pas surprenant. Les teneurs en chrome et en nickel et les taux de MDA évoluent également dans le même sens.

Dans les glandes digestives, seules les activités enzymatiques antioxydantes et les taux de glutathion sont fortement associés entre eux et inversement liés aux teneurs en fluoranthène, en benzo(b)fluoranthène, en nickel et en chrome. Le MDA n'est corrélé à aucun paramètre ou contaminant ; les taux de MDA mesurés dans les glandes digestives des individus transférés en amont et en aval de la source de pollution, sont effectivement similaires à ceux reportés chez les contrôles.

Dans les glandes digestives des organismes transférés dans le **Lot et Garonne (première étude)**, une association a été mise en évidence entre les taux de MDA et les concentrations en benzo(ghi)pérylène, l'indénopyrène. Les benzo(ghi)pérylène, l'indénopyrène sont les seuls HAPs parmi ceux mesurés, qui augmentent entre l'aval 1 et l'aval 2, les autres ont diminué ou sont restés comparables en aval 2 par rapport à l'aval 1. Ces deux composés suivent par conséquent l'intensification de l'induction de la lipoperoxydation observée entre le point aval proche de la fonderie et celui plus en aval. Comme pour le site de la Fensch au niveau branchial, le MDA est inversement corrélé aux paramètres antioxydants : nous avons constaté au cours de la première étude sur le site du Lot et Garonne que plus la lipoperoxydation était induite et plus la déplétion des systèmes antioxydants était accentuée.

Au niveau des branchies, de nombreux paramètres sont placés à l'intérieur du cercle de corrélations et proches du centre, ce qui rend les interprétations difficiles. Relativement peu de changements ont été obtenus pour les paramètres antioxydants dans les branchies suite à l'exposition aux sédiments contaminés.

Quant au site des Vosges, aucune corrélation n'a été notée entre le MDA et les paramètres antioxydants et les contaminants présents dans les sédiments quelque soit l'organe considéré. Les

taux de MDA ont pourtant augmenté en aval 1 dans les branchies comparé à l'amont. Les activités de la GRd et de la SeGPx, et les taux de GSH sont inversement reliées aux concentrations en PCBs dans les branchies. Une tendance similaire a été notée au niveau hépatique mais l'interprétation est délicate car les paramètres antioxydants sont relativement proches du centre du cercle de corrélation.

Les résultats de l'ACP ont confirmé dans la plupart des cas des relations qui avaient précédemment été observées dans les différents sites.

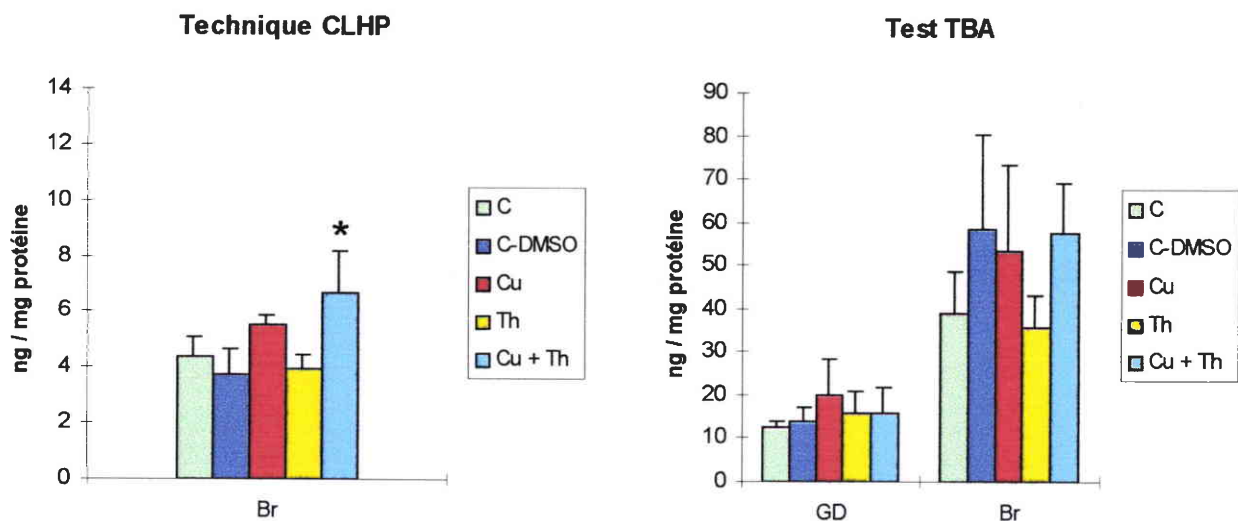


Figure 16 : Taux de MDA mesurés dans les glandes digestives et les branchies par le test TBA et la technique CLHP chez les bivalves exposés pendant 3 jours au cuivre ($30 \mu\text{g.l}^{-1}$) et/ou au thiram ($100 \mu\text{g.l}^{-1}$) ($n = 5$). Le symbole * indique une augmentation significative par rapport aux contrôles. GD : glande digestive, Br : branchies.

	Cuivre		Thiram		Cuivre + thiram	
	GD	Br	GD	Br	GD	Br
SeGPx	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Se ind.GPx	-	-	-	-	-	-
GRd	↓	↓	↓	↓	↓	↓
CAT	↓	↓	↓	↓	↓	↓
SOD	-	-	-	-	-	-
GSH	↓	↓	-	-	↓	↓
GSSG	↑	-	-	-	↓	↑

Table 7 : Modifications des paramètres antioxydants observées dans les glandes digestives (GD) et les branchies (Br) des bivalves exposés pendant 3 jours au cuivre ($30 \mu\text{g.l}^{-1}$) et/ou au thiram ($100 \mu\text{g.l}^{-1}$) ($n = 5$). Aucuns changements n'ont été mis en évidence chez les bivalves contrôles. ↓ : diminution jusqu'à 55 % par rapport aux contrôles, ↓ : diminution comprise entre 55 et 77 % comparé aux contrôles, - : comparable aux contrôles.

4.3 Intoxications au laboratoire

4.3.1 Protocole expérimental

Parallèlement aux essais précédents, des expériences avaient été conduites au laboratoire, afin de vérifier si l'exposition des bivalves à un stress chimique pouvait induire la lipoperoxydation.

Une étude de Vasseur *et al.* (1988) réalisée sur bactéries (*Photobacterium*) et sur protozoaires (*Colpidium campylum*) avait montré une synergie de toxicité du cuivre et des dithiocarbamates. L'hypothèse d'un stress oxydant à l'origine de cette toxicité avait été émise, le cuivre pouvant favoriser la production d'espèces radicalaires réactives, et les dithiocarbamates pouvant agir comme inhibiteurs de la CuZnSOD et provoquer une déplétion du glutathion (Babo et Vasseur, 1992). Les dithiocarbamates sont des chelateurs de métaux et ont été impliqués dans l'induction du stress oxydant chez les mammifères (Heikkila *et al.*, 1976 ; Goldstein *et al.*, 1979 ; Kelner et Alexander, 1986 ; Kelner *et al.*, 1989 ; Delmaestro et Trombetta, 1995)

Les concentrations retenues pour l'intoxication, suite à une étude préliminaire, sont les suivantes :

- 30 µg/l pour le cuivre (Cu²⁺), la CL₅₀ (96 heures) pour la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) étant de 80 µg/l (Siem *et al.*, 1984)

- 100 µg/l pour le thiram (bis-diméthylthiocarbamoyl disulfure). Des concentrations de 500 µg/l n'induisaient pas d'effet létal à court terme (72 heures) sur des vertébrés aquatiques (*Pleurodeles waltl*) (rapport final contrat SRETIE/ministère de l'environnement).

Il est à noter que ces concentrations ont entraîné la mort des organismes après 10 jours.

Les bivalves ont été prélevés en octobre 1994 sur le site de référence et placés en aquarium statique. Ils ont été exposés pendant 3 jours à l'eau contaminée par le cuivre, le thiram, ou l'association des deux toxiques. Le thiram a été introduit dans le milieu au moyen de DMSO (0,05 % dans le milieu). Deux milieux contrôles ont été préparés avec ou sans DMSO. Le renouvellement de l'eau a été effectué tous les jours. Après 3 jours d'exposition, les glandes digestives et les branchies ont été immédiatement disséquées et congelées dans l'azote liquide. Les taux de MDA ont été mesurés dans les homogénats de glande digestive et de branchies par le test TBA et par la technique CLHP.

4.3.2 Résultats

Deux essais ont été réalisés successivement :

(1) au cours du premier essai, les bivalves ont été exposés au cuivre seul, thiram seul et à l'association des deux toxiques. Les taux de MDA ont été quantifiés par le test TBA dans

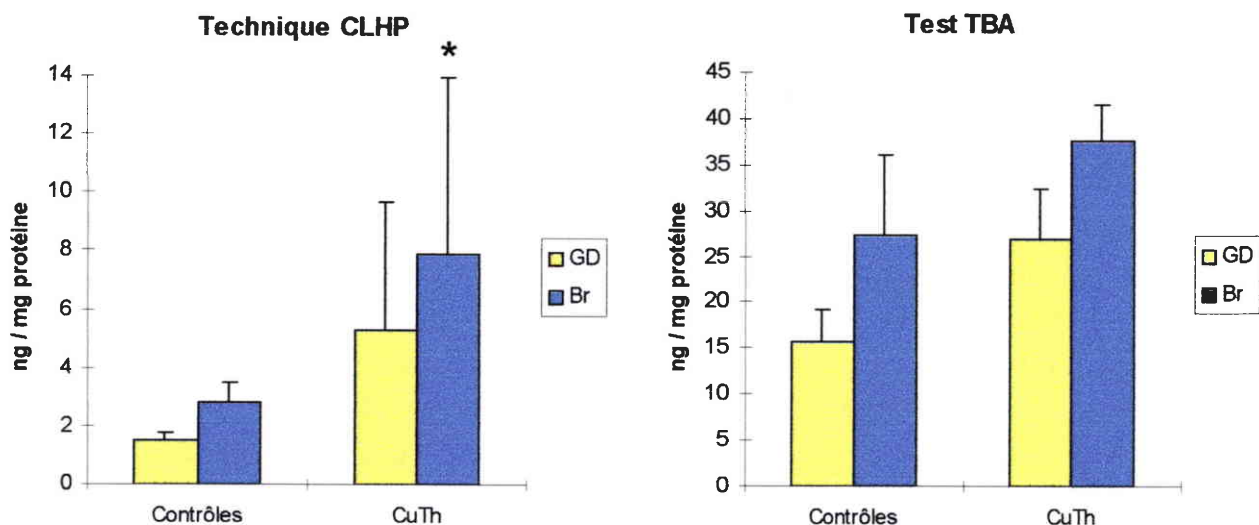


Figure 17 : Taux de MDA mesurés dans les glandes digestives et les branchies par le test TBA et la technique CLHP chez les bivalves exposés pendant 3 jours au cuivre ($30 \mu\text{g.l}^{-1}$) combiné au thiram ($100 \mu\text{g.l}^{-1}$) ($n = 5$). Le symbole * indique une augmentation significative par rapport aux contrôles. GD : glande digestive, Br : branchies.

	Contrôles		Cuivre + thiram	
	GD	Br	GD	Br
SeGPx	-	-	↓	↓
Se ind.GPx	-	-	-	-
GRd	-	-	↓	↓
CAT	-	-	-	-
GSH	-	-	↓	↓
GSSG	-	-	↓	↑

Table 6 : Modifications des paramètres antioxydants observées dans les glandes digestives (GD) et les branchies (Br) des bivalves exposés pendant 3 jours au cuivre ($30 \mu\text{g.l}^{-1}$) combiné au thiram ($100 \mu\text{g.l}^{-1}$) ($n = 5$). ↓ : diminution jusqu'à 55 % par rapport aux contrôles, ↓ : diminution comprise entre 55 et 80 % comparé aux contrôles, - : comparable aux contrôles.

les deux tissus mais la détermination des concentrations de MDA par CLHP n'a pu être effectuée que pour les branchies

(2) au cours du second essai, les bivalves ont été uniquement traités par le cuivre combiné au thiram. Les taux de MDA ont été mesurés dans ce cas, par le test TBA et la technique CLHP dans les glandes digestives et les branchies.

(1) Les deux groupes contrôles (avec ou sans DMSO) présentent des contenus en MDA comparables (figure 16). Dans les branchies, une augmentation significative des taux de MDA ($\times 1,5$) a été observée lorsque le cuivre et le thiram ont été associés par la technique CLHP : 4 bivalves sur 5 ont indiqué des valeurs de 1,2 à 1,9 fois plus élevées par rapport aux contrôles DMSO (annexe XVI). Les moyennes des taux de MDA des bivalves exposées au cuivre sont supérieures à celles des contrôles pour le test TBA ($\times 1,4$) et la CLHP ($\times 1,3$) mais les différences ne sont pas statistiquement significatives. Les concentrations branchiales de MDA des individus intoxiqués par le thiram sont équivalentes à celles mesurées dans les contrôles DMSO quelque soit la méthode utilisée. Une forte variation est cependant observable sur les valeurs des contrôles DMSO pour le test TBA, qui n'apparaît pas pour la technique CLHP.

Pour les glandes digestives, aucun changement significatif n'a été indiqué quelque que soit le traitement. Deux organismes sur les cinq intoxiqués ont présenté cependant des taux de MDA supérieurs aux contrôles pour l'exposition au cuivre ($\times 2,4$).

Au cours de ces intoxications, une évaluation des paramètres antioxydants a été réalisée simultanément par Carole Leguille-Cossu et Marie-Cécile Jacquin (table 6). Les résultats ont montré que les activités de la SeGPx et de la GRd ainsi que les taux de GSH ont diminué chez les bivalves intoxiqués par le cuivre, le thiram et l'association des deux toxiques. Les altérations observées ont toujours été plus marquées lorsque les bivalves ont été exposés au mélange du cuivre et du thiram. Dans les glandes digestives, une inhibition très forte de la SeGPx n'a été observée que lorsque les deux toxiques ont été combinés, indiquant des effets synergiques entre ces deux composés dans ce tissu. Les activités de la SOD sont restées inchangées quelque que soit le traitement, les activités catalasiques n'étant que peu affectées. Les effets sur les paramètres antioxydants ont été dans l'ensemble plus accentués au niveau branchial et notamment pour l'intoxication par le cuivre et le thiram, en accord avec les augmentations significatives des contenus en MDA dans ce tissu.

(2) Les résultats du second essai montrent que les contenus en MDA, mesurés par la technique CLHP, sont augmentés en moyenne de $\times 2,8$ à $\times 3,5$ respectivement dans les branchies et les glandes digestives des bivalves intoxiqués par rapport aux contrôles (figure 17, annexe XVII). Des différences interindividuelles ont été observées pour l'exposition aux mêmes toxiques (figure 18) :

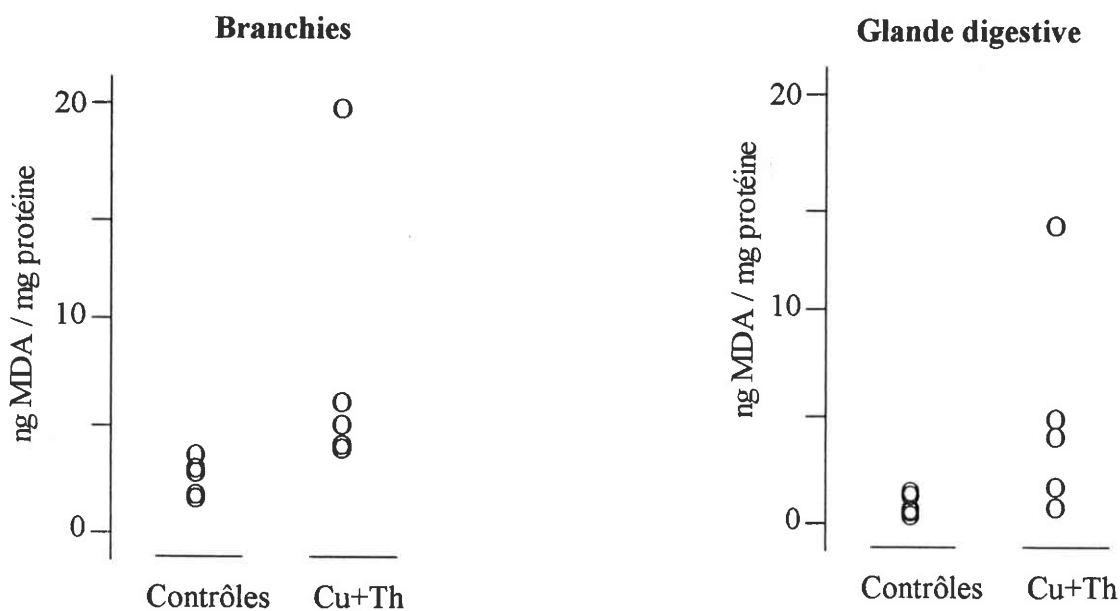


Figure 18 : Variabilité interindividuelle des taux de MDA dans les glandes digestives et les branchies des bivalves intoxiqués pendant 3 jours par le mélange du cuivre ($30 \mu\text{g.l}^{-1}$) et du thiram ($100 \mu\text{g.l}^{-1}$).

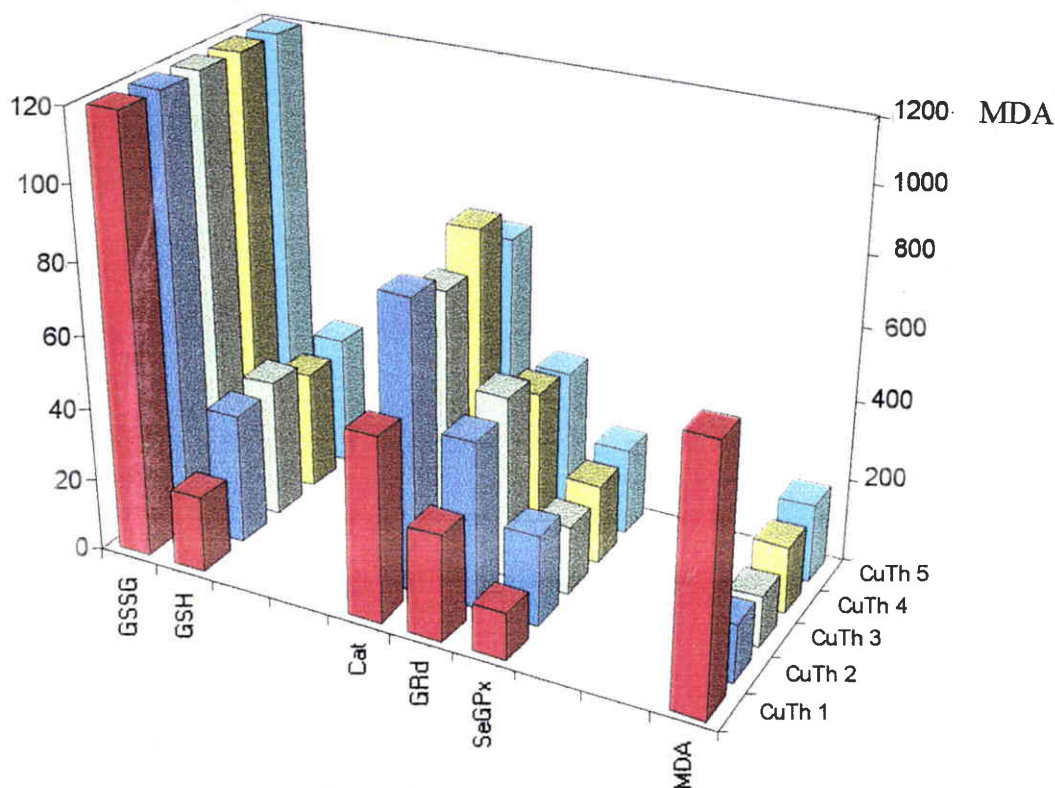


Figure 19 : Pourcentages d'activités enzymatiques antioxydantes et de taux de GSH, GSSG et MDA par rapport aux contrôles, déterminés dans les branchies des 5 bivalves exposés pendant 3 jours par le mélange du cuivre ($30 \mu\text{g.l}^{-1}$) et du thiram ($100 \mu\text{g.l}^{-1}$).

- pour les branchies, les taux de MDA ont été multipliés par 1,4 à 7,1 selon les organismes, les 5 bivalves présentant des taux plus élevés par rapport aux contrôles
- pour les glandes digestives, seuls 3 individus sur 5 ont vu leurs contenus en MDA augmentés de $\times 2,7$ à $\times 9,2$. Les stimulations de la peroxydation lipidique chez ces 3 organismes n'ont été pas suffisantes pour rendre la différence significative pour l'ensemble des individus exposés par rapport aux bivalves contrôles.

Les activités des enzymes antioxydantes et les taux de glutathion ont été mesurés comme précédemment. De manière similaire, les paramètres antioxydants ont été fortement diminués par l'exposition au cuivre combiné au thiram : les déplétions atteignent dans les branchies - 80 % pour l'activité de la SeGPx, -58 % pour l'activité la GRd et - 67 % pour les taux de GSH.

Un bivalve s'est révélé particulièrement sensible comparé aux autres à l'exposition au cuivre combiné au thiram : les taux de MDA étant respectivement 7,1 et 9,2 fois plus forts dans les branchies et la glande digestive comparé aux contrôles. Il est intéressant de préciser que ce bivalve (CuTh1) ayant exprimé la plus forte induction de la lipoperoxydation présentait simultanément les niveaux les plus faibles pour les paramètres antioxydants (figure 19).

Les résultats obtenus avec le test TBA vont dans le même sens que ceux fournis par la technique CLHP, les différences entre bivalves traités et contrôles sont cependant beaucoup moins marquées et non significatives statistiquement.

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

- *l'association du cuivre et du thiram a provoqué une augmentation des taux de MDA dans les glandes digestives et les branchies, traduisant une induction de la lipoperoxydation. La différence n'est cependant statistiquement significative que dans les branchies*
- *l'intensité de la réponse est variable selon les individus. Certains bivalves se sont montrés particulièrement sensibles à l'exposition aux deux toxiques : une forte induction de la lipoperoxydation s'étant accompagnée d'une intense déplétion des paramètres antioxydants*
- *le test TBA s'avère être une méthode beaucoup moins performante que la technique CLHP. Les variations sur les taux de MDA mesurés par le test TBA, entre organismes contrôles et intoxiqués, sont beaucoup moins marquées et non significatives quelque soit l'organe considéré. Il est regrettable que lors de la première série d'intoxications, l'analyse des échantillons hépatiques n'ait pas pu être faite par CLHP, il est probable que des modifications auraient été mises en évidence.*

En conclusion, les études de terrain et les expérimentations au laboratoire ont montré que le MDA et la 8OHdG pouvaient représenter des marqueurs sensibles et précoces des effets toxiques induits par les micropolluants et les substances chimiques.

Pour les études de transfert, les inductions de la lipoperoxydation ont été enregistrées après deux semaines chez les bivalves exposés aux sédiments contaminés.

Une relation a, d'autre part, été mise en évidence entre la lipoperoxydation et la déplétion des systèmes antioxydants analysés simultanément dans les tissus des organismes encagés en amont et en aval des différentes sources de pollution. Il est apparu que le processus délétère de peroxydation lipidique ne se développe que lorsque les altérations des paramètres antioxydants dépassent un certain seuil : la lipoperoxydation résulterait ainsi de l'affaiblissement de la défense antioxydante.

La seconde étude sur le site du Lot et Garonne a montré une augmentation des taux de 8OHdG bien que les activités des enzymes antioxydantes et les taux de glutathion soient modérément diminués : ce marqueur de génotoxicité pourrait se révéler plus précoce que le MDA.

Des relations entre l'induction de la lipoperoxydation et le niveau de contamination des sédiments ont été observées pour certains sites. Dans le cas de la Sarthe, par contre, aucun effet n'a été observé alors que la contamination des sédiments par les métaux était élevée. Ceci suggère un manque de biodisponibilité des micropolluants. Les questions de biodisponibilité peuvent être évoquées lors de la seconde étude de transfert sur le site du Lot et Garonne où les effets ont été beaucoup moins marqués qu'au cours de la première étude.

5 Discussion

5 Discussion

5.1 Niveaux de base de malonaldéhyde

5.2 Niveaux de base de 8OHdG

5.3 Etudes de terrain : réponses des paramètres biologiques

5.4 Relation entre l'induction de la lipoperoxydation et de la formation de la 8OHdG

5.5 Relation entre les variations des taux de MDA et de 8OHdG et les modifications des paramètres antioxydants

5.6 Relations entre les réponses biologiques observées et les niveaux de contamination des sites étudiés

Niveaux de base MDA	Technique HPLC		Test TBA	
	Glandes digestives	Branchies	Glandes digestives	Branchies
Intoxication cuivre / thiram (04/95)	—	4,4 ± 0,7	12,6 ± 1,3	39,1 ± 9,7
Intoxication cuivre / thiram (06/95)	1,5 ± 0,3	2,8 ± 0,7	15,7 ± 3,6	27,2 ± 8,9
Etudes de transfert				
Site de la Fensch (préliminaire) (06/95)	2,5 ± 1,2	1,8 ± 0,3	21,8 ± 12,1	24,6 ± 9,6
Site de la Fensch (09/95) (définitif)				
T ₀	3,4 ± 1,2	2,7 ± 1,5	16,5 ± 1,7	24,1 ± 12,6
T ₁₅	3,2 ± 1,8	1,6 ± 0,8	15,6 ± 2,1	23,3 ± 4,6
T ₃₀	4,2 ± 1,4	3,3 ± 0,8	20,4 ± 2,5	29,5 ± 7,6
Site du Lot et Garonne (07/96)	3,0 ± 1,8	3,3 ± 0,8	24,5 ± 8,9	30,1 ± 7,2
Site des Vosges (10/96)	8,1 ± 4,1	2,7 ± 0,7	27,9 ± 5,5	21,2 ± 4,6
Site de la Sarthe (10/96)	6,2 ± 1,5	2,5 ± 0,6	15,0 ± 4,3	14,3 ± 5,5
Site du Lot et Garonne (10/97)				
1 ^{ère} mise en cage	3,5 ± 1,6	1,9 ± 0,4	13,6 ± 2,2	13,3 ± 4,6
2 ^{ème} mise en cage	2,8 ± 0,4	2,9 ± 0,6	25,9 ± 13,5	20,8 ± 4,9
Moyennes	3,8 ± 1,8 3,0 ± 0,7*	2,6 ± 0,8	19,0 ± 5,1	24,3 ± 7,0

Tableau 1: Taux de MDA mesurés par le test TBA et la technique CLHP dans les glandes digestives et les branchies des bivalves contrôles au cours des expérimentations au laboratoire et des études de terrain (n = 5 excepté pour l'étude préliminaire de la Fensch (n = 3)). * moyenne calculée en excluant les valeurs des études des Vosges et de la Sarthe. Les taux de MDA sont exprimés en ng MDA/mg de protéine.

5 Discussion

5.1 Niveaux de base de malonaldéhyde

Les niveaux de base de MDA mesurés chez *Unio tumidus*, prélevés au niveau du site de référence et ayant servi aux études de transfert et aux expérimentations en laboratoire, sont présentés dans le tableau 1. Les taux de MDA dosés par CLHP sont en moyenne de $3,8 \pm 1,8$ et $2,6 \pm 0,8$ ng MDA/mg protéine, respectivement pour les glandes digestives et les branchies. L'écart-type relativement élevé pour les glandes digestives est lié aux études de transfert d'octobre 96 (Vosges et Sarthe), pour lesquelles les taux de MDA sont entre 2 et 2,5 fois plus forts chez les individus témoins par rapport à l'ensemble des autres études ; les études des Vosges et de la Sarthe font passer les moyennes de $3,0 \pm 0,7$ à $3,8 \pm 1,8$ ng MDA/mg protéine. Les contenus en MDA mesurés par le test TBA dans ces deux tissus sont 6 à 9 fois plus élevés pour les mêmes organismes comparé à la technique CLHP.

Les teneurs en MDA sont équivalentes au niveau branchial et hépatique quelque soit la technique de dosage utilisée. La variabilité entre individus a tendance néanmoins à être plus forte pour les glandes digestives par rapport aux branchies et particulièrement pour les études *in situ* : elle s'explique en général par des taux de MDA doublés ou triplés mesurés chez un individu parmi les cinq organismes analysés (cf. annexes VII - XV). Au cours de la première étude du Lot et Garonne, une concentration de $6,4 \pm 0,3$ ng MDA/mg protéine a été reportée chez un bivalve témoin, la moyenne étant de $2,1 \pm 0,5$ ng MDA/mg protéine pour les quatre autres. C'est le cas également pour les études *in situ* de la Fensch à T₀ ($5,1 \pm 0,4$ / $2,9 \pm 0,9$) et T₁₅ ($6,2 \pm 0,5$ / $2,2 \pm 0,6$), des Vosges ($15,2 \pm 0,1$ / $6,3 \pm 2,3$), et le second transfert dans le site du Lot et Garonne ($6,2 \pm 0,1$ / $2,9 \pm 0,9$). Nous avons vérifié que ces différences n'étaient pas associées au sexe des individus : des valeurs plus fortes peuvent être rencontrées chez les mâles, les femelles, ou les femelles porteuses de larves. Cette variabilité n'est pas aléatoire mais semble liée à des capacités de détoxification plus faibles vis à vis des systèmes oxydants.

Le tableau 2 regroupe les taux de MDA reportés dans la littérature chez différents vertébrés et invertébrés aquatiques. Pour la quasi - totalité des travaux, la mesure du MDA a été réalisée par le test TBA. Le plus souvent, le dosage a été effectué sur l'homogénat total des divers tissus bien que différentes fractions (S 9000g, S 66000g, microsomes) aient également été utilisées. Très peu d'auteurs, par contre, ont appliqué la technique CLHP pour la détermination du MDA. La comparaison des valeurs mentionnées est rendue parfois difficile en raison du manque d'homogénéité dans les unités employées par les différentes équipes. Pour faciliter la comparaison, nos données ont été exprimées en nM MDA/mg de protéine et en nM MDA/g de tissu (tableau 3).

Organismes	Méthode	Organes	Fractions	Concentrations de MDA			Auteurs
				nM/mg prot.	nM/g de tissu	autre unité	
Vertébrés aquatiques Poisson / marin <i>I. punctatus</i>	test TBA (Uchiyama et Mihara, 1978)	foie Br	homogénat total n = 96 n = 88			10 ⁻⁷ g / ml 1,67 ± 0,13 0,96 ± 0,09	Mather-Mihaich et Di Giulio 1986
	test TBA (Uchiyama et Mihara, 1978)	foie	homogénat total n = 4		34,0 ± 1,4		Di Giulio <i>et al.</i> , 1993
Poisson / marin <i>H. fossilis</i>	test TBA (Utley, 1967)	foie cerveau muscle rein	homogénat total n = 6			nM / 30 min. 0,16 ± 0,03 2,89 ± 0,09 0,303 1,90 ± 0,32	Bano et Hasan, 1989
Poisson / marin <i>L. limanda</i>	test TBA (Livingstone <i>et al.</i> , 1990)	foie	? n = 5		1,43 ± 0		Livingstone <i>et al.</i> , 1993
Poisson / marin <i>G. morhua</i>	test TBA (Livingstone <i>et al.</i> , 1990)	foie Br muscle vessie	homogénat total n = 3 à 9		34,3 ± 4,3 40,2 ± 3,2 3,1 ± 0,9 0 ± 0		Lemaire <i>et al.</i> , 1993b
Elasmobranches 2 requins 4 raies	test TBA (Ohkawa <i>et al.</i> , 1979)	GD Br rein	homogénat total n = 1, 3 ou 5		1500 à 4400 ± 150 400 à 1300 ± 700 300 à 1300		Wihelm-Filho et Boveris, 1993
Poisson / marin	test TBA (Buege et Aust, 1978)	foie	microsomes n = 6	10,7 ± 1,5			Thomas et Wofford, 1993
Poisson / marin <i>Mugil sp.</i>	test TBA (Gutteridge, 1984)	foie	S 31000g n = ?			absorbance 0,886	Rodriguez-Ariza <i>et al.</i> , 1993
Poisson / marin <i>S. aurata</i>	test TBA (Buege et Aust, 1978)	foie	S 66000g n = 4 pools de 5 tissus			absorbance 0,10 ± 0,01	Pedrajas <i>et al.</i> , 1995
Poisson / marin <i>O. labeo</i> <i>L. ramada</i> <i>M. auratus</i>	test TBA (Ohkawa <i>et al.</i> , 1979)	foie	S 19000g n = 14	1,0 ± 0,1	200 ± 15		Telli Karakoc <i>et al.</i> , 1997
Poisson / eau douce <i>C. carpio morpho L.</i>	test TBA (Placer <i>et al.</i> , 1966)	foie Br muscle *	? n = 4 à 5		34,6 ± 1,6 26,0 ± 4,5 12,2 ± 2,1		Radi et Matkovics 1988
Poisson / eau douce <i>L. cephalus</i>	test TBA (Gutteridge, 1984)	foie	S 105000g n = 12			absorbance / g 0,09 ± 0,06	Lenartova <i>et al.</i> , 1997
Poisson / eau douce <i>B. rerio</i>	test TBA (Livingstone <i>et al.</i> , 1990)	organisme entier	homogénat total n = 3 pools de 7	0,89 ± 0,06			Labrot <i>et al.</i> , 1997
Crabe / eau douce <i>B. guerini</i>	test TBA (Livingstone <i>et al.</i> , 1990)	foie Br	homogénat total n = 6		11,66 ± 1,21 5,41 ± 0,62		Venugopal <i>et al.</i> , 1997

Invertébrés aquatiques Bivalve / marin <i>M. demissus</i>	test TBA (Tanizawa <i>et al.</i> , 1981)	GD	homogénat total n = 2 à 4 pools de 2 tissus		97 ± 16		Wenning <i>et al.</i> , 1988
Bivalve / marin <i>M. galloprovincialis</i>	test TBA (Buege et Aust, 1978)	GD Br manteau muscle * pied	? n = 4 pools de 4 tissus		Mâles Femelles 77 ± 3 61 ± 1 41 ± 1 27 ± 2 47 ± 5 38 ± 6 7 ± 1 9 ± 1 1,3 ± 1 0,9 ± 0,2		Ribera <i>et al.</i> , 1989
	technique CLHP (Esterbauer <i>et al.</i> , 1984)	GD	n = 4 pools de 10 tissus		~ 85 à 260 (septembre à juillet)		Viarengo <i>et al.</i> , 1991a
Bivalve / marin <i>M. edulis</i>	test TBA	GD	homogénat total n = 5		9,1 ± 1,3		Livingstone <i>et al.</i> , 1990
	technique CLHP (Esterbauer <i>et al.</i> , 1984)	GD	? n = ?		76 ± 16 90 ± 10 132 ± 31		Viarengo <i>et al.</i> , 1991b
	test TBA (Livingstone <i>et al.</i> , 1990)	GD Br TR	homogénat total n = 5 pools de 4 tissus		10,3 ± 0,8 9,7 ± 0,8 7,4 ± 1,9		Ribera <i>et al.</i> , 1991
	test TBA (Livingstone <i>et al.</i> , 1990)	GD	homogénat total n = 6 pools de tissus		23,9 ± 2,2		Solé <i>et al.</i> , 1996
Bivalve / marin <i>M. yessoensis</i>	test TBA (Buege et Aust, 1978)	GD	microsomes n = ?	3,4 ± 0,1			Chemolin et Belcheva, 1992
Bivalve / marin <i>C. gallina</i> <i>R. decussatus</i> <i>C. gigas</i>	test TBA (Gutteridge, 1984)	organisme entier	S 31000g n = ?			absorbance 0,137 ± 0,008 0,012 ± 0,006 1,153 ± 0,008	Rodriguez-Ariza <i>et al.</i> , 1992
Bivalve / marin <i>R. decussatus</i>	test TBA (Livingstone <i>et al.</i> , 1990)	GD Br	S 9000g n = 10		18,8 ± 6,8 18,2 ± 2,8		Roméo-Gnassia et Barelli, 1997
Bivalve / eau douce <i>Corbicula sp.</i>	test TBA (Livingstone <i>et al.</i> , 1990)	organisme entier	homogénat total n = 3 pools de 7	0,80 ± 0,13			Labrot <i>et al.</i> , 1996
Gastropode /eau douce <i>P. corneus L.</i>	test TBA (Ohkawa <i>et al.</i> , 1979)	GD	microsomes n = ? pools de 3 à 4 tissus	7,5 ± 6,3			Klobucar <i>et al.</i> , 1997

Tableau 2 : Taux de MDA reportés dans la littérature chez des vertébrés et invertébrés aquatiques. GD : glande digestive, Br : branchies, TR : tissus restants, * : muscle blanc, S : surnageant.

	Technique CLHP				Test TBA			
	Glandes digestives		Branchies		Glandes digestives		Branchies	
Niveaux de base MDA	10 ⁻¹ nM / mg protéine	nM / g tissu	10 ⁻¹ nM / mg protéine	nM / g tissu	nM / mg protéine	nM / g tissu	nM / mg protéine	nM / g tissu
Intoxication cuivre/thiram (04/95)	-	-	0,61 ± 0,10	1,4 ± 0,2	0,18 ± 0,02	5,2 ± 0,5	0,54 ± 0,13	12,8 ± 3,2
Intoxication cuivre/thiram (06/95)	0,21 ± 0,4	0,74 ± 0,15	0,39 ± 0,10	0,9 ± 0,2	0,22 ± 0,05	7,8 ± 1,8	0,38 ± 0,12	8,9 ± 2,9
Etudes de transfert								
Site de la Fensch (06/95)	0,35 ± 0,16	1,3 ± 0,6	0,25 ± 0,04	1,0 ± 0,2	0,30 ± 0,17	11,2 ± 6,2	0,34 ± 0,13	14,3 ± 5,6
Site de la Fensch (09/95)								
T ₀	0,47 ± 0,17	1,7 ± 0,6	0,38 ± 0,21	1,4 ± 0,8	0,23 ± 0,02	8,4 ± 0,9	0,33 ± 0,18	12,2 ± 6,4
T ₁₅	0,44 ± 0,25	1,6 ± 0,9	0,22 ± 0,11	0,8 ± 0,4	0,22 ± 0,03	8,0 ± 1,1	0,32 ± 0,06	11,7 ± 2,3
T ₃₀	0,58 ± 0,19	2,1 ± 0,7	0,46 ± 0,11	1,7 ± 0,4	0,28 ± 0,03	10,4 ± 1,3	0,41 ± 0,11	14,9 ± 3,8
Site du Lot et Garonne (07/96)	0,42 ± 0,25	1,7 ± 1,0	0,46 ± 0,11	1,6 ± 0,4	0,34 ± 0,12	14,1 ± 5,1	0,42 ± 0,10	14,8 ± 3,5
Site des Vosges (10/96)	1,1 ± 5,7	4,7 ± 2,4	0,38 ± 0,10	1,3 ± 0,3	0,39 ± 0,08	16,1 ± 3,2	0,29 ± 0,06	10,3 ± 2,2
Site de la Sarthe (10/96)	0,86 ± 0,21	3,6 ± 0,9	0,35 ± 0,08	1,2 ± 0,3	0,21 ± 0,06	8,8 ± 2,5	0,20 ± 0,08	6,6 ± 2,5
Site du Lot et Garonne (10/97)								
1 ^{ère} mise en cage	0,49 ± 0,22	1,8 ± 0,8	0,26 ± 0,06	0,9 ± 0,2	0,19 ± 0,03	6,8 ± 1,1	0,18 ± 0,06	6,4 ± 2,2
2 ^{ème} mise en cage	0,39 ± 0,06	1,3 ± 0,2	0,40 ± 0,08	1,4 ± 0,3	0,26 ± 0,07	8,8 ± 2,4	0,34 ± 0,10	11,6 ± 3,2
Moyennes	0,53 ± 0,25	2,0 ± 1,1	0,36 ± 0,11	1,2 ± 0,3	0,26 ± 0,07	9,6 ± 3,0	0,34 ± 0,10	11,3 ± 2,9
	0,42 ± 0,10 *	1,5 ± 0,4 *						

Tableau 3 : Taux de MDA mesurés par le test TBA et la technique CLHP dans les glandes digestives et les branchies des bivalves contrôles au cours des expérimentations au laboratoire et des études de terrain (n = 5 excepté pour l'étude préliminaire de la Fensch (n = 3)). Les données sont exprimées en nM MDA / mg de protéine et en nM / g de tissu. * moyennes calculées en excluant les valeurs des études des Vosges et de la Sarthe.

Les taux de MDA obtenus chez *Unio tumidus* avec le test TBA, sont équivalents à ceux reportés dans les tissus de bivalves marins et d'eau douce témoins tels que *M. edulis* (Livingstone *et al.*, 1990 ; Ribera *et al.*, 1991 ; Solé *et al.*, 1996), *Corbicula sp.* (Labrot *et al.*, 1996), et *R. decussatus* (Romeo et Gnassia-Barelli, 1997). D'autres espèces de bivalves comme *M. galloprovincialis* (Ribera *et al.*, 1989), *M. yessensis* (Chemolin et Belcheva, 1992) ou *M. demissus* (Wenning *et al.*, 1988), ou de mollusques (Klobucar *et al.*, 1997) présentent des teneurs plus fortes. Selon les études, les taux mesurés dans les branchies sont inférieurs ou comparables à ceux des glandes digestives. Chez les vertébrés aquatiques, marins ou d'eau douce, les concentrations de MDA estimées dans divers tissus sont en général du même ordre de grandeur que chez les invertébrés aquatiques (Radi *et al.*, 1985 ; Radi et Matkovics, 1988 ; Di Giulio *et al.*, 1993 ; Lemaire *et al.*, 1993b ; Labrot *et al.*, 1996 ; Venugopal *et al.*, 1997). Des niveaux de base relativement faibles ont cependant été reportés dans les foies de *L. limanda* (Livingstone *et al.*, 1993) : ils sont comparables aux valeurs chez *U. tumidus* obtenues par la technique CLHP.

Les concentrations de MDA mesurées chez *Unio tumidus* par la technique CLHP sont entre 7 et 80 fois inférieures à celles indiquées par le test TBA dans les travaux précédents. De manière surprenante, Viarengo *et al.* (1991ab) qui ont réalisé le dosage du MDA par CLHP, ont reporté des valeurs comparables dans les glandes digestives chez *M. galloprovincialis* à celles de la méthode spectrophotométrique (Ribera *et al.*, 1989), et au moins 4 fois supérieures à celles de *M. edulis* (Livingstone *et al.*, 1990 ; Ribera *et al.*, 1991 ; Solé *et al.*, 1996). Il est évident que ces données peuvent être liées à la nature différente des sites dans lesquels les mêmes organismes ont été prélevés, mais des taux moins élevés auraient été attendus. Lopez-Torres et collaborateurs (1993) qui ont quantifié le MDA simultanément par les deux techniques chez diverses espèces de vertébrés, ont obtenu des niveaux 4 à 70 fois inférieurs par la technique CLHP en accord avec nos résultats. D'autres auteurs ont reporté de manière similaire une disparité entre les valeurs mesurées dans un même tissu selon la méthode employée (Behrens et Madere, 1991 ; Tiidus *et al.*, 1993 ; Liu *et al.*, 1997). Le test TBA représente au mieux une surestimation mais peut donc aussi donner des valeurs de lipoperoxydation erronées.

Nous avons observé au cours des études de transfert et des expérimentations au laboratoire que les modifications des taux de MDA se sont révélées toujours de moindre ampleur et par conséquent le plus souvent non significatives statistiquement pour la méthode spectrophotométrique. Un exemple plus parlant est celui de la première étude sur le site du Lot et Garonne pour laquelle des augmentations atteignant $\times 28$ ont été mises en évidence par la technique CLHP alors qu'aucun changement n'a été enregistré pour le test TBA.

La technique CLHP apparaît donc comme une méthode supérieure comparé au test TBA. Il est regrettable qu'elle ne soit pas appliquée plus fréquemment dans les études portant sur la peroxydation lipidique.

Niveaux de base 8OHdG	Glandes digestives	Branchies
Site du Lot et Garonne (10/97)		
1 ^{ère} mise en cage	2,45 ± 0,21	19,7 ± 4,9
2 ^{ème} mise en cage	2,41 ± 0,62	23,6 ± 2,2
Moyenne	2,43 ± 0,02	21,6 ± 2,0

Tableau 4 : Taux de 8OHdG mesurés dans l'ADN des glandes digestives et des branchies des bivalves issus du site de référence (n = 5). Les taux de 8OHdG sont exprimés en nombre de résidus 8OHdG/10⁵ dG.

5.2 Niveaux de base de 8OHdG

Les taux de base de 8OHdG mesurés dans l'ADN isolé des glandes digestives et des branchies d'*Unio tumidus*, issus du site de référence, sont présentés dans le tableau 4. L'hydroxylation en C8 de la guanine résultant du métabolisme normal, correspond à des taux de $2,43 \pm 0,02$ et $21,6 \pm 2,0$ 8OHdG/ 10^5 dG, respectivement au niveau hépatique et branchial (soit $6,1 \pm 0,1$ et $54,0 \pm 5,0$ 8OHdG/ 10^6 bases). L'ADN branchial d'*Unio tumidus* contient en moyenne 9 fois plus de résidus 8OHdG que l'ADN hépatique. Nous n'avons pas trouvé de donnée bibliographique concernant d'autres bivalves, ce qui ne nous permet pas de confirmer ou d'infirmer cette observation. Cette différence ne semble pas être due à un problème méthodologique car même en travaillant en conditions anaérobies les taux mesurés dans l'ADN branchial, bien que diminués, restent supérieurs à ceux de l'ADN hépatique.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour l'expliquer : il est possible d'une part, que le nombre et la nature des histones associées à l'ADN diffèrent, protégeant plus ou moins efficacement l'ADN de l'attaque des radicaux. L'activité transcriptionnelle pourrait être plus importante dans les cellules branchiales, dans ce cas l'ADN serait moins compacté le rendant plus accessible aux espèces radicalaires. Une autre possibilité est que la quantité de métaux de transition (fer et cuivre) fixés à l'ADN branchial soit plus importante, catalysant la production du radical hydroxyl et augmentant ainsi la formation de 8OHdG. Plusieurs études ont indiqué la présence des métaux de transition liés à l'ADN. Halliwell et Aruoma (1991) ont reporté que les ions cuivre sont présents dans les chromosomes. En utilisant des noyaux isolés de foie de rat et incubés avec des ions fer, Shires a clairement démontré la liaison de ^{59}Fe avec l'ADN (Hu et Shih, 1997). Enfin, il n'est pas exclu que les capacités de réparation soient moins importantes au niveau branchial. Les systèmes antioxydants sont, par exemple, globalement plus faibles dans les branchies par rapport aux glandes digestives chez *Unio tumidus*, en particulier pour la catalase, la glutathion peroxydase sélénium indépendante, et la glutathion réductase (Leguille-Cossu, 1996).

Des études structurales sur l'ADN hépatique et branchial d'*Unio tumidus* seraient nécessaires afin de mieux comprendre pourquoi l'ADN branchial est plus susceptible à l'oxydation en conditions physiologiques normales.

Divers travaux ont été reportés pour lesquels les taux de base de 8OHdG mesurés dans différents tissus de rat, ont été comparés : les teneurs en 8OHdG sont variables mais en général du même ordre de grandeur quelque soit l'organe à partir duquel l'ADN ait été isolé (foie, rein, cerveau, cœur, poumon, intestin, testicules) (tableau 5). En ce qui concerne les vertébrés aquatiques, la 8OHdG n'a été quantifiée le plus souvent qu'au niveau hépatique, à l'exception de l'étude de Nishimoto *et al.* (1991) pour laquelle aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les niveaux hépatique, rénal et sanguin chez *Parophrys vetulus* témoins.

Source de l'ADN	Isolement phénol	Nombre de résidus 8OHdG				Auteurs
		CPLC-EC		CG-SM		
		par 10 ⁵ dG	par 10 ⁶ bases	nM/mg ADN	par 10 ⁶ bases	
foie de rat ADN	+	0,9 - 6,1	2 - 15			Shigenaga <i>et al.</i> , 1990
	+	0,8 - 3	2 - 8			Shigenaga <i>et al.</i> , 1994
	+	1,7 ± 0,2	4 ± 1			Adachi <i>et al.</i> , 1995
	+ plus BHT	1,3 ± 0,3	8 ± 1			
	-	1,7 ± 0,6	4 ± 0,6			
	- plus BHT	1,1 ± 0,4	3 ± 0,7			
	+	1 - 6	2 - 10			Park <i>et al.</i> , 1989
	+ (sous argon)	1,4 - 3,6 *	3 - 8			Fraga <i>et al.</i> , 1990
	+	0,77 - 1,79*	2 - 4,5			Kaneno <i>et al.</i> , 1996
	-	1,08 ± 0,1	2,7 ± 0,4			
	-	1,17 ± 0,21	2,5 ± 0,5			
	- (sous argon)	1,3 ± 0,4	3 ± 1			Trischer <i>et al.</i> , 1996
	- (sous argon)	1,8 ± 0,6	4,5 ± 1,5			Kasai <i>et al.</i> , 1989
	-	0,39 ± 0,12	1 ± 0,3			Dalhaus et Appel, 1993
	- (sous azote)	1,06 ± 0,55	2,7 ± 1,4			Fiala <i>et al.</i> , 1989
	- (sous argon)	1,47 ± 0,12	3,7 ± 0,3			Kasai <i>et al.</i> , 1987
	- (sous azote)	1,5 ± 0,3	3,8 ± 0,8			Shen <i>et al.</i> , 1995
kit extraction	0,5	1,25			Yamaguchi <i>et al.</i> , 1996b	
kit extraction	0,26 - 0,30	0,7 - 0,8			Nakae <i>et al.</i> , 1995	
kit extraction	0,48 ± 0,15	1,2 ± 0,4			Umemura <i>et al.</i> , 1995	
Chromatine				0,1 ± 0,01	31,8 ± 3,2	Zastawny <i>et al.</i> , 1996
				0,07 ± 0,01	22 ± 2,8	Kasprzak <i>et al.</i> , 1997
RNA	-	0,82 ± 0,46	2 ± 1			Fiala <i>et al.</i> , 1989
Foie de souris						
ADN	-	0,2 ± 0,05	0,5 ± 0,1			Dalhaus et Appel, 1994
	+	20	50			Faux <i>et al.</i> , 1992
	- (nuclei)	0,9 - 1	2,2 - 2,5			Austin <i>et al.</i> , 1996
	- (sous argon)	0,6 - 1,4	1,5 - 3,5			Kasai <i>et al.</i> , 1986
	- (nuclei)	0,8 - 1,17	2 - 2,9			Parrish <i>et al.</i> , 1996
Rein de rat						
ADN	kit extraction	0,74 ± 0,07	1,9 ± 0,2			Umemura <i>et al.</i> , 1996
	kit extraction	0,37 ± 0,10	0,9 ± 0,3			Umemura <i>et al.</i> , 1995
	-	1,42 ± 0,29	3,6 ± 0,7			Sai <i>et al.</i> , 1991
	- (sous argon)	1,44 ± 0,38	3,6 ± 1			Kasai <i>et al.</i> , 1987
				0,11 ± 0,03	36 ± 9	Kasprzak <i>et al.</i> , 1997
	+	2,3 - 5,7*	6 - 14			Fraga <i>et al.</i> , 1990
	-	0,75 - 1,79*	1,9 - 4,5			Kaneno <i>et al.</i> , 1996
	kit extraction	0,5	1,25			Yamaguchi <i>et al.</i> , 1996a
	kit extraction	0,2	0,5			Yamaguchi <i>et al.</i> , 1996b
- plus BHT	1,21 ± 0,33	3 ± 1			Adachi <i>et al.</i> , 1995	
Cerveau						
ADN	+	2,0 ± 0,4	5 ± 1			Fraga <i>et al.</i> , 1990
	-	1,24 - 2*	3 - 5			Kaneno <i>et al.</i> , 1996
	- plus BHT	1,52 ± 0,17	3,8 ± 0,4			Adachi <i>et al.</i> , 1995

cœur						
ADN	-	1,0 - 2,0	2,5 - 5			Kaneno <i>et al.</i> , 1996
	- plus BHT	3,65 ± 0,39	9 ± 1			Adachi <i>et al.</i> , 1995
Poumon						
ADN	- plus BHT	2,45 ± 1,11	6 ± 3			Adachi <i>et al.</i> , 1995
Intestin						
ADN	+	1,7 - 2,6	4 - 6,5			Fraga <i>et al.</i> , 1990
Testicules						
ADN	+	2,4 ± 0,1	6 ± 2,5			Fraga <i>et al.</i> , 1990
	- plus BHT	0,92 ± 0,16	2,3 ± 0,4			Adachi <i>et al.</i> , 1995
Leucocytes humains						
ADN	-	0,17 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,20 - 0,23	63,6 - 73,14	Collins <i>et al.</i> , 1996 Malins et Haimanot, 1991
	- ou +	3,9 ± 0,25	9,8 ± 0,6			Degan <i>et al.</i> , 1995
	-	1,52 ± 0,45	3,8 ± 1,1			Marczynski <i>et al.</i> , 1997
	- (sous argon)	3,74 ± 1,62	9,3 ± 4,1			Liu <i>et al.</i> , 1996b
	kit extraction	0,33 ± 0,08	0,8 ± 0,2			Kiyosawa <i>et al.</i> , 1990
	kit extraction	0,31 ± 0,16	0,8 ± 0,4			Asami <i>et al.</i> , 1996
	-	< 3,82	< 10			Floyd <i>et al.</i> , 1986b
	kit extraction	3,46 ± 1,80	8,7 ± 4,5			Inoue <i>et al.</i> , 1993
Thymus de veau						
ADN		230	575			Mauthe <i>et al.</i> , 1995
		3 - 128	7,5 - 320			Floyd <i>et al.</i> , 1989
		3,7 ± 0,3	9 ± 0,8			Wei <i>et al.</i> , 1996
		22 ± 2	55 ± 5			Floyd <i>et al.</i> , 1988
		10	25			Faux <i>et al.</i> , 1992
		5	12,5			Tsou <i>et al.</i> , 1996
		21 ± 4,6	53 ± 12			Shi <i>et al.</i> , 1995
		80 ± 20	200 ± 50			Howden et Faux, 1996
		6	15			Park et Floyd, 1992
		5,35 ± 0,95	13 ± 2			Nagai <i>et al.</i> , 1995
				0,49 ± 0,10	156 ± 32	Aruoma <i>et al.</i> 1989 a
				0,43 ± 0,04	137 ± 13	Aruoma <i>et al.</i> 1989 b
				1,0 ± 0,1	318 ± 32	Aruoma <i>et al.</i> 1991a

Tableau 5 : Taux de 8OHdG reportés dans la littérature dans l'ADN de divers vertébrés terrestres, dans les leucocytes humains et dans l'ADN de thymus de veau. + : extraction au phénol, - : extraction sans phénol, * accumulation avec l'âge.

Source de l'ADN	Isolement	Nombre de résidus 8OHdG				Auteurs
		CPLC-EC		CG-SM		
		par 10 ⁵ dG	par 10 ⁶ bases	nM/mg ADN	par 10 ⁶ bases	
Bivalve/marin <i>M. edulis</i> GD	sans phénol (n = 5)	23,3 ± 6,4 36 ± 15	58 ± 16 90 ± 38			Marsch <i>et al.</i> , 1993
Poisson / marin <i>P. vetulus</i> foie	sans phénol (n= 9 pools de 2)	0,04 ± 0,01 0,01 ± 0,01	0,1 ± 0,02 0,02 ± 0,02			Nishimoto <i>et al.</i> , 1991
	? (n = 5) sous N ₂			0,13 ± 0,06	41 ± 19	Malins et Hai- manot, 1990b
	? (n = 7) sous N ₂			2,1 ± 0,9	668 ± 286	Malins <i>et al.</i> , 1996
Poisson / marin <i>L. limanda</i> foie	phénol (n = 3)	32 ± 10	80 ± 25			Chipman <i>et al.</i> , 1992
		36 ± 14	90 ± 35			
		41 ± 14	103 ± 35			
		28 ± 4	70 ± 10			
Poisson / marin <i>L. limanda</i> foie	phénol (n = 15)	3,8 (1,5 - 11)	9,5 (3,8 - 28)			Eufemia <i>et al.</i> , 1997

Tableau 6 : Taux de 8OHdG reportés dans la littérature chez divers vertébrés et invertébrés aquatiques.

Les concentrations de 8OHdG reportées chez différents vertébrés et invertébrés aquatiques sont présentées dans le tableau 6. Les niveaux de base dans l'ADN de glande digestive de *Mytilus edulis* sont de 10 à 15 fois plus élevés que ceux mesurés chez *Unio tumidus* et correspondent mieux aux valeurs obtenues dans l'ADN branchial (Marsch *et al.*, 1993). Une variabilité interindividuelle plus marquée a également été relevée. Le fait que dans notre cas, l'ensemble du protocole d'isolement et d'hydrolyse de l'ADN ait été réalisé sous atmosphère d'azote, peut expliquer en partie cet écart, une différence inter-espèce n'étant pas exclue. Les taux de base de MDA mesurés par le test TBA dans les tissus de *Mytilus edulis* sont pourtant comparables à ceux quantifiés chez *Unio tumidus*.

Les valeurs de 8OHdG reportées chez les vertébrés aquatiques pour un même type d'ADN sont relativement variables selon les auteurs ce qui rend la comparaison difficile : le nombre de résidus de 8OHdG dans l'ADN hépatique sont compris entre $0,02 \pm 0,02$ et 103 ± 35 8OHdG/ 10^6 bases lorsque la 8OHdG est dosée par CLHP-EC, et entre 41 ± 19 et 668 ± 286 8OHdG/ 10^6 bases pour la technique CG-SM (tableau 5). Les niveaux de base chez *Parophrys vetulus* mesurés par Nishimoto *et al.* (1991) sont particulièrement faibles tandis que ceux évalués par Malins *et al.* (1996) sont très élevés. Seuls les taux indiqués dans l'ADN de foie de *Ameriurus nebulosus* (Eufemia *et al.*, 1997) sont proches de ceux que nous avons obtenu dans les glandes digestives de *Unio tumidus*.

Une observation similaire peut être faite en ce qui concerne les vertébrés terrestres : les niveaux de base de 8OHdG déterminés par CLHP-EC dans les cellules et les tissus sont compris entre $0,4 \pm 0,2$ et 50 8OHdG/ 10^6 bases. Les taux de 8OHdG dans l'ADN de foie de rat varie de $0,7 \pm 0,03$ à 15 8OHdG/ 10^6 bases selon les auteurs. L'ADN commercial de thymus de veau, utilisé fréquemment dans les études *in vitro* contient beaucoup plus de 8OHdG que l'ADN fraîchement isolé de cellules ou de tissus. Floyd *et al.* (1989) ont reporté des valeurs dans une gamme de 8 à 320 8OHdG/ 10^6 bases selon le batch utilisé. Les raisons de ces variations ne sont pas encore élucidées mais il semble que les différentes techniques d'isolement de l'ADN puissent être impliquées (Floyd *et al.*, 1990b ; Dalhaus et Appel, 1993 ; Cahill *et al.*, 1997). Des résultats contradictoires ont été publiés au sujet de l'induction de la formation de la 8OHdG par l'utilisation de phénol pendant l'isolement de l'ADN. Claycamp (1992) a conclu que l'extraction par le phénol pouvait entraîner une surestimation (jusqu'à 20 fois) des taux de 8OHdG dans les échantillons exposés à l'air. Certains auteurs ont estimé que l'isolement de l'ADN par la technique à la pronase E (sans phénol) (Adachi *et al.*, 1995 ; Finnegan *et al.*, 1996) ou par des kits d'extraction (Nakae *et al.*, 1995 ; Yamaguchi *et al.*, 1996ab) permettait de réduire les niveaux de bases de 8OHdG mesurés dans les contrôles bien que les résultats de Nakajima *et al.* (1996) ne le confirment pas. D'autres groupes ont montré que l'utilisation de phénol de haute pureté et fraîchement distillé prévenait une formation artificielle de 8OHdG et qu'aucune différence dans les taux de 8OHdG n'était observée en comparant différents protocoles d'extraction sur le même échantillon (avec ou sans phénol) (Kasai *et al.*, 1986 ; Fraga *et al.*, 1990 ; Harris *et al.*, 1994 ; Shigenaga *et al.*, 1994 ; Degan *et*

Sites	Paramètres	Amont		Aval 1		Aval 2	
		GD	Br	GD	Br	GD	Br
La Fensch (définitif)	MDA	-	-	-	-	-	× 4
Les Vosges	MDA	-	-	-	× 2 *	-	-
La Sarthe	MDA	-	-	-	-	-	-
Le Lot et Garonne							
1 ^{ère} étude	MDA	× 2,6	-	× 10	-	× 28	-
2 ^{ème} étude (2 ^{es} essai)	MDA	-	-	-	-	-	-
	8OHdG	× 2	-	× 1,7	-	-	-
2 ^{ème} étude (1 ^{ème} essai)	MDA	-	-	-	-	-	-
	8OHdG	× 1,2 [◇]	-	× 1,2 [◇]	-	-	-

Tableau 7 : Modifications reportées dans les taux de MDA et de 8OHdG chez les bivalves transférés au niveau des sites contaminés par rapport aux individus engagés dans le site de référence. Le symbole * indique un changement par rapport au point amont. [◇] non statistiquement significatif

al., 1995 ; Kaneno *et al.*, 1996). Devanaboyina et Gupta (1996) n'ont relevé aucune augmentation du nombre de résidus 8OHdG dans l'ADN de thymus de veau incubé en constante agitation dans du phénol distillé pendant 5-120 minutes.

Il a été suggéré, en outre, que la 8OHdG pouvait être formée artificiellement au cours de la digestion de l'ADN par la nucléase P1 ou la phosphatase alcaline (Floyd *et al.*, 1988) ; les résultats de Fraga *et al.* (1990) et Kaneno *et al.* (1996) ont démontré le contraire.

Les étapes d'optimisation pour la mesure de la 8OHdG dans les tissus de *Unio tumidus* nous ont montré que les taux dosés pouvaient être divisés par 2 en travaillant en conditions anaérobies et particulièrement dans l'ADN branchial. L'ajout de l'antioxydant BHT avant les étapes d'extractions phénoliques, a augmenté les taux de 8OHdG dans l'ADN de glande digestive à l'encontre de ce qui avait été reporté par Adachi *et al.* (1995). Le BHT ajouté dans les échantillons de branchies n'a pas modifié les niveaux de 8OHdG : il apparaît que la production artéfactuelle de 8OHdG peut dépendre de la matrice biologique.

Les taux de 8OHdG mesurés par CG-SM sont en général surestimés par rapport à la technique CLHP-EC. Il semble qu'une oxydation artéfactuelle de la guanine non oxydée pendant l'étape de dérivation en soit la cause (Ravanat *et al.*, 1995 ; Douki *et al.*, 1996), ce point a été précédemment développé (cf. 2.10.2).

Le niveau de base de la 8OHdG dans l'ADN induit par les ROS *in vivo* n'est donc pas établi. Il semble crucial de résoudre ces questions méthodologiques avant de considérer les mesures comme indice « vrai » des lésions oxydatives à l'ADN. Les valeurs relatives sont, par contre, utilisables.

5.3 Etudes de terrain : réponses des paramètres biologiques

Les études *in situ* ont montré que le transfert de bivalves issus de sites non contaminés, en amont et en aval de différentes sources de pollution pouvaient provoquer une induction du processus de lipoperoxydation et une stimulation de la formation de la 8OHdG (table 7). Ces modifications ont été enregistrées à l'issue de 2 semaines d'exposition aux sédiments contaminés traduisant les effets cytotoxiques des micropolluants sur les organismes transférés.

Les études de transfert ont révélé des différences de sensibilité entre les glandes digestives et les branchies en fonction des sites où les bivalves ont été transférés. Les branchies sont apparues plus sensibles pour les sites de la Fensch et des Vosges. A l'inverse, de fortes inductions de la lipoperoxydation n'ont été relevées qu'au niveau des glandes digestives chez les individus transférés dans le site du Lot et Garonne. La seconde étude effectuée dans la vallée du Lot et Garonne a confirmé la sensibilité des glandes digestives sur ce site puisque le nombre de résidus 8OHdG n'a augmenté aussi que dans l'ADN hépatique.

Dans le cas du site du Lot et Garonne, les augmentations des taux de MDA au niveau des glandes digestives peuvent être explicitées par la pollution majoritairement métallique des sédiments. Il est reconnu que bien que le tissu branchial soit le plus important dans l'incorporation de la fraction métallique soluble, la glande digestive représente le site majeur d'assimilation des métaux liés aux matières en suspension (Livingstone et Pipe, 1992 ; George et Pirie, 1980). Les particules de sédiments qui sont ingérées par l'animal, amènent les polluants dans le tractus alimentaire où ils seront désorbés des sédiments et absorbés pendant le processus de digestion (Davies et Simkiss, 1996). Davies et Simkiss (1996) ont démontré que l'assimilation du zinc adsorbé sur des sédiments artificiels par *M. edulis* était 20 fois plus forte que son incorporation par l'eau de mer seule ; ils ont observé, en outre, que plus l'adsorption augmentait, plus l'assimilation par la glande digestive était majoritaire par rapport aux branchies.

Au cours de l'intoxication au cuivre et/ou thiram, les augmentations du MDA les plus significatives ont été reportées dans les branchies des individus exposés, sans doute en raison d'une assimilation préférentielle des toxiques présents dans l'eau au niveau branchial.

Les études de terrain et les expérimentations au laboratoire ont mis en évidence des variations interindividuelles pour des organismes soumis aux mêmes conditions de stress.

Au cours de l'étude de transfert dans le site de la Sarthe, deux individus engagés en aval (l'un en aval 1 et l'autre en aval 2) ont montré des augmentations des taux de MDA alors qu'aucun changement n'avait été relevé pour les autres bivalves (annexe XV). La plus forte sensibilité de ces bivalves s'est traduite par la déplétion simultanée des paramètres antioxydants.

La même observation a été faite au cours des intoxications par le cuivre et/ou le thiram réalisées au laboratoire (annexes XVI - XVII) : un individu sur les cinq exposés au cuivre combiné au thiram a vu ses taux de MDA branchiaux et hépatiques augmenter 4 fois plus que les quatre autres, en association avec de très fortes réductions des activités enzymatiques antioxydantes et des taux de glutathion.

Les inductions de la lipoperoxydation indiquées pour les organismes transférés dans le site du Lot et Garonne (première étude) varient d'un organisme à l'autre et notamment en aval 2 où les contenus de MDA sont entre 24 et 44 fois supérieurs à ceux mesurés dans les contrôles. Dans ce cas, ces différences de sensibilité à la lipoperoxydation ne se retrouvent pas dans les valeurs des paramètres antioxydants mesurés. Il est vraisemblable que d'autres composantes des systèmes antioxydants soient entrées en ligne de compte. Il aurait été intéressant en particulier d'évaluer d'autres paramètres associés à la défense antioxydante membranaire tels la vitamine E ou la phospholipide glutathion peroxydase. Les diverses sensibilités peuvent être également liées à l'assimilation des polluants.

Les stimulations de la formation de la 8OHdG observées au niveau hépatique ont été plus ou moins marquées chez les bivalves transférés sur le site du Lot et Garonne (seconde étude). Des capacités de réparation inégales vis à vis de cette lésion à l'ADN en fonction des organismes pourraient expliquer ces différences. Des études chez les vertébrés terrestres et aquatiques ont souvent mis en évidence de manière similaire une variation interindividuelle importante dans la production de la 8OHdG et ce même pour les contrôles (tableaux 5 et 6).

L'influence du facteur temps a été considérée au cours de l'étude *in situ* réalisée sur le site de la Fensch : la durée d'exposition de 2 semaines a été prolongée à 4 semaines. Les teneurs en MDA sont restées identiques aux contrôles chez les individus transférés en amont, ou en aval près de la source de pollution. C'est au point aval 2 à T₁₅, qu'une induction de la lipoperoxydation avait été notée au niveau branchial et il aurait été intéressant de vérifier si elle se serait maintenue voire intensifiée après 4 semaines d'exposition, ce que nous n'avons pu faire par suite du vol des cages. Des modifications transitoires des niveaux de MDA avaient été d'ailleurs reportées chez des vertébrés ou invertébrés aquatiques exposés au laboratoire à des toxiques ou à des sédiments contaminés. La plupart des études *in situ* sont néanmoins des études ponctuelles sur des populations peuplant des écosystèmes contaminés. Il peut s'agir d'une accentuation (Gabrielak et Klekot, 1985 ; Bano et Hasan, 1989 ; Ribera *et al.*, 1991 ; Pedrajas *et al.*, 1995 ; Klobucar *et al.*, 1997 ; Romeo et Gnassia-Barelli, 1997) ou d'une atténuation des effets (Gabrielak et Klekot, 1985 ; Livingstone *et al.*, 1990 ; Livingstone *et al.*, 1993 ; Pedrajas *et al.*, 1995 ; Klobucar *et al.*, 1997). Une diminution des effets dans le temps peut traduire l'adaptation des individus au stress environnemental, une augmentation au contraire l'épuisement des capacités de détoxification quand l'exposition se prolonge.

5.4 Relation entre l'induction de la lipoperoxydation et de la formation de la 8OHdG

Les très fortes stimulations de la lipoperoxydation obtenues dans le Lot et Garonne avaient justifié le choix de ce site pour y mener une seconde étude de transfert afin d'évaluer les réponses de la 8OHdG. Nous estimions qu'une des conséquences de ce stress oxydant serait une augmentation des niveaux de 8OHdG chez les individus transférés. Lors de la seconde étude à un an d'intervalle et de manière surprenante, aucun changement n'a été mis en évidence pour les taux de MDA mesurés chez les individus encagés sur le site alors que les niveaux de contamination des sédiments étaient semblables. Des taux de 8OHdG plus élevés, par rapport aux bivalves du site de référence, ont pourtant été observés aux points amont et aval 1. Il semble par conséquent que l'induction de la lipoperoxydation et la production de la 8OHdG puissent se développer de manière indépendante.

Divers travaux ont pourtant suggéré que les lésions à l'ADN pouvaient résulter de la peroxydation lipidique membranaire. Les hydroperoxydes lipidiques formés au cours du processus sont capables d'endommager l'ADN en provoquant des cassures de brin (Park et Floyd, 1992). Plusieurs auteurs ont démontré, d'autre part, une induction simultanée de la formation de 8OHdG et de la lipoperoxydation *in vitro* et *in vivo* (Hruskewyc *et al.*, 1990 ; Sai *et al.*, 1991 ; Dalhaus et Appel, 1993 ; Park et Floyd, 1992 ; Oteiza *et al.*, 1994). Il est dommage, par conséquent, de ne pas avoir pu mesurer les taux de 8OHdG chez les bivalves transférés dans le site du Lot et Garonne au cours de la première étude. La majorité de ces dommages semble due à l'action des radicaux libres oxydants produits par décomposition des hydroperoxydes (alkoxyl, peroxy). Ce qui reste peu clair est si l'espèce endommageant l'ADN est un radical issu de la lipoperoxydation ou un des produits carbonyles électrophiles. Il est plus vraisemblable que les produits carbonyles réactifs soient impliqués car ils combinent réactivité et diffusion (Cheeseman, 1993 ; Box et Maccubin, 1997).

Pour d'autres études, en revanche, la relation entre la lipoperoxydation et la production de la 8OHdG n'est pas aussi évidente. Il apparaît, en accord avec nos résultats, qu'elles ne sont pas nécessairement étroitement liées (Dalhaus et Appel, 1993 ; Toyokuni *et al.*, 1994 ; Austin *et al.*, 1996 ; Liu *et al.*, 1996a). Hu et Shih (1997) ont conclu également que les lésions à l'ADN n'étaient pas nécessairement dépendantes de la peroxydation lipidique membranaire : les résultats de cette étude ont montré que l'acide ascorbique inhibait la lipoperoxydation nucléaire induite par le fer (II) mais qu'il stimulait la formation de 8OHdG.

L'occurrence de la lipoperoxydation comme indicateur de stress oxydant cellulaire est par conséquent peut-être nécessaire, mais n'est pas une condition suffisante pour conclure à la génération simultanée de 8OHdG.

5.5 Relation entre les variations des taux de MDA et de 8OHdG et les modifications des paramètres antioxydants

Les résultats obtenus au cours des études de terrain et des expérimentations au laboratoire mettent en évidence une relation entre le degré de déplétion des systèmes antioxydants, mesurés simultanément chez les mêmes organismes, et l'augmentation des taux de MDA traduisant l'induction de la lipoperoxydation (tableau 8).

Il apparaît que l'activité de la glutathion réductase et les taux de glutathion réduit doivent être particulièrement diminués pour que la lipoperoxydation soit stimulée. Dans le site de la Fensch en aval 2, les déplétions ont atteint - 78 % et - 79 % respectivement pour la GRd et le GSH au niveau branchial. De même, pour la première étude sur le site du Lot et Garonne, l'activité de

Sites	Paramètres	Amont		Aval 1		Aval 2	
		GD	Br	GD	Br	GD	Br
La Fensch (définitif)	SeGPx	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	Se ind. GPx	-	-	-	↓ (↑)	↓	↓
	GRd	-	↓	↓	↓	↓	↓
	Cat	-	-	-	- (↑)	↓	↓
	SOD	-	-	-	-	↓	↓
	GSH	-	↓	↓	↓	↓	↓
	GSSG	-	-	↓	- (↑)	-	↓
	MDA	-	-	-	-	-	↑
Les Vosges	SeGPx	-	-	↓	↓	-	↓
	Se ind. GPx	-	-	↑	↑	↑	-
	GRd	-	-	↓	↓	-	↓
	GSH	-	-	↓	↓	↑	↓
	GSSG	-	-	↑	↑	-	-
	MDA	-	-	-	↑	-	-
Le Lot et Garonne (1 ^{ère} étude)	SeGPx	-	-	↓	↑	↓	-
	Se ind. GPx	-	-	↓	-	-	-
	GRd	-	-	↓	↓	↓	↓
	GSH	-	-	↓	↑	↓	↑
	GSSG	-	-	↓	↑	↑	↑
	MDA	↑	-	↑	-	↑	-
Le Lot et Garonne (2 ^{ème} étude)	SeGPx	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	Se ind. GPx	↑	-	↓	↑	↓	-
	GRd	↓	↓	↓	-	↓	-
	GSH	↑	↓	↑	↓	↑	-
	GSSG	↓	-	↓	↑	↓	↑
	MDA	-	-	-	-	-	-
	8OHdG	↑	-	↑	-	-	-

Tableau 8 : Modifications des paramètres antioxydants enregistrées chez les bivalves transférés au sein de divers sites contaminés. Les changements reportés à T₃₀ pour le site de la Fensch (étude définitive) sont les mêmes que ceux indiqués à T₁₅ excepté ceux précisés entre parenthèses. ↓ : diminution jusqu'à 55 % par rapport aux contrôles, ↓ : diminution comprise entre 55 et 84 % comparé aux contrôles, ↑ : augmentation par rapport aux contrôles, ↑ : très forte augmentation par rapport aux contrôles, - : comparables aux contrôles.

la GRd et les taux de GSH ont chuté de 79 % et 75 % par rapport aux valeurs des contrôles dans les glandes digestives des organismes transférés en aval 2. Pour l'ensemble des sites étudiés, l'activité de la GRd a toujours été très diminuée, de l'ordre de 63 à 79 %, lorsque les taux de MDA ont augmenté. Concernant les taux de GSH, une déplétion moins intense, de 51 % à 54 % comparé aux contrôles, a également été associée à une induction de la peroxydation lipidique, comme cela a été observé en aval 1 dans les site des Vosges (branchies) et du Lot et Garonne (glande digestive).

Bien que les diminutions de l'activité de la SeGPx puissent atteindre 68 % lorsque la lipoperoxydation est stimulée, la SeGPx ne semble pas aussi déterminante dans le développement de ce processus destructif. Dans les glandes digestives des bivalves engagés dans le site des Vosges notamment, l'activité de cette enzyme a été réduite de 63 % comparé aux témoins, mais aucune modification dans les taux de MDA n'a été enregistrée. Les autres paramètres antioxydants modérément altérés sont apparus suffisamment efficaces pour protéger les organismes contre le stress oxydant induit par l'exposition aux sédiments contaminés.

Les perturbations des systèmes antioxydants cytosoliques ne suffisent pas à expliquer complètement les augmentations des taux de MDA. Pour le site de la Fensch, par exemple, les diminutions des activités de la SeGPx (- 57 %) et de la GRd (-84 %), et des taux de GSH (- 70 %) hépatiques en aval 2 sont proches de celles reportées au niveau branchial, pourtant la lipoperoxydation n'a pas été stimulée. Sur le site du Lot et Garonne, les concentrations de MDA ont triplé dans les glandes digestives des bivalves transférés en amont de la source de pollution alors que les paramètres antioxydants n'ont pas été altérés par rapport au site de référence. De plus, le degré d'induction de la lipoperoxydation n'est pas comparable pour des déplétions équivalentes des activités de la SeGPx et de la GRd et des taux de GSH.

La stimulation de la formation de la 8OHdG semble être plus précoce que l'induction de la lipoperoxydation. Des taux de 8OHdG plus élevés, par rapport aux contrôles, ont été obtenus bien que les paramètres antioxydants n'aient été que modérément perturbés. Des études *in situ* supplémentaires seraient essentielles afin de confirmer cette tendance et de mieux connaître les réponses de ce marqueur de génotoxicité en fonction de différents profils de pollution. Il est important de pouvoir estimer le degré de réversibilité de la production accrue de la 8OHdG en prolongeant les durées d'exposition. L'hydroxylation en C8 des résidus guanine conduit à des mutations en induisant des mésappariements : elle représente un risque mutagène et cancérigène si elle n'est pas éliminée. Nishimoto et collaborateurs (1991) ont montré que la 8OHdG était relativement rapidement réparée (5-7 jours) dans l'ADN hépatique de *Parophrys vetulus*. Une diminution rapide des taux de 8OHdG et un retour aux valeurs contrôles ont également été reportés dans de nombreux tissus et cellules de mammifères (Kasai *et al.*, 1986 ; Kasai *et al.*, 1987 ; King *et al.*, 1996 ; Yamaguchi *et al.*, 1996ab ; Zastawny *et al.*, 1996 ;

Kasprzak *et al.*, 1997 ; Dally et Hartwig, 1997 ; Zastawny *et al.*, 1997). La stimulation de la production de la 8OHdG observée chez les bivalves transférés dans le site du Lot et Garonne n'est peut-être que transitoire. Il est par conséquent indispensable de connaître les capacités de *Unio tumidus* à réparer cette lésion afin d'estimer sa validité en tant qu'indicateur d'effets génotoxiques.

5.6 Relations entre les réponses biologiques observées et les niveaux de contamination des sites étudiés

Le stress oxydant peut être induit par une large gamme de contaminants environnementaux et il est par conséquent difficile de pouvoir incriminer une classe de polluants comme responsables des effets biologiques observés chez les bivalves transférés et d'établir des relations de causalité en raison de la complexité des micropolluants présents dans les sédiments.

Même si les analyses physico-chimiques et les analyses statistiques font ressortir des relations entre la lipoperoxydation et les HAPs dans le site de la Fensch, les PCBs pour le site des Vosges et les métaux sur le site du Lot et Garonne, il est toujours difficile de relier des effets biologiques aux résultats des analyses physico-chimiques. D'une part, bien que les analyses soient relativement complètes, elles ne sont pas exhaustives et elles ne prennent pas en compte la spéciation et la forme chimique des polluants. Le cas de la pollution métallique souligne les problèmes de biodisponibilité des métaux, puisqu'à un an d'intervalle, alors que le niveau de contamination n'a quasiment pas changé, les effets biologiques enregistrés dans le Lot et Garonne sont différents. Dans la Sarthe, les métaux sont présents à des teneurs élevées dans les sédiments prélevés en aval, pourtant aucune modification des paramètres biologiques n'a été notée.

Il aurait été utile de disposer de marqueurs tels les métallothionéines et le cytochrome P450 en particulier l'isoenzyme CYP1A, dont les inductions traduisent respectivement l'exposition aux métaux et aux polluants organiques (HAPs et PCBs). Il faudrait s'assurer avant tout que le cytochrome P450 est un paramètre sensible chez les bivalves d'eau douce.

Des résultats contradictoires ont été reportés de même pour des études portant sur la bioaccumulation métallique chez les mollusques d'eau douce : les concentrations tissulaires ne sont pas toujours corrélées avec les concentrations environnementales. Ces différences illustrent le fait que (i) la bioaccumulation est fortement dépendante du site et est contrôlée par des facteurs environnementaux et (ii) elle est plus vraisemblablement liée à une ou plusieurs espèces biodisponibles qu'à la concentration totale en métal (Elder et Collins, 1991). Bien que les caractéristiques physiques et les habitudes alimentaires des organismes puissent être d'importants facteurs modulant la bioaccumulation et la toxicité, les variables

environnementales telles que la concentration et le type de carbone organique, la dureté de l'eau, la température, le pH, l'oxygène dissous, la taille des particules de sédiments, et les caractéristiques hydrologiques du système, sont également capables d'influencer l'assimilation des polluants par les organismes.

Les caractéristiques hydrologiques ne sont pas les mêmes pour les rivières des sites de la Sarthe et du Lot et Garonne sur lesquelles les transferts ont été réalisés. Nous ne disposons pas de données concernant la température, le pH et l'oxygène dissous pour la première étude du Lot et Garonne, ce qui ne nous permet pas de mettre en évidence d'éventuelles différences. Il est à noter que les deux études dans le Lot et Garonne n'ont pas été menées à la même saison : la première s'est déroulée en été tandis que la seconde a été effectuée en automne. Des paramètres hydrologiques ont pu modifier la biodisponibilité des contaminants dans les sédiments : le lessivage du site pollué pourrait être une source de relargage des métaux.

L'analyse physico-chimique n'a été réalisée qu'au niveau des sédiments prélevés sur les différents sites, et il aurait été intéressant d'analyser les contaminants contenus dans l'eau interstitielle. Les bivalves qui se situent à l'interface eau - sédiment, peuvent être exposés à la fraction soluble des contaminants de même qu'à celle associée aux sédiments. Il serait par conséquent nécessaire pour les prochaines études de transfert d'évaluer les niveaux de pollution à la fois dans l'eau interstitielle et les sédiments au niveau des sites considérés.

Le manque de biodisponibilité des micropolluants associés aux sédiments n'est cependant pas en mesure d'expliquer pourquoi les effets biologiques - altérations des paramètres antioxydants et induction de la formation de la 8OHdG - ont été plus accentués en amont par rapport aux points aval dans le site du Lot et Garonne (seconde étude). Les niveaux de contamination métallique et organique sont en effet relativement proches de ceux reportés dans le site de référence. Le stress mis en évidence chez ces individus peut résulter de l'exposition à des contaminants qui n'ont pas été pris en compte par les analyses physico-chimiques ainsi qu'à des polluants présents dans la fraction soluble. Le pH, l'oxygène dissous et la température, mesurés au cours de la seconde étude sur ce site, ne peuvent être incriminer car ils sont similaires aux points amont et aval.

L'ensemble de ces études de transfert a montré que les informations fournies par les analyses physico-chimiques et les réponses des paramètres antioxydants, de la lipoperoxydation et de la formation de la 8OHdG sont plus complémentaires qu'elles ne sont redondantes. L'analyse des indicateurs biologiques est indispensable car les analyses physico-chimiques telles qu'effectuées dans cette étude, ne sont pas suffisantes à elles seules pour informer sur les effets biologiques des polluants.

6 Conclusion

6 Conclusion

Les études, réalisées principalement *in situ*, ont montré que le MDA et la 8OHdG se révèlent être des indicateurs intéressants capables de traduire les effets cytotoxiques de substances chimiques et de sédiments contaminés. Les augmentations des taux de MDA, reflétant l'induction de la lipoperoxydation, ont été enregistrées après 2 semaines d'exposition chez des bivalves exposés à des sédiments majoritairement pollués par différentes classes de contaminants - HAPs, PCBs et métaux - démontrant son intérêt dans le cas de contamination multiple. Les stimulations les plus fortes ont néanmoins été observées pour le site du Lot et Garonne principalement soumis à une pollution métallique (première étude).

Pour l'ensemble de ces études, la détermination du MDA a été réalisée simultanément par la méthode spectrophotométrique à l'acide thiobarbiturique (test TBA) et par une technique basée sur la CLHP. Les modifications mises en évidence par le test TBA ont toujours été de moindre ampleur et le plus souvent non significatives par rapport à la technique chromatographique. Les taux de MDA sont, en outre, 6 à 9 fois plus élevés lorsqu'ils sont mesurés par le test TBA. La technique CLHP est par conséquent une méthode nettement supérieure en terme de spécificité et de sensibilité.

La seconde étude du Lot et Garonne pour laquelle le suivi de la 8OHdG a été inclus, a indiqué que l'induction de la lipoperoxydation et la stimulation de la formation de la 8OHdG n'étaient pas forcément liées : des augmentations du nombre de résidus de 8OHdG ont été trouvées dans l'ADN hépatique alors que les contenus de MDA sont restés comparables aux contrôles. La mesure de la 8OHdG pourrait représenter un marqueur plus précoce de l'impact des contaminants environnementaux sur les organismes exposés. Le fait que l'ADN soit endommagé augure défavorablement de l'impact des polluants sur les populations contaminées. D'autres études de terrain seraient nécessaires afin de confirmer cette tendance et de mieux connaître les relations entre la formation de la 8OHdG et le développement de la peroxydation lipidique.

Des inductions de la lipoperoxydation considérables comme celles observées dans le site du Lot et Garonne (première étude) peuvent laisser présager des répercussions au niveau des populations. De même, la 8OHdG, en raison de son caractère mutagène représente un risque potentiel pour l'intégrité de la structure génétique si elle n'est pas réparée. Il est par conséquent crucial de conduire des études de transfert *in situ* en prolongeant la durée d'exposition pour évaluer si les altérations notées sont irréversibles, ou si au contraire elles ne sont que transitoires suite à la mise en place de mécanismes compensatoires ou d'adaptation. Ce type d'études est indispensable pour estimer le potentiel de ces biomarqueurs de toxicité à prédire un risque à long terme. Le suivi en parallèle de la dynamique des populations fournirait des indications essentielles au cours de ces études.

Les études menées au laboratoire ou *in situ*, ont mis en évidence des différences de sensibilité selon l'organe considéré. En fonction des profils de pollution, les branchies ou les glandes digestives se sont révélées plus affectées par le stress induit par l'exposition aux sédiments contaminés. Ces résultats soulignent l'importance de doser simultanément les paramètres étudiés dans les deux tissus car les informations obtenues ne sont pas redondantes. En outre, des différences interindividuelles marquées ont été notées à la fois pour les taux de MDA et les niveaux de 8OHdG chez des bivalves exposés à des conditions de stress identiques. Il serait par conséquent utile d'augmenter le nombre d'organismes analysés afin de mieux apprécier les changements observés entre les différents groupes d'individus.

L'évaluation simultanée des paramètres antioxydants chez les bivalves intoxiqués a permis d'établir une relation entre le degré de déplétion des systèmes antioxydants cytosoliques et le développement du processus de lipoperoxydation : la lipoperoxydation apparaît induite lorsque les altérations de la défense antioxydante ont atteint un seuil critique. La relation n'est cependant pas toujours aussi évidente et l'étude d'autres antioxydants, notamment membranaires, pourrait permettre de mieux comprendre à partir de quel niveau de perturbations la peroxydation lipidique est stimulée.

Des liaisons ont été établies entre l'induction de la lipoperoxydation et le degré de contamination des sédiments par HAPs, les PCBs ou les métaux, reflété par les analyses physico-chimiques ; néanmoins le degré de contamination métallique ne permet pas toujours de présager des effets biologiques et de la toxicité. Le manque de biodisponibilité des contaminants présents dans les sédiments et le fait que des polluants non mesurés puissent être responsables des effets biologiques observés, sont autant de facteurs qui peuvent être mis en cause pour expliciter ces discordances. Ces résultats ont mis l'accent sur l'importance de mettre en place une approche multimarqueur, incluant notamment des marqueurs d'exposition, afin d'être en mesure de mieux expliquer les relations entre les perturbations biologiques et les niveaux de contamination des sites.

7 Références bibliographiques

Adachi, S., Zeisig, M. et Möller, L., (1995) : Improvements in the analytical method for 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA. *Carcinogenesis*, **6**, 2, 253-258.

Agnez, L.F., Costa de Oliviera, R.L., Di Mascio, P. et Menck, C.F.M, (1996) : Involvement of *Escherichia coli* exonuclease III and endonuclease IV in the repair of singlet oxygen-induced DNA damage. *Carcinogenesis*, **17**, 5, 1183-1185.

Aiyar, J., Berkovits, H.J., Floyd, R.A. et Wetterhahn, K.E., (1990) : Reaction of chromium (VI) with hydrogen peroxide in the presence of glutathione : reactive intermediates and resulting DNA damage. *Chem. Res. Toxicol.*, **3**, 595-603.

Alleman, M.A., Koster, J.F., Wilson, J.H.P., Edixhoven-Bosdijk, A., Slee, R.G., Kroos, M.J. et v. Eijk, H.G., (1985) : The involvement of iron and lipid peroxidation in the pathogenesis of HCB induced porphyria. *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 2, 161-166.

Altman, S.A., Zastawny, T.H., Randers, L., Lin, Z., Lumpkin, J.A., Remacle, J., Dizdaroglu, M. et Rao, G., (1994) : *tert*-Butyl hydroperoxide-mediated DNA base damage in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.*, **306**, 35-44.

Ames, B.N., (1989) : Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutat. Res.*, **214**, 41-46.

Aruoma, O.I., Halliwell, B. et Dizdaroglu, M., (1989a) : Iron ion-dependent modifications of the bases in DNA by the superoxide radical-generating hypoxanthine/xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **264**, 22, 5, 13024-13028.

Aruoma, O.I., Halliwell, B., Gajewski, E. et Dizdaroglu, M., (1989b) : Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J. Biol. Chem.*, **264**, 34, 5, 20509-20512.

Aruoma, O.I., Halliwell, B., Gajewski, E. et Dizdaroglu, M., (1991) : Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, **273**, 601-604.

Asami, S., Hirano, T., Yamaguchi, R., Tomioka, Y., Itoh, H. et Kasai, H., (1996) : Increase of a type of oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanine, and its repair activity in human leukocytes by cigarette smoking. *Cancer Res.*, **56**, 2546-2549.

Asami, S., Manabe, H., Miyake, J., Tsurudome, Y., Hirano, T., Yamaguchi, R., Itoh, H. et Kasai, H., (1997) : Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis*, **18**, 9, 1763-1766.

Austin, E.W., Parrish, J.M., Kinder, D.H. et Bull, R.J., (1996) : Lipid peroxidation and formation of 8-hydroxydeoxyguanosine from acute doses of halogenated acetic acids. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **31**, 77-82.

- Babo, S. et Vasseur, P., (1992) : In vitro effects of thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, **22**, 61-68.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E.A., Kelly, J. et Stohs, S.J., (1995) : Adriamycin-induced hepatic and myocardial lipid peroxidation and DNA damage, and enhanced excretion of urinary lipid metabolites in rats. *Toxicology*, **95**, 1-9.
- Baik, S.C., Youn, H.S., Chung, M.H., Lee, W.K., Cho, M.J., Ko, G.H., Park, C.K., Kasai, K. et Rhee, K.H., (1996) : Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Cancer Res.*, **56**, 1279-1282.
- Baird, M.B., Hough, J.L. et Sfeir, G.T., (1993) : Accumulation of malondialdehyde in mouse heart following acute dosing with adriamycin is strain specific and unaffected by cardiac catalase status. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **80**, 3, 363-366.
- Bano, Y. et Hasan, M., (1989) : Mercury induced time-dependent alterations in lipid profiles and lipid peroxidation in different body organs of catfish *Heteropneustes fossilis*. *J. Environ. Sci. Health*, **B24**, 2, 145-166.
- Bansal, A.K., Bhatnagar, D. et Soni, G.L., (1997) : Effect of *N*-nitrosodiethylamine on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat liver mitochondria : protective role of antioxidants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **59**, 254-260.
- Behrens, W.A. et Madere, R., (1991) : Malonaldehyde determination in tissues and biological fluids by ion-pairing high-performance liquid chromatography. *Lipids*, **26**, 3, 232-236.
- Benedetti, A., Fulceri, R., Ferrali, M., Ciccoli, L., Esterbauer, H. et Comporti, M., (1982) : Detection of carbonyl functions in phospholipids of liver microsomes in CCl₄- and BrCCl₃-poisoned rats. *Biochim. Biophys. Acta*, **712**, 628-638.
- Benedetti, A., Pompella, A., Fulceri, R., Romani, A. et Comporti, C., (1986) : Detection of 4-hydroxynonenal and other lipid peroxidation products in the liver of bromobenzene-poisoned mice. *Biochim. Biophys. Acta*, **876**, 658-666.
- Bessho, T., Tano, K., Kasai, H., Ohtsuka, E. et Nishimura, S., (1993a) : Evidence for two DNA repair enzymes for 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in human cells. *J. Biol. Chem.*, **268**, 26, 15, 19146-19421.
- Bessho, T., Roy, R., Yamamoto, K., Kasai, H., Nishimura, S., Tano, K. et Mitra, S., (1993b) : Repair of 8-hydroxyguanine in DNA by mammalian *N*-methylpurine-DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8901-8904.
- Bird, R.P. et Draper, H.H., (1984) : Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods Enzymol.*, **105**, 35, 299-305.

- Bjørås, M., Luna, L., Johnsen, B., Hoff, E., Haug, T., Rognes, T. et Seeberg, E., (1997) : Opposite base-dependent reactions of an human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites. *EMBO J.*, **16**, 20, 6314-6322.
- Bodell, W.J., Ye, Q., Pathak, D.N. et Pongracz, K., (1998) : Oxidation of eugenol to form DNA adducts and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine : role of quinone methide derivative in DNA adduct formation. *Carcinogenesis*, **19**, 3, 437-443.
- Boiteux, S., Gajewski, E., Laval, J. et Dizdaroglu, M., (1992) : Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA-glycosylase) : excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry*, **31**, 106-110.
- Boiteux, S., (1993) : Properties and biological functions of the NTH and FPG proteins of *Escherichia coli* : two DNA glycosylases that repair oxidative damage in DNA. *J. Photochem. Photobiol.*, **B19**, 87-96.
- Box, H.C. et Maccubbin, A.E., (1997) : Lipid peroxidation and DNA damage. *Nutrition*, **13**, 10.
- Bradford, M.M., (1976) : A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Breimer, L.H., (1990) : Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis : the role of DNA base damage. *Mol. Carcinogenesis*, **3**, 188-197.
- Breimer, L.H., (1991) : Repair of DNA damage induced by reactive oxygen species. *Free Rad. Res. Comms.*, **14**, 3, 159-171.
- Brooks, P.J., (1997) : DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity - a review. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **21**, 6, 1073-1082.
- Buege, J.A. et Aust, S.D., (1978) : Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, **52**, 302- 310.
- Bull, A.W. et Marnett, L.J., (1985) : Determination of malondialdehyde by ion-pairing high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **149**, 284-290.
- Cadet, J., Odin, F., Mouret, J.F., Polverelli, M., Audic, A., Giacomoni, P., Favier, A. et Richard, M.J., (1992) : Chemical and biochemical postlabeling methods for singling out specific oxidative DNA lesions. *Mutat. Res.*, **275**, 343-354.
- Cadet, J. et Weinfeld, M., (1993) : Detecting DNA damage. *Anal. Chem.*, **65**, 675A-6682A.

Cadet, J., Ravanat, J.L., Buchko, G.W., Yeo, H.C. et Ames, B.N., (1994) : Singlet oxygen DNA damage : chromatographic and mass spectrometric analysis of damage products. *Methods Enzymol.*, **234**, 79-88.

Cahill, A., Wang, X. et Hoek, J.B., (1997) : Increased oxidative damage to mitochondrial DNA following chronic ethanol consumption. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **235**, 286-290.

Camps, J., Bargallo, T., Gimenez, A., Alie, S., Caballeria, J., Pares, A., Joven, J., Masana, L. et Rodes, J., (1992) : Relationship between hepatic lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Clinical Science*, **83**, 695-700.

Carbonneau, M.A., Peuchant, E., Sess, D., Canioni, P. et Clerc, M., (1991) : Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. *Clin. Chem.*, **37**, 8, 1423-1429.

Casini, A.F., Pompella, A. et Comporti, M., (1985) : Liver glutathione depletion induced by bromobenzene, iodobenzene and diethylmaleate poisoning and its relation to lipid peroxidation and necrosis. *Am. J. Pathol.*, **118**, 225-237.

Cerutti, P.A., (1985) : Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, **227**, 375-381.

Chemolin, V.P. et Belcheva, N.N., (1992) : The effect of heavy metals on processes of lipid peroxidation in microsomal membranes from the hepatopancreas of the bivalve mollusc *Mizuhopecten yessoensis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **103C**, 2, 419-422.

Chen, Q., Marsh, J., Ames, B. et Mossman, B., (1996) : Detection of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage, in culture medium from human mesothelial cells exposed to crocidolite asbestos. *Carcinogenesis*, **17**, 11, 2525-2527.

Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S. et Loeb, L.A., (1992) : 8-hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage causes G→T and A→C substitutions. *J. Biol. Chem.*, **267**, 1, 5, 166-172.

Cheeseman, K.H., (1993) : Lipid peroxidation and cancer. In *DNA and free radicals*, Halliwell, B. et Aruoma, O.I. (ed.), Ellis Horwood Limited, England, p 109-144.

Chipman, J.K., Marsh, J.W., Livingstone, D.R. et Evans, B., (1992) : Genetic toxicity in dab *Limanda limanda* from the North sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **91**, 121-126.

Christie, W.W., (1987) : *High-performance liquid chromatography and lipids, a practical guide*, Pergamon Press, England.

Comporti, M., (1985) : Biology of disease, lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury, *Laboratory Investigation*, **53**, 6, 599-623.

Claycamp, H.G., (1992) : Phenol sensitization of DNA to subsequent oxidative damage in 8-hydroxyguanine assays. *Carcinogenesis*, **13**, 1289-1292.

Collins, A.R., Dusinska, M., Gedik, C.M. et Stetina, R., (1996) : Oxidative DNA damage : do we have a reliable biomarker ?. *Environ. Health Perspect.*, **104**, suppl. 3, 465-469.

Cooke, M., Podmore, I., Herbert, K., Lunec, J. et Thomas, S., (1996) : UV-mediated DNA damage and its assessment. *TEN*, **3**, 4, 101-109.

Croteau, D.L. et Bohr, V.A., (1997) : Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, **272**, 41, 10, 25409-25412.

Croteau, D.L., ap Rhys, C.M.J., Hudson, E.K., Dianov, G.L., Hansford, R.G. et Bohr, V.A., (1997) : An oxidative damage-specific endonuclease from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **272**, 43, 24, 27338-27344.

Csallany, A.S., Guan, D.M., Manwaring, J.D. et Addis, P.B., (1984) : Free malonaldehyde determination in tissues by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **42**, 277-283.

Dalhaus, M. et Appel, K.E., (1993) : *N*-nitrosodimethylamine, *N*-nitrosodiethylamine and *N*-nitrosomorpholine fail to generate 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in liver DNA of male F344 rats. *Mutat. Res.*, **285**, 295-302.

Dalhaus, M., Almstadt, E. et Appel, K.E., (1994) : The pentachlorophenol metabolite tetrachloro-*p*-hydroquinone induces the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in liver DNA of male B6C3F1 mice. *Toxicol. Lett.*, **74**, 265-274.

Dally, H. et Hartwig, A., (1997) : Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel (II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis*, **18**, 5, 1021-1026.

Davies, N.A. et Simkiss, K., (1996) : The uptake of zinc from artificial sediments by *Mytilus edulis*. *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **76**, 1073-1079.

Degan, P., Bonassi, S., De Caterina, M., Korkina, L.G., Pinto, L., Scopacasa, F., Zatterale, A., Calzone, R. et Pagano, G., (1995) : *In vivo* accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA correlates with release of reactive oxygen species in Fanconi's anaemia families. *Carcinogenesis*, **16**, 4, 735-742.

Delmaestro, E. et Trombetta, L.D., (1995) : The effects of disulfiram on the hippocampus and cerebellum of the rat brain : a study on oxidative stress. *Toxicol. Lett.*, **75**, 235-243.

Demple, B. et Levin, J.D., (1991) : Repair systems for radical-damaged DNA. In *Oxidative stress : oxidants and antioxidants*, Sies, H. (ed.), Academic Press, London, p 119-155.



Devanaboyina, U.S. et Gupta, R.C., (1996) : Sensitive detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by ³²P-postlabeling assay and the basal levels in rat tissues. *Carcinogenesis*, **17**, 5, 917-924.

Devasagayam, T.P.A., Steeken, S., Obendorf, M.S.W., Schulz, W.A. et Sies, H., (1991) : Formation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. *Biochemistry*, **30**, 6283-6289.

Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston G.W. et Jewell, C.S., (1989) : Biochemical responses in aquatic animals : a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.*, **8**, 1103-1123.

Di Giulio, R.T., Habig, C. et Gallagher, E.P., (1993) : Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquat. Toxicol.*, **26**, 1-22.

Dizdaroglu, M., (1985) : Formation of an 8-hydroxyguanine moiety in deoxyribonucleic acid on γ -irradiation in aqueous solution. *Biochemistry*, **24**, 4476-4481.

Dizdaroglu, M., (1991) : Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Biol. Med.*, **10**, 225-242.

Dizdaroglu, M., (1993) : Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins. In *DNA and free radicals*, Halliwell, B. et Aruoma, O.I. (ed.), Ellis Horwood Limited, England, p 19-39.

Dizdaroglu, M., (1994) : Chemical determination of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Methods Enzymol.*, **234**, 3-17.

Douki, T., Delatour, T., Bianchini, F. et Cadet, J., (1996) : Observation and prevention of an artefactual formation of oxidized DNA bases and nucleosides in the GC-EIMS method. *Carcinogenesis*, **17**, 2, 347-353.

Douki, T., Martini, R., Ravanat, J.L., Turesky, R.J. et Cadet, J., (1997) : Measurement of 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine and 8-oxo-7,8-dihydroguanine in isolated DNA exposed to gamma radiation in aqueous solution. *Carcinogenesis*, **18**, 12, 2385-2391.

Draper, H.H. et Hadley, M., (1990) : Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, **186**, 43, 421-431.

Elder, J.F. et Collins, J.J., (1991) : Freshwater molluscs as indicators of bioavailability and toxicity of metals in surface-water systems. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **122**, 37-79.

Epe, B., Hegler, J. et Wild, D., (1989) : Singlet oxygen as an ultimately reactive species in *Salmonella typhimurium* DNA damage induced by methylene blue/visible light. *Carcinogenesis*, **10**, 11, 2019-2024.

- Epe, B., (1993a) : DNA damage induced by photosensitization. In *DNA and free radicals*, Halliwell, B. et Aruoma, O.I. (ed.), Ellis Horwood Limited, England, p 41-65.
- Epe, B., Henzl, H., Adam, W. et Saha-Möller, C.R., (1993b) : Endonuclease-sensitive DNA modifications induced by acetone and acetophenone as photosensitizers. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 4, 863-869.
- Epe, B., Pflaum, M. et Boiteux, S., (1993c) : DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems. *Mutat. Res.*, **299**, 135-145.
- Epe, B. et Hegler, J., (1994) : Oxidative DNA damage : endonuclease fingerprinting. *Methods Enzymol.*, **234**, 122-131.
- Esterbauer, H., Lang, J., Zdravec, S. et Slater, T.F., (1984) : Detection of malonaldehyde by high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.*, **105**, 38, 319-328.
- Esterbauer, H. et Zollner, H., (1989) : Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. *Free Radical Biol. Med.*, **7**, 197-203.
- Esterbauer, H. et Cheeseman, K.H., (1990) : Determination of aldehydic lipid peroxidation products : malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* **186**, 42, 407-421.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J. et Zollner, H., (1991) : Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical Biol. Med.*, **11**, 81-128.
- Esterbauer, H., (1993) : Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am. J. Clin. Nutr.*, **57** (suppl.), 779S-786S.
- Eufemia, N.A., Collier, T.C., Stein, J.E., Watson, D.E. et Di Giulio, R.T., (1997) : Biochemical responses to sediment-associated contaminants in brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) from the Niagara river ecosystem. *Ecotoxicology*, **6**, 13-34.
- Fairhurst, S., Barber, D.J., Clark, B. et Horton, A.A., (1982) : Studies on paracetamol-induced lipid peroxidation. *Toxicology*, **23**, 249-259.
- Faux, S.P., Francis, J.E., Smith, A.G. et Chipman, J.K., (1992a) : Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine in *Ah*-responsive mouse liver by iron and Aroclor 1254. *Carcinogenesis*, **13**, 2, 247-250.
- Faux, S.P., Gao, M., Chipman, J.K. et Levy, L.S., (1992b) : Production of 8-hydroxydeoxyguanosine in isolated DNA by chromium (VI) and chromium (V). *Carcinogenesis*, **13**, 9, 1667-1669.
- Fiala, E.S., Conaway, C.C. et Mathis, J.E., (1989) : Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane. *Cancer Res.*, **49**, 5518-5522

- Finnegan, M.T.V., Herbert, K.E., Evans, M.D., Griffiths, H.R. et Lunec, J., (1996) : Evidence of sensitisation of DNA to oxidative damage during isolation. *Free Radical Biol. Med.*, **20**, 1, 93-98.
- Floyd, R.A., Watson, J.J., Wong, P.K., Altmiller, D.H. et Rickard, R.C., (1986a) : Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine : sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Rad. Res. Comms.*, **1**, 3, 163-172.
- Floyd, R.A., Watson, J.J., Harris, J., West, M.S. et Wong, P.K., (1986b) : Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter, tetradecanoylphorbolacetate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **137**, 2, 841-846.
- Floyd, R.A., West, M.S., Eneff, K.L., Hogsett, W.E. et Tingey, D.T., (1988) : Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxyguanine in isolated DNA. *Arch. Biochem. Biophys.*, **262**, 1, 266-272.
- Floyd, R.A., West, M.S., Eneff, K.L. et Schneider, J.E., (1989) : Methylene blue plus light mediates 8-hydroxyguanine formation in DNA. *Arch. Biochem. Biophys.*, **273**, 106-111.
- Floyd, R.A., (1990a) : The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **11**, 9, 1447-1450.
- Floyd, R.A., West, M.S., Eneff, K.L., Schneider, J.E., Wong, P.K., Tingey, D.T. et Hogsett, W.E., (1990b) : Conditions influencing yield and analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in oxidatively damaged DNA. *Anal. Biochem.*, **188**, 155-158.
- Fontecave, M., Mansuy, D., Jaouen, M., et Pezerat, H., (1987) : The stimulatory effects of asbestos on NADPH-dependent lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Biochem. J.*, **241**, 561-565.
- Fontecave, M., Jaouen, M., Mansuy, D., Costa, D., Zalma, R. et Pezerat, H., (1990) : Microsomal lipid peroxidation and oxy-radicals formation are induced by insoluble iron-containing minerals. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **173**, 3, 912-918.
- Fowler, R.G. et Schaaper, R.M., (1997) : The role of the *mutI* gene of *Escherichia coli* in maintaining replication fidelity. *FEMS Microbiol. Rev.*, **21**, 43-54.
- Fraga, C.G., Shigenaga, M.K., Park, J.W., Degan, P. et Ames, B.N., (1990) : Oxidative damage to DNA during aging : 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4533-4537
- Fraga, C.G., Motchnik, P.A., Wyrobek, A.J., Rempel, D.M. et Ames, B.N., (1996) : Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat. Res.*, **351**, 199-203.

Frenkel, K., Zhong, Z., Wei, H., Karkoska, J., Patel, U., Rashid, K., Georgescu, M. et Solomon, J.J., (1991) : Quantitative high-performance liquid chromatography analysis of DNA oxidized *in vitro* and *in vivo*. *Anal. Biochem.*, **196**, 126-136.

Fuchs, J. et Packer, L., (1991) : Photooxidative stress in the skin. In *Oxidative stress : oxidants and antioxidants*, Sies, H. (ed.), Academic Press, London, p 559-583.

Fung, H., Kow, Y.W., Houten, B.V. et Mossman, B.T., (1997) : Patterns of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in DNA and indications of oxidative stress in rat and human pleural mesothelial cells after exposure to crocidolite asbestos. *Carcinogenesis*, **18**, 4, 825-832.

Gabryelak, T. et Klekot, J., (1985) : The effect of paraquat on the peroxide metabolism in erythrocytes of freshwater fish species. *Comp. Biochem. Physiol.*, **81C**, 2, 415-418.

Garcia de la Asuncion, J., Millan, A., Pla, R., Bruseghini, L., Esteras, A., Pallardo, F.V., Sastre, J. et Vina, J., (1996) : Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J.*, **10**, 333-338.

George, S.G. et Pirie, B.J.S., (1980) : Metabolism of zinc in the mussel *Mytilus edulis* (L.) : a combined ultrastructural and biochemical study. *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **60**, 575-590.

Giralt, M., Gasull, T., Blanquez, A. et Hidalgo, J., (1993) : Effect of endotoxin on rat serum, lung, and liver lipid peroxidation and on tissue metallothionein levels. *Rev. Esp. Fisiol.*, **49**, 2, 73-78.

Goldstein, B.D., Rozen, M.G., Quintavalla, J.C. et Amoroso, M.A., (1979) : Decrease in mouse lung and liver glutathione peroxidase activity and potentiation of the lethal effects of ozone and paraquat by the superoxide dismutase inhibitor diethyldithiocarbamate. *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 27-30.

Grollman, A.P. et Moriya, M., (1993) : Mutagenesis by 8-oxoguanine : an enemy within. *TIG*, **9**, 7, 246-249.

Gupta, R.C., (1984) : Non-random binding of the carcinogen *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6943-6947.

Gutteridge, J.M.C., (1984) : Ferrous ion-EDTA-stimulated phospholipid peroxidation. *Biochem. J.*, **224**, 697-701.

Gutteridge, J.M.C., (1993) : Free radicals in disease processes : a compilation of cause and consequence. *Free Rad. Res. Comms.*, **19**, 3, 141-158.

Gutteridge, J.M.C. et Halliwell, B., (1990) : The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS*, **15**, 129-135.

- Halliwell, B. et Gutteridge, J.M.C., (1984) : Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, **219**, 1-14.
- Halliwell, B. et Gutteridge, J.M.C., (1989) : *Free radicals in Biology and Medicine*, 2nd ed., Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell, B. et Aruoma, O.I., (1991) : DNA damage by oxygen-derived species its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS*, **281**, 1, 2, 9-19.
- Halliwell, B. et Dizdaroglu, M., (1992) : Commentary : the measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques. *Free Rad. Res. Comms.*, **16**, 2, 75-87.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross C.E., (1992) : Free radicals, antioxidants, and human disease : where are we now ?. *J. Lab. Clin. Med.*, **119**, 6, 598-620.
- Halliwell, B., (1993) : Oxidative DNA damage : meaning and measurement. In *DNA and free radicals*, Halliwell, B. et Aruoma, O.I. (ed.), Ellis Horwood Limited, England, p 67-79.
- Halliwell, B., (1994) : Free radicals, antioxidants, and human disease : curiosity, cause, or consequence. *Lancet*, **344**, 10, 721-724.
- Han, T.J. et Liston, J., (1987) : Lipid peroxidation and phospholipid hydrolysis in fish muscle microsomes and frozen fish. *J. Food Sci.*, **52**, 2, 294-299.
- Han, T.J. et Liston, J., (1989) : Lipid peroxidation protection factors in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) muscle cytosol. *J. Food Sci.*, **54**, 4, 809-813.
- Harris, G., Bashir, S. et Winyard, P.G, (1994) : 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine present in DNA is not simply an artefact of isolation, *Carcinogenesis*, **15**, 411-413.
- Hegler, J., Bittner, D., Boiteux, S. and Epe, B., (1993) : Quantification of oxidative DNA modifications in mitochondria. *Carcinogenesis*, **14**, 11, 2309-2312.
- Heikkila, R.E., Cabbat, F.S. et Cohen, G., (1976) : In vivo inhibition of the superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate, *J. Biol. Chem.*, **251**, 2182-2185.
- Henle, E.S. et Linn, S., (1997) : Formation, prevention and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, **272**, 31, 19095-19098.
- Hippeli, S. et Elstner, E.F., (1991) : Oxygen radicals and air pollution. In *Oxidative stress : oxidants and antioxidants*, Sies, H. (ed.), Academic Press, London, p 3-55.
- Högberg, J., Orrenius, S. et O'Brien, P.J., (1975) : Further studies on lipid peroxide formation in isolated hepatocytes. *Eur. J. Biochem.*, **59**, 449-455.
- Horton, A.A. et Fairhurst, S., (1987) : Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, **18**, 1, 17-79.

Howden, P.J. et Faux, S.P., (1996) : Glutathione modulates the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in isolated DNA and mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA100 induced by mineral fibres. *Carcinogenesis*, **17**, 10, 2275-2277.

Hruszkewycz, A.M. et Bergtold, D.S. (1990) : The 8-hydroxyguanine content in isolated mitochondria increases with lipid peroxidation. *Mutat. Res.*, **244**, 123-128.

Hu, M.L., et Shih, M.K. (1997) : Ascorbic acid inhibits lipid peroxidation but enhances DNA damage in rat liver nuclei incubated with iron ions. *Free Rad. Res.*, **26**, 585-592.

Ibrahim, W., Lee, U.S., Yeh, C.C., Szabo, J., Bruckner, G. et Chow, C.K., (1997) : Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver : effects of dietary lipid, vitamine E and iron. *J. Nutr.*, **127**, 1401-1406.

Iizawa, O., Kato, T., Tagami, H., Akamatsu, H. et Niwa, Y., (1994) : Long-term follow-up study of changes in lipid peroxide levels and the activity of superoxyde dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in mouse skin after acute and chronic UV irradiation. *Arch. Dermatol. Res.*, **286**, 47-52.

Iannone, A., Bini, A., Jin, Y.G., Vannini, V. et Tomasi, A., (1993) : *Tert*-butylhydroperoxide bioactivation to methyl radical in rat liver mitochondria and submitochondrial particles. *Free Rad. Res. Comms.*, **19**, Suppl., S141-S147.

Inoue, T., Mu, Z., Sumikawa, K., Adachi, K. et Okochi, T., (1993) : Effect of physical exercise on the content of 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA prepared from human lymphocytes. *Jpn. J. Cancer Res.*, **84**, 720-725.

Jacquin-Porretaz, M.C., (1996) : Mise au point des mesures et détermination des activités superoxyde dismutases totales chez *Unio tumidus*, bivalve dulçaquicole en conditions physiologiques et de stress chimique. *Thèse*, Université de Metz.

Jaruga, P., Zastawny, T.H., Skokowski, J., Dizdaroglu, M. et Olinski, R., (1994) : Oxidative DNA damage base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Lett.*, **341**, 59-64.

Jernelov, A., (1996) : The international mussel watch : a global assessment of environmental levels of chemical contaminants. *Sci. Total Environ.*, **188**, suppl.1, S37-S44.

Joyeux, M., Rolland, A., Fleurentin, J., Mortier, F. et Dorfman, P., (1990) : *Tert*-butyl hydroperoxyde-induced injury in isolated rat hepatocytes : a model for studying anti-hepatotoxic crude drugs. *Planta Med.*, **56**, 171-174.

Kahl, R., (1991) : Protective and adverse biological actions of phenolic antioxidants. In *Oxidative stress : oxidants and antioxidants*, Sies, H. (ed.), New York, Academic Press, p 245-277.

- Kamiya, H., Murata-Kamiya, N., Koizume, S., Inoue, H., Nishimura, S. et Ohtsuka, E., (1995) : 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in hot spots of the c-Ha-ras gene : effects of sequence contexts on mutation spectra. *Carcinogenesis*, **16**, 4, 883-889.
- Kaneno, T., Tahara, S. et Matsuo, M., (1996) : Non-linear accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanine, a marker of oxidized DNA damage, during aging. *Mutat. Res.*, **316**, 277-285.
- Kappus, H., (1987) : Oxidative stress in chemical toxicity. *Arch. Toxicol.*, **60**, 144-149.
- Kasai, H. et Nishimura, S., (1984a) : Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 2137-2145.
- Kasai, H. et Nishimura, S., (1984b) : DNA damage induced by asbestos in the presence of hydrogen peroxide. *Gann*, **75**, 841-844.
- Kasai, H., Tanooka, H. et Nishimura, S., (1984) : Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA by X-irradiation. *Gann*, **75**, 1037-1039.
- Kasai, H., Crain, P.F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Ootsuyama, A. et Tanooka, H., (1986) : Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis*, **7**, 11, 1849-1851.
- Kasai, H., Nishimura, S., Kurokawa, Y. et Hayashi, Y., (1987) : Oral administration of the renal carcinogen, potassium bromate, specially produces 8-hydroxydeoxyguanosine in rat target organ DNA. *Carcinogenesis*, **8**, 12, 1959-1961.
- Kasai, H., Okada, Y., Nishimura, S., Rao, M.S. et Reddy, J.K., (1989) : Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following long-term exposure to a peroxisome proliferator. *Cancer Res.*, **49**, 2603-2605.
- Kasai, H. et Nishimura, S., (1991) : Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by oxygen radicals and its biological significance. In *Oxidative stress : oxidants and antioxidants*, Sies, H. (ed.), Academic Press, London, p 99-119.
- Kasai, H., Chung, M.H., Yamamoto, F., Ohtsuka, E., Laval, J., Grollman, A.P. et Nishimura, S., (1993) : Formation, inhibition of formation, and repair of oxidative 8-hydroxyguanine DNA damage. In *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms III*, Bronzetti, G. et al. (ed.), Plenum Press, New York, p 257-262.
- Kasprzak, K., Jaruga, P., Zastawny, T.H., North, S.L., Riggs, C.W., Olinski, R. et Dizdaroglu, M., (1997) : Oxidative DNA base damage and its repair in kidneys and livers of nickel(II)-treated male F344 rats. *Carcinogenesis*, **18**, 2, 271-277.
- Kelly, J.D., Orner, G.A., Hendricks, J.D. et Williams, D.E., (1992) : Dietary hydrogen peroxide enhances hepatocarcinogenesis in trout : correlation with 8-hydroxydeoxyguanosine levels in liver DNA. *Carcinogenesis*, **13**, 1639-1642.

Kelner, M.J. et Alexander, N.M., (1986) : Inhibition of erythrocyte superoxide dismutase by diethylthiocarbamate also results in oxyhemoglobin-catalysed glutathione depletion and methemoglobin production. *J. Biol. Chem.*, **261**, 4, 5, 1636-1641.

Kelner, M.J., Bagnell, R., Hale, B. et Alexander, N.M., (1989) : Inactivation of intracellular copper-zinc superoxide dismutase by copper chelating agents without glutathione depletion and methemoglobin production. *Free Radical Biol. Med.*, **6**, 355-360.

Ketterer, B. et Coles, B., (1991) : Glutathione transferases and products of reactive oxygen. In *Oxidative stress : oxidants and antioxidants*, Sies, H. (ed.), New York, Academic Press, p 171-194.

King, J.K., Egner, P.A. et Kensler, T.W., (1996) : Generation of DNA base modification following treatment of cultured murine keratinocytes with benzoyl peroxide. *Carcinogenesis*, **17**, 2, 317-320.

Kiyosawa, H., Suko, M., Okudaira, H., Murata, K., Miyamoto, T., Chung, M.H., Kasai, H. et Nishimura, S., (1990) : Cigarette smoking induces formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, one of the oxidative DNA damages in human peripheral leucocytes. *Free Rad. Res. Comms.*, **11**, 1-3, 23-27.

Klaunig, J.E., Xu, Y., Isenberg, J.S., Bachowski, S., Kolaja, K.L., Jiang, J., Stevenson, D.E. et Walborg, E.F., (1998) : The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, **106**, suppl 1, 289-295.

Klobucar, G.I.V., Lajtner, J. et Erben, R., (1997) : Lipid peroxidation and histopathological changes in the digestive gland of a freshwater snail *Planorbarius corneus* L. (Gastropoda, Pulmonata) exposed to chronic and sub-chronic concentrations of PCP. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **58**, 128-134.

Kuchino, Y., Mori, F., Kasai, H., Inoue, H., Iwai, S., Miura, K., Ohtsuka, E. et Nishimura, S., (1987) : Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature*, **327**, 77-79.

Labrot, F., Ribera, D., Saint Denis, M. et Narbonne, J.F., (1996) : *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination : lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*, **1**, 21-28.

Lagorio, S., Tagesson, C., Forastiere, F., Iavarone, I., Axelson, O. et Carere, A., (1994) : Exposure to benzene and urinary concentrations of 8-hydroxydeoxyguanosine, a biological marker of oxidative damage to DNA. *Occup. Environ. Med.*, **51**, 739-743.

Lawrence, G.D. et Cohen, G., (1984) : Concentrating ethane from breath to monitor lipid peroxidation *in vivo*. *Methods Enzymol.*, **105**, 36, 305-311.

Leguille-Cossu, C. (1996) : Activités des systèmes antioxydants chez *Unio tumidus*, bivalve dulçaquicole, en conditions physiologiques et de stress chimique. *Thèse*, Université de Metz.

Lemaire, P., Den Besten, P.J., O'Hara, S.C.M. et Livingstone, D.R., (1993a) : Comparative metabolism of benzo(a)pyrene by microsomes of hepatopancreas of the shore crab *Carcinus maenas* L. and digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis* L. *Poly. Aromat. Coump.*, **3** (suppl.), 1133-1140.

Lemaire, P., Viarengo, A., Canesi, L. et Livingstone, D.R., (1993b) : Pro-oxidant and antioxidant processes in gas gland and others tissues of cod (*Gadus morhua*). *J. Comp. Physiol.*, **B163**, 477-486.

Lemaire, P., Matthews, A., Förlin, L. et Livingstone, D.R., (1994) : Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*) and perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **26**, 191-200.

Lenartova, V., Holovska, K., Pedrajas, J.R., Martinez-Lara, E., Peinado, J., Lopez-Barea, J., Rosival, I. et Kosuth, P., (1997) : Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarkers of river pollution. *Biomarkers*, **2**, 247-252.

Lindahl, T., (1993) : Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, **362**, 709-715.

Liu, J., Wang, X., Shigenaga, M.K., Yeo, H.C., Mori, A. et Ames, B.N., (1996a) : Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *FASEB*, **10**, 1532-1538.

Liu, L., Zhang, Q., Feng, J., Deng, L., Zeng, N., Yang, A. et Zhang, W., (1996b) : The study of DNA oxidative damage in benzene-exposed workers. *Mutat. Res.*, **370**, 145-150.

Liu, T.Y., Chen, C.L. et Chi, C.W., (1996c) : Oxidative damage to DNA induced by areca nut extract. *Mutat. Res.*, **367**, 25-31.

Liu, J., Yeo, H.C., Doniger, S.J. et Ames, B.N., (1997) : Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared to thiobarbituric acid. *Anal. Biochem.*, **245**, 161-166.

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

Livingstone, D.R. et Pipe, R.K., (1992) : Mussels and environmental contaminants : molecular and cellular aspects. In *The mussel Mytilus : Ecology, Physiology, Genetics and Culture*, Gosling, E. (ed.), Developments in Aquaculture and Fisheries Sciences, **25**, Elsevier, Amsterdam, p 425-464.

Livingstone, D.R., Lemaire, P., Matthews, A., Peters, L., Bucke D. et Law, R.J., (1993) : Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and others chemicals. *Mar. Poll. Bull.*, **26**, 11, 602-606.

Loft, S., Fischer-Nielsen, A., Jeding, I.B., Vistisen, K. et Poulsen, H.E., (1993) : 8-hydroxydeoxyguanosine as a urinary biomarker of oxidative DNA damage. *J. Toxicol. Environ. Health*, **40**, 391-404.

Lopez-Torres, M., Perez-Campo, R., Cadenas, S., Rojas, C. et Barja, G., (1993) : A comparative study of free radicals in vertebrates -II. Non-enzymatic antioxidants and oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.*, **105B**, 3/4, 757-763.

Lu, L.J.W., Tasaka, F., Hokanson, J.A. et Kohda, K., (1991) : Detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in deoxyribonucleic acid by the ³²P-postlabeling method. *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 7, 1880-1882.

Mac Cord, J.M. et Fridovich, I., (1969) : Superoxide dismutase : an enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055.

Maćcubbin, A.E., Przybyszewski, J., Evans, M.S., Budzinski, E.E., Patryc, H.B., Kulesz-Martin, M. et Box, H.C., (1995) : DNA damage in UVB-irradiated keratinocytes. *Carcinogenesis*, **16**, 7, 1659-1660.

Maellaro, E., Casini, A.F., Del Bello, B. et Comporti, M., (1990) : Lipid peroxidation and antioxidant systems in the liver injury produced by glutathione depleting agents. *Biochem. Pharmacol.*, **39**, 10, 1513-1521.

Malins, D.C., Ostrander, G.K., Haimanot, R. et Williams, P., (1990a) : A novel DNA lesion in neoplastic livers of feral fish : 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine. *Carcinogenesis*, **11**, 6, 1045-1047.

Malins, D.C. et Haimanot, R., (1990b) : 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine, 8-hydroxyguanine and 8-hydroxyadenine in DNA from neoplastic liver of English sole exposed to carcinogens. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, **173**, 2, 614-619.

Malins, D.C. et Haimanot, R., (1991a) : The etiology of cancer : hydroxyl radical-induced DNA lesions in histologically normal livers of fish from a population with liver tumors. *Aquat. Toxicol.*, **20**, 123-130.

Malins, D.C. et Haimanot, R., (1991b) : Major alterations in the nucleotide structure of DNA in cancer of the female breast. *Cancer Res.*, **51**, 5430-5432.

Malins, D.C., Polissar, N.L., Garner, M.M. et Gunselman, S. J., (1996) : Mutagenic DNA base modifications are correlated with lesions in nonneoplastic hepatic tissue of the English sole carcinogenesis model. *Cancer Res.*, **56**, 5563-5565.

- Mäntylä, E. et Ahotupa, M., (1993) : Polychlorinated biphenyls and naphthalenes : long-lasting induction of oxidative stress in the rat. *Chemosphere*, **27**, 1-3, 383-390.
- Marczynski, B., Rozynek, P. Elliehausen, H.J., Korm, M. et Baur, X., (1997) : Detection of 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage, in white blood cells of workers occupationally exposed to styrene. *Arch. Toxicol.*, **71**, 496-500.
- Marmur, J., (1961) : A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, **3**, 208-218.
- Marsh, J.W., Chipman, J.K. et Livingstone, D.R., (1993) : Formation of DNA adducts following laboratory exposure of the mussel, *Mytilus edulis*, to xenobiotics. *Sci. Total Environ.*, suppl. 1993, 567-572.
- Mather-Mihaich, E. et Di Giulio, R.T., (1986) : Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde, glutathione and methemoglobin concentrations in channel catfish exposed to DEF and *N*-butyl mercaptan. *Comp. Biochem. Physiol.*, **85C**, 2, 427-432.
- Mather-Mihaich, E. et Di Giulio, R.T. (1991) : Oxidant, mixed-function oxidase, and peroxisomal responses in channel catfish exposed to bleached kraft mill effluent. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **20**, 391-397.
- Mauthe, R.J., Cook, V.M., Coffing, S.L. et Baird, W.M., (1995) : Exposure of mammalian cell cultures to benzo(*a*)pyrene and light results in oxidative DNA damage as measured by 8-hydroxydeoxyguanosine formation. *Carcinogenesis*, **16**, 1, 133-137.
- Meneghini, R. et Martins, E.L., (1993) : Hydrogen peroxide and DNA damage. In *DNA and free radicals*, Halliwell, B. et Aruoma, O.I. (ed.), Ellis Horwood Limited, England, p 83-93.
- Michaels, M.L., Tchou, J., Grollman, A.P. et Miller, J.H., (1992) : A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. *Biochemistry*, **31**, 10964-10968.
- Michel, X.R., Cassand, P.M., Ribera, D.G. et Narbonne, J.F., (1992) : Metabolism and mutagenic activation of benzo(*a*)pyrene by subcellular fractions from mussel (*Mytilus galloprovincialis*) digestive gland and sea bass (*Discenthrarcus labrax*) liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, **103C**, 1, 43-51.
- Mills, G.C., (1957) : Hemoglobin catabolism. I - Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme, which protects hemoglobin from breakdown. *J. Biol. Chem.*, **229**, 189-197.
- Minotti, G. et Aust, S.D., (1992) : Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids*, **27**, 3, 219-226.
- Minotti, G., (1993) : Sources and role of iron in lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.*, **6**, 134-146.

- Mitsui, T., Kawai, H., Nagasawa, M., Kunishige, M., Akaike, M., Kimura, Y. et Saito, S., (1996) : Oxidative damage to skeletal muscle DNA from patients with mitochondrial encephalomyopathies. *J. Neurol. Sci.*, **136**, 111-116.
- Morel, I., Lescoat, G., Cillard, J., Padeloup, N., Brissot, P. et Cillard, P., (1990) : Kinetic evaluation of free malondialdehyde and enzyme leakage as indices of iron damage in rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.*, **39**, 11, 1647-1655.
- Moriya, M., Ou, C., Bodepudi, V., Johnson, F., Takeshita, M. et Grollman, A.P., (1991) : Site-specific mutagenesis using a gapped duplex vector : a study of translesion synthesis past 8-oxodeoxyguanosine in *E. coli*. *Mutat. Res.*, **254**, 281-288.
- Morrero, R. et Marnett, L.J., (1993) : The role of organic peroxy radicals in carcinogenesis. In *DNA and free radicals*, Halliwell, B. et Aruoma, O.I. (ed.), Ellis Horwood Limited, England, p 145-162.
- Müller, A. et Sies, H., (1984) : Assay of ethane and pentane from isolated organs and cells. *Methods Enzymol.*, **105**, 37, 311-319.
- Muscari, C., Giaccari, A., Stefanelli, C., Viticchi, C., Giordano, E., Guarnieri, C. et Caldarera, C.M., (1996) : Presence of a DNA-4236 bp deletion and 8-hydroxyguanosine in mouse cardiac mitochondrial DNA during aging. *Aging Clin. Exp. Res.*, **8**, 429-433.
- Nardini, M., Scaccini, C., d'Aquino, M., Corcos Benedetti, P., Di Felice, M. et Tomassi, G., (1993) : Lipid peroxidation in liver microsomes of rats fed soybean, olive, and coconut oil. *J. Nutr. Biochem.*, **4**, 39-44.
- Nagai, F., Ushiyama, K., Satoh, K., Kasai, H. et Kano, I., (1995) : Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in calf thymus DNA treated *in vitro* with phenylhydroquinone, the major metabolite of *o*-phenylphenol. *Carcinogenesis*, **16**, 4, 837-840.
- Nagel, K.O., (1988) : Anatomische, morphologische und biochemische untersuchungen zur taxonomie und systematik der europäischen Unionacea (Mollusca : bivalvia). *PhD thesis*, Gesamthochschule Kassel.
- Nakae, D., Mizumoto, Y., Kobayashi, E., Noguchi, O. et Konishi, Y., (1995) : Improved genomic/nuclear DNA extraction for 8-hydroxydeoxyguanosine analysis of small amounts of rat liver tissue. *Cancer Lett.*, **97**, 233-239.
- Nakagawa, Y. et Tayama, S., (1996) : Induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in CHO-K1 cells exposed to phenyl-hydroquinone, a metabolite of *ortho*-phenylphenol. *Cancer Lett.*, **101**, 227-232.
- Nakajima, M., Takeuchi, T. et Morimoto, K., (1996) : Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine in human cells under oxygen-free conditions. *Carcinogenesis*, **17**, 4, 787-791.

- Nishimoto, M., Roubal, W.T., Stein, J.E. et Varanasi, U., (1991) : Oxidative DNA damage in tissues of English sole (*Parophrys vetulus*) exposed to nitrofuratoin. *Chem.-Biol. Interactions*, **80**, 317-326.
- Ohtawa, M., Seko, M. et Takayama, F., (1983) : Effect of aluminium ingestion on lipid peroxidation in rats. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 4, 1415-1418.
- Oteiza, P.I., Olin, K.L., Fraga, C.G. et Keen, C.L., (1995) : Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. *J. Nutr.*, **125**, 823-829.
- Okamoto, K., Toyokyni, S., Uchida, K., Ogawa, O., Takenewa, J., Kakehi, Y., Kinoshita, H., Hattori-Nakakuki, Y., Hiai, H et Yoshida, O., (1994) : Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in human renal-cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, **58**, 825-829.
- Palamanda, J.R. et Kehrer, J.P., (1993) : Involvement of vitamin E and protein thiols in the inhibition of microsomal lipid peroxidation by glutathione. *Lipids*, **28**, 5, 427-431.
- Park, J.W., Cundy, K.C. et Ames, B.N., (1989) : Detection of DNA adducts by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Carcinogenesis*, **10**, 5, 827-832.
- Park, J.W. et Floyd, R.A., (1992) : Lipid peroxidation products mediate the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA. *Free Radical Biol. Med.*, **12**, 245-250.
- Parrish, J.M., Austin, E.W., Stevens, D.K., Kinder, D.H. et Bull, R.J., (1996) : Haloacetate-induced oxidative damage to DNA in the liver of male B6C3F1 mice. *Toxicology*, **110**, 103-111.
- Pedrajas, J.R., Peinado, J. et Lopez-Barea, J., (1995) : Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chem.-Biol. Interactions*, **98**, 267-282.
- Poli, G., Cheeseman, K.H., Biasi, F., Chiarpotto, E., Dianzani, M.U., Esterbauer, H. et Slater, T.F., (1989) : Promethazine inhibits the formation of aldehydic products of lipid peroxidation but not covalent binding resulting from the exposure of liver fractions to CCl₄. *Biochem. J.*, **264**, 527-532.
- Pré, J., (1991) : La lipoperoxydation. *Path. Biol.*, **39**, 7, 716-736.
- Priemé, H., Loft, S., Klarlund, M., Grønbaek, K., Tønnesen, P. et Poulsen, H.E., (1998) : Effect of smoking cessation on oxidative DNA modification estimated by 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion. *Carcinogenesis*, **19**, 2, 347-351.
- Pryor, W.A. et Castle, L., (1984) : Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxydes. *Methods Enzymol.*, **105**, 34, 293-299.

Pryor, W.A., (1988) : Why is the hydroxyl radical the only radical that commonly adds to DNA ? Hypothesis : it has a rare combination of high electrophilicity, high thermochemical reactivity, and a mode of production that can occur near DNA. *Free Radical Biol. Med.*, **4**, 219-223.

Radi, A.A.R., Hay, D.Q., Gabrielak, T. et Matkovics, B., (1985) : Comparative antioxidant enzyme study in freshwater fishes. I. Distribution of superoxide dismutase, peroxide-decomposing enzymes and lipid peroxidation in herbivorous fishes. *Acta Bio. Hung.*, **36**, 2, 169-174.

Radi, A.A.R. et Matkovics, B., (1988) : Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues. *Comp. Biochem. Physiol.*, **90C**, 1, 69-72.

Ramotar, D. et Demple, B., (1993) : Enzymes that repair oxidative damage to DNA. In *DNA and free radicals*, Halliwell, B. et Aruoma, O.I. (ed.), Ellis Horwood Limited, England, p 165-191.

Ravanat, J.L., Turesky, R.J., Gremaud, E., Trudel, L.J. et Stadler, R.H., (1995) : Determination of 8-oxoguanine in DNA by gas chromatography-mass spectrometry and CLHP-electrochemical detection : overestimation of the background level of the oxidized base by the gas chromatography-mass spectrometry assay. *Chem. Res. Toxicol.*, **8**, 8, 1039-1045.

Recknagel, R.O. et Glende, E.A., (1984) : Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods Enzymol.*, **105**, 40, 331-337.

Ribera, D., Narbonne, J.F., Daubeze, M. et Michel, X., (1989) : Characterisation, tissue distribution and sexual differences of some parameters related to lipid peroxidation in mussels. *Marine Environ. Res.*, **28**, 279-283.

Ribera D., Narbonne, J.F., Michel, X., Livingstone, D.R. et O'Hara, S., (1991) : Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comp. Biochem. Physiol.*, **100C**, 1/2, 177-181.

Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T. et Symons, M.C.R., (1991) : Techniques in free radical research. In *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, Burton, R.H. et van Knippenberg, P.H. (ed.), Elsevier Science Publishers B.V., The Netherlands.

Richter, C., Park, J.W. et Ames, B.N., (1988) : Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 6465-6467.

Richter, C., (1992) : Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria. *Mutat. Res.*, **275**, 249-255.

Rodriguez-Ariza, A., Abril, N., Navas, J.I., Dorado, G., J. Lopez-Barea et Pueyo, C., (1992) : Metal, mutagenicity, and biochemical studies on bivalve molluscs from Spanish Coasts. *Environ. Mol. Mutagen.*, **19**, 112-124.

- Rodriguez-Ariza, A., Peinado, J., Pueyo, C. et Lopez-Barea, J., (1993) : Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, **50**, 2568-2573.
- Romeo, M. et Gnassia-Barelli, M., (1997) : Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **118C**, 1, 33-37.
- Rush, G.F., Gorski, J.R., Ripple, M.G., Sowinski, J., Bugelski, P. et Hewitt, W.R., (1985) : Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell health in isolated hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **78**, 473-483.
- Russanov, E., Zaporowska, H., Ivancheva, E., Kirkova, M. et Konstantinova, S., (1994) : Lipid peroxidation and antioxidant enzymes on vanadate-treated rats. *Comp. Biochem. Physiol.*, **107C**, 3, 415-421.
- Sai, K., Takagi, A., Umemura, T., Hasegawa, R. et Kurokawa, Y., (1991) : Relation of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in rat kidney to lipid peroxidation, glutathione level and relative organ weight after a single administration of potassium bromate. *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 165-169.
- Sai, K., Takagi, A., Umemura, T., Hasegawa, R. et Kurokawa, Y., (1992) : Changes of 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organ DNA during the aging process. *JEPTO*, **11**, 3, 139-143.
- Salvati, S., Malvezzi Campeggi, L.M., Corcos Benedetti, P.C., Di Felice, M., Gentile, V., Nardini, M. et Tomassi, G., (1993) : Effects of dietary oils on fatty acid composition and lipid peroxidation of brain membranes (myelin and synaptosomes) in rats. *J. Nutr. Biochem.*, **4**, 346-350.
- Sausen, P.J., Lee, D.C., Rose, M.L. et Cattley, R.C., (1995) : Elevated 8-hydroxydeoxyguanosine in hepatic DNA of rats following exposure to peroxisome proliferators : relationship to mitochondrial alterations. *Carcinogenesis*, **16**, 8, 1795-1801.
- Sawada, M., Sester, U. et Carlson, J.C., (1993) : Changes in superoxide radical formation, lipid peroxidation, membrane fluidity and cathepsin B activity in aging and spawning male chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Mech. Ageing Dev.*, **69**, 137-147.
- Schweich, M.D., Lison, D. et Lauwerys, R., (1994) : Assessment of lipid peroxidation associated with lung damage induced by oxidative stress, *in vivo* and *in vitro* studies. *Biochem. Pharmacol.*, **47**, 8, 1395-1400.
- Sharma, M., Box, H.C. et Paul, C.R., (1990) : Detection and quantification of 8-hydroxydeoxyguanosine 5'-monophosphate in X-irradiated calf thymus DNA by fluorescence postlabeling assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **167**, 419-242.
- Shen, H.M., Shi, C.Y., Lee, H.P. et Ong, C.N., (1994) : Aflatoxin B₁-induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **127**, 145-150.

Shen, H.M., Ong, C.N., Lee, B.L. et Shi, C.Y., (1995) : Aflatoxin B₁-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation in rat hepatic DNA. *Carcinogenesis*, **16**, 2, 419-422.

Shi, X., Mao, Y., Ahmed, N. et Jiang, H., (1995) : CLHP investigation on Ni(II)-mediated DNA damage in the presence of *t*-butyl hydroperoxide and glutathione. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **57**, 91-102.

Shibutani, S., Takeshita, M. et Grollman, A.P., (1991) : Insertion of specific base during DNA synthesis past the oxidation damaged base 8-oxodG. *Nature*, **349**, 431-434.

Shigenaga, M.K., Park, J.W., Cundy, K.C., Gimeno, C.L. et Ames, B.N., (1990) : In vivo oxidative DNA damage : measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol.*, **186**, 521-530.

Shigenaga, M.K. et Ames, B.N., (1991) : Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine : a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radical Biol. Med.*, **10**, 211-216.

Shigenaga, M.K., Aboujaoude, E.N., Chen, Q. et Ames, B.N., (1994) : Assays of oxidative DNA damage biomarkers 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxoguanine in nuclear DNA and biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol.*, **234**, 17-33.

Sies, H. (ed.), (1991) : *Oxidative stress : oxidants and antioxidants*, Academic Press, London.

Singh, Y., Hall, G. et Miller, M.G., (1989) : Mechanisms of lipid peroxidation in the rat and trout. *Toxicologist*, **9**, 219 (Abstr.).

Slater, T.F., (1984) : Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, **105**, 33, 283-293.

Snell, K. et Mullock, B., (1987) : *Biochemical toxicology a practical approach*, IRL Press, England.

Solé, M., Porte, C., Biosca, X., Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K., Livingstone, D.R. et Albaigés, J., (1996) : Effects of the « Aegean Sea » oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis L.*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **113C**, 2, 257-265.

Stegeman, J.J., Brouwer, M., Di Giulio, R.T., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M. et Van Veld, P.A., (1992) : Molecular responses to environmental contamination : enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In : *Biomarkers, biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*, Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M. et Bergman, H.L. (ed.), Lewis Publishers, USA.

- Stewart, M.S., Cameron, G.S. et Pence, B.C., (1996) : Antioxidant nutrients protect against UVB-induced oxidative damage to DNA of mouse keratinocytes in culture. *J. Invest. Dermatol.*, **106**, 1086-1089.
- Sunderman, F.W., Abubakr Marzouk, M.D., Hopfer, S.D., Zaharia, O. et Reid, M.C., (1985) : Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **15**, 3, 229-236.
- Taffe, B.G., Larminat, F., Laval, J., Croteau, D.L., Anson, R.M. et Bohr, V.A., (1996) : Gene-specific nuclear and mitochondrial repair of formamidopyrimidine DNA glycosylase-sensitive sites in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.*, **364**, 183-192.
- Tagesson, C., Källberg, M., Klintonberg, C. et Starkhammar, H., (1995) : Determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by automated coupled-column high performance liquid chromatography : a powerful technique for assaying *in vivo* oxidative DNA damage in cancer patients. *Eur. J. Cancer*, **31A**, 6, 934-940.
- Takeuchi, T., Nakajima, M. et Morimoto, K., (1996) : Relationship between the intracellular reactive oxygen species and the induction of oxidative DNA damage in human neutrophil-like cells. *Carcinogenesis*, **17**, 8, 1543-1548.
- Teebor, G.W., Boorstein, R.J. et Cadet, J., (1988) : The reparability of oxidative free radical mediated damage to DNA : a review. *Int. J. Radiat. Biol.*, **54**, 2, 131-150.
- Telli-Karakoc, F., Hewan, A., Phillips, D.H., Gaines, A.F. et Yuregir, G., (1997) : Biomarkers of marine pollution observed in species of mullet living in two eastern Mediterranean harbours. *Biomarkers*, **2**, 303-309.
- Téoule, R., (1987) : Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int. J. Radiat. Biol.*, **51**, 4, 573-589.
- Thomas, P. et Wofford, H.W., (1993) : Effects of cadmium and Aroclor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in *Atlantic croaker* tissues. *Aquat. Toxicol.*, **27**, 159-178.
- Tiidus, P.M., Behrens, W.A., Madere, R., Kim, J.J. et Houston, M.E., (1993) : Effects of vitamin E status and exercise training on tissue lipid peroxidation based on two methods of assessment. *Nutr. Res.*, **13**, 219-22
- Tomita, M. et Okuyama, T., (1994) : Effect of paraquat on the malondialdehyde level in rat liver microsomes (in vitro). *Arch. Toxicol.*, **68**, 187-192.
- Toyokuni, S., Mori, T. et Dizdaroglu, M., (1994) : DNA base modifications in renal chromatin of Wistar rats treated with renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Int. J. Cancer.*, **57**, 123-128.
- Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J. et Hiai, H., (1995) : Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.*, **358**, 1-3.

- Tritscher, A.M., Seacat, A.M., Yager, J.D., Groopman, J.D., Miller, B.D., Bell, D., Sutter, T.R et Lucier, G.W. (1996) : Increased oxidative DNA damage in livers of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin treated intact but on ovariectomized rats. *Cancer Lett.*, **98**, 219-225.
- Tseng, T.H., Wang, C.J., Kao, E.S. et Chu, C.Y., (1996) : *Hibicus* protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by *tert*-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem.-Biol. Interactions*, **101**, 137-148.
- Tsou, T.C., Chen, C.L., Liu, T.Y. et Yang, J.L., (1996) : Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by chromium (III) plus hydrogen peroxide and its prevention by scavengers. *Carcinogenesis*, **17**, 1, 103-108.
- Umemura, T., Sai, K., Takagi, A., Hasegawa, R. et Kurokawa, Y., (1995) : A possible role for oxidative stress in potassium bromate (KBrO₃) carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **16**, 3, 593-597.
- Umemura, T., Hasegawa, R., Sai-Kato, K., Nishikawa, A., Furukawa, F., Toyokuni, S., Uchida, K., Inoue, T. et Kurokawa, Y., (1996) : Prevention by 2-mercaptoethane sulfonate and *N*-acetylcysteine of renal oxidative damage in rats treated with ferric nitrilotriacetate. *Jpn. J. Cancer Res.*, **87**, 882-886.
- Uchiyama, M. et Mihara, M., (1978) : Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.*, **86**, 271-278.
- Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L. et Gregolin, C. (1982) : Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidyl-choline liposomes. *Biochem. Biophys. Acta*, **710**, 197-211.
- Ursini, F., Maiorino, M. et Sevanian, A., (1991) : Membrane hydroperoxides. In *Oxidative stress : oxidants and antioxidants*, Sies, H. (ed.), Academic Press, London, p 319-336.
- Valenzuela, A., (1991) : The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidation stress. *Life Sciences*, **48**, 4, 301-309.
- Vasseur, P., Dive, D., Sokar, Z. et Bonnemain, H., (1988) : Interactions between copper and some carbamates used in phytosanitary treatments. *Chemosphere*, **17**, 4, 767-782.
- Venugopal, N.B.R.K., Ramesh, T.V.D.D., Reddy, D.S. et Reddy, S.L.N., (1997) : Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in a freshwater field crab, *Barytelphusa guerini*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **59**, 132-138.
- Viarengo, A., Pertica, M., Canesi, L., Biasi, F., Cecchini, G. et Orunesu, M., (1988) : Effects of heavy metals on lipid peroxidation in mussels tissues. *Mar. Environ. Res.*, **24**, 354.

Viarengo, A., Pertica, M., Canesi, L., Accomando, R., Mancinelli, G. et Orunesu, M., (1989) : Lipid peroxidation and level of antioxidant compounds (GSH, vitamin E) in the digestive glands of mussels of three different age groups exposed to anaerobic and aerobic conditions. *Mar. Environ. Res.*, **28**, 291-295.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M. et Livingstone, D.R., (1991a) : Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol.*, **100C**, 1/2, 187-190.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R. et Ornesu, M., (1991b) : Age-related lipid peroxidation in the digestive gland of mussels: the role of the antioxidant defence systems. *Experientia*, **47**, 454-457.

Wamer, W.G. et Wei, R.R., (1997) : *In vitro* photooxidation of nucleic acids by ultraviolet A radiation. *Photochem. Photobiol.*, **65**, 3, 560-563.

Wei H., Cai, Q. et Rahn, R.O., (1996) : Inhibition of UV light- and Fenton reaction-induced DNA damage by the soybean isoflavon genistein. *Carcinogenesis*, **17**, 1, 73-77.

Wenning, R.J., Di Giulio, R.T. et Gallagher, E.P., (1988) : Oxidant-mediated biochemical effects of paraquat in the ribbed mussel, *Geukensia demissa*. *Aquat. Toxicol.*, **12**, 157-170.

Wilhelm Filho, D. et Boveris, A., (1993) : Antioxidant defences in marine fish -II. Elasmobranchs. *Comp. Biochem. Physiol.*, **106C**, 2, 415-418.

Winston, G.W. et Di Giulio, R.T., (1991) : Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, **19**, 137-161.

Wofford, H.W. et Thomas, P., (1988a) : Effect of xenobiotics on peroxidation of hepatic microsomal lipids from striped mullet (*Mugil cephalus*) and Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Marine Environ. Res.*, **24**, 285-289.

Wofford, H.W. et Thomas, P., (1988b) : Peroxidation of mullet and rat liver lipids *in vitro* : effects of pyridine nucleotides, iron, incubation buffer, and xenobiotics. *Comp. Biochem. Physiol.*, **89C**, 2, 201-205.

Wojcik, A., Grzesiuk, E., Tudek, B. et Janion, C., (1996) : Conformation of plasmid DNA from *Escherichia coli* deficient in the repair systems protecting from 8-oxoguanine lesions. *Biochimie*, **78**, 85-89.

Wood, M.L., Dizdaroglu, M., Gajewski, E. et Essigmann, J.M., (1990) : Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis : genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry*, **29**, 7024-7032.

Yamaguchi, R., Hirano, T., Asami, S., Sugita, A. et Kasai, H., (1996a) : Increase in the 8-hydroxyguanine repair activity in the rat kidney after administration of a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Environ. Health Perspect.*, **104**, suppl. 3, 651-653.

Yamaguchi, R., Hirano, T., Asami, S., Chung, M.H., Sugita, A. et Kasai, H., (1996b) : Increased 8-hydroxyguanine levels in DNA and its repair activity in rat kidney after administration of a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Carcinogenesis*, **17**, 11, 2419-2422.

Yamamoto, F., Kasai, H., Bessho, T., Chung, M.H., Inoue, H., Ohtsuka, E., Hori, T. et Nishimura, S., (1992) : Ubiquitous presence in mammalian cells of enzymatic activity specifically cleaving 8-hydroxyguanine-containing DNA. *Jpn. J. Cancer Res.*, **83**, 351-357.

Yarborough, A., Zhang, Y.J., Hsu, T.M. et Santella, R.M., (1996) : Immunoperoxidase detection of 8-hydroxydeoxyguanosine in aflatoxin B₁-treated rat liver and human oral mucosal cells. *Cancer Res.*, **56**, 683-688.

Yin, B., Whyatt, R.M., Perera, F.P., Randall, M.C., Cooper, T.B. et Santella, R.M., (1995) : Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA. *Free Radical Biol. Med.*, **18**, 6, 1023-1032.

Younes, M. et Siegers, C.P., (1983) : Formation of ethane in vitro by rat liver homogenates following glutathione depletion in vivo. *Toxicol. Lett.*, **15**, 213-218.

Zastawny, T.H., Altman, S.A., Randers-Eichhorn, L., Madurawe, R., Lumpkin, J.A., Dizdaroglu, M. et Rao, G., (1995) : DNA base modifications and membrane damage in cultured mammalian cells treated with iron ions. *Free Radical Biol. Med.*, **18**, 6, 1013-1022.

Zastawny, T.H., Czerwinska, B., Drzewiecka, B. et Olinski, R., (1996) : Radiation-induced oxidative DNA base damage and its repair in liver chromatin DNA of rats upon whole body γ -irradiation. *Acta Biochimica Polonica*, **43**, 3, 579-582.

Zastawny, T.H., Czerwinska, B., Drzewiecka, B. et Olinski, R., (1997) : Radiation-induced oxidative DNA base damage and its repair in nuclear matrix-associated DNA and in bulk DNA in hepatic chromatin of rat upon whole-body γ -irradiation. *Free Radical Biol. Med.*, **22**, 1/2, 101-107.

Zompetta, P.M., De Luca, C., Amantea, A., Faggioni, A., Nazzaro-Porro, M. et Passi, S., (1991) : Squalene peroxides may contribute to ultraviolet light-induced immunological effects. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **8**, 105-110.

Zollner, H., Schaur, R.J. et Esterbauer, H., (1991) : Biological activities of 4-hydroxyalkenals, in *Oxidative stress : oxidants and antioxidants*, Sies, H. (ed.), Academic Press, London, p 337-369.

Annexes

Annexe I : Analyses physico-chimiques réalisées sur la fraction fine (< 1mm) des sédiments prélevés sur le site de la Fensch (sept. 1995). n.d. : non déterminé.

Sites	Site de référence	Amont	Aval 1	Aval 2
Paramètres physico-chimiques				
Matières sèches (%)	68.3	50.6	61.8	74.6
Carbone organique total (C) (g/kg m.s.)	18.0	93.1	44.9	40.0
Hydrocarbures polycycliques aromatiques (µg/kg m.s.)				
Fluoranthène	21.10	5781	5761	22882
Benzo(b)fluoranthène	2.49	2735	1990	11418
Benzo(k)fluoranthène	2.59	2587	536	383
Benzo(a)pyrène	6.79	7625	2774	3954
Benzo(ghi)pérylène	2.4	3072	2368	2115
Indénopyrène	2.4	2207	2322	1509
Chlorophénols (µg/kg m.s.)				
2,3-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2,4-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2,5-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2,6-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
3,4-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
3,5-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2,4,5-Trichlorophénol	< 10	< 10	< 10	< 10
2,4,6-Trichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
Pentachlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
Pesticides organochlorés (µg/kg m.s.)				
Hexachlorobutadiène	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Hexachlorobenzène	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Aldrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
Dieldrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
Endrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
OP DDD	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PP DDD	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
OP DDE	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PP DDE	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
OP DDT	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PP DDT	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
1,2-Dichlorobenzène	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
1,3-Dichlorobenzène	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
1,4-Dichlorobenzène	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
1,2,3-Trichlorobenzène	< 0.20	< 0.20	< 0.20	< 0.20
1,2,4-Trichlorobenzène	< 0.20	< 0.20	< 0.20	< 0.20
1,3,5-Trichlorobenzène	< 0.20	< 0.20	< 0.20	< 0.20
Polychlorobiphényles (µg/kg m.s.)				
PCB 28	< 0.15	< 0.15	< 0.15	< 0.15
PCB 52	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PCB 101	< 0.15	205	207	165
PCB 118	< 0.15	307	149	254
PCB 138	0.31	569	280	357
PCB 153	0.51	558	311	288
PCB 180	0.29	420	298	229
Métaux (mg/kg m.s.)				
Arsenic	9.9	39.3	28.6	32.6
Chrome total	11.0	34.4	77.8	73.6
Cuivre	7.9	89.3	93.5	92.6
Cadmium	< 1	< 1	< 1	< 1
Plomb	8.0	254	198	163
Mercure	< 0.05	0.96	18.4	0.52
Nickel	16.4	40.6	56.3	70.8
Zinc	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Etain	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fer	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Annexe II : Analyses physico-chimiques réalisées sur la fraction fine (< 1mm) des sédiments prélevés sur le site des Vosges (oct. 1996).

Sites	Site de référence	Amont	Aval 1	Aval 2
Paramètres physico-chimiques				
Matières sèches (%)	64.5	21.3	39.8	16.3
Carbone organique total (C) (g/kg m.s.)	14	96.9	38.8	115
Hydrocarbures polycycliques aromatiques (µg/kg m.s.)				
Fluoranthène	23.8	3880	1340	2210
Benzo(b)fluoranthène	7.13	627	291	975
Benzo(k)fluoranthène	3.03	334	113	298
Benzo(a)pyrène	5.49	729	376	682
Benzo(ghi)pérylène	3.8	1160	239	623
Indénopyrène	6.2	1510	321	736
Chlorophénols (µg/kg m.s.)				
2,3-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2,4-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2,5-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2,6-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
3,4-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
3,5-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2,4,5-Trichlorophénol	< 10	< 10	< 10	< 10
2,4,6-Trichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
Pentachlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
Pesticides organochlorés (µg/kg m.s.)				
Hexachlorobutadiène	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Hexachlorobenzène	0.39	1.16	< 0.05	0.58
Aldrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
Dieldrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
Endrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
OP DDD	< 0.25	5.06	< 0.25	1.90
PP DDD	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
OP DDE	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PP DDE	< 0.25	1.59	< 0.25	< 0.25
OP DDT	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PP DDT	< 0.25	2.60	< 0.25	< 0.25
1,2-Dichlorobenzène	27.3	3.5	< 0.5	< 0.5
1,3-Dichlorobenzène	< 0.5	< 0.5	8.2	< 0.5
1,4-Dichlorobenzène	13.5	31.5	22.6	32.8
1,2,3-Trichlorobenzène	5.87	5.92	2.66	6.57
1,2,4-Trichlorobenzène	6.10	12.8	6.87	13.5
1,3,5-Trichlorobenzène	5.71	5.36	< 0.20	5.46
Polychlorobiphényles (µg/kg m.s.)				
PCB 28	< 0.15	7.61	< 0.15	5.39
PCB 52	< 0.25	0.28	7.53	4.71
PCB 101	< 0.15	6.05	33.4	2.07
PCB 118	< 0.15	17.6	125	6.29
PCB 138	< 0.10	18.8	83.2	5.17
PCB 153	< 0.10	20.5	95.8	4.76
PCB 180	< 0.05	12.1	41.2	2.15
Métaux (mg/kg m.s.)				
Arsenic	12.8	25.3	9.9	27.0
Chrome total	30.5	44.0	19.0	56.3
Cuivre	10.0	42.2	13.4	44.8
Cadmium	< 0.1	1.02	0.23	0.87
Plomb	10.1	103	28.4	114
Mercure	0.08	1.03	0.41	0.93
Nickel	22.3	18.9	8.4	22.9
Zinc	47.9	251	91.7	295
Etain	< 4	11.0	< 4	10.9
Fer	19100	16000	7450	15900

Annexe III : Analyses physico-chimiques réalisées sur la fraction fine (< 1mm) des sédiments prélevés sur le site du Lot et Garonne (juillet 1996)

Sites	Site de référence	Amont	Aval 1	Aval 2
Paramètres physico-chimiques				
Matières sèches (%)	64.5	57.4	65.3	53.9
Carbone organique total (C) (g/kg m.s.)	14	22.7	14.9	34.7
Hydrocarbures polycycliques aromatiques (µg/kg m.s.)				
Fluoranthène	23.8	38.4	600	462
Benzo(b)fluoranthène	7.13	15.9	206	172
Benzo(k)fluoranthène	3.03	9.02	116	113
Benzo(a)pyrène	5.49	15.5	244	227
Benzo(ghi)pérylène	3.8	14.2	143	278
Indénopyrène	6.2	11.6	153	192
Chlorophénols (µg/kg m.s.)				
2,3-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2,4-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2,5-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2,6-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
3,4-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
3,5-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2,4,5-Trichlorophénol	< 10	< 10	< 10	< 10
2,4,6-Trichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
Pentachlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
Pesticides organochlorés (µg/kg m.s.)				
Hexachlorobutadiène	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Hexachlorobenzène	0.39	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Aldrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
Dieldrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
Endrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
OP DDD	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PP DDD	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
OP DDE	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PP DDE	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
OP DDT	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PP DDT	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
1,2-Dichlorobenzène	27.3	25.5	26.7	23.0
1,3-Dichlorobenzène	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
1,4-Dichlorobenzène	13.5	23.8	26.6	21.8
1,2,3-Trichlorobenzène	5.87	< 0.20	< 0.20	2.06
1,2,4-Trichlorobenzène	6.10	8.34	8.52	6.91
1,3,5-Trichlorobenzène	5.71	1.33	< 0.20	< 0.20
Polychlorobiphényles (µg/kg m.s.)				
PCB 28	< 0.15	< 0.15	< 0.15	< 0.15
PCB 52	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PCB 101	< 0.15	< 0.15	< 0.15	< 0.15
PCB 118	< 0.15	< 0.15	< 0.15	< 0.15
PCB 138	< 0.10	< 0.10	< 0.10	< 0.10
PCB 153	< 0.10	< 0.10	< 0.10	< 0.10
PCB 180	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Métaux (mg/kg m.s.)				
Arsenic	12.8	19.9	79.2	28.3
Chrome total	30.5	13.0	17.9	24.1
Cuivre	10.0	11.7	44.2	21.7
Cadmium	< 0.1	0.66	19.1	12.5
Plomb	10.1	17.4	124	56.1
Mercure	0.08	0.03	3.83	0.87
Nickel	22.3	11.6	15.8	19.1
Zinc	47.9	138	1260	636
Etain	< 4	1.5	11.8	3.6
Fer	19100	14500	20400	20300

Annexe IV : Analyses physico-chimiques réalisées sur la fraction fine (< 1mm) des sédiments prélevés sur le site du Lot et Garonne (oct. 1997).

Sites	Site de référence	Amont	Aval 1	Aval 2
Paramètres physico-chimiques				
Matières sèches (%)	66.0	54.6	28.4	44.0
Carbone organique total (C) (g/kg m.s.)	12.8	10.0	40.4	54.4
Hydrocarbures polycycliques aromatiques (µg/kg m.s.)				
Fluoranthène	12.5	40.7	2150	407
Benzo(b)fluoranthène	< 0.10	28.2	908	181
Benzo(k)fluoranthène	1.68	20.5	654	136
Benzo(a)pyrène	3.21	39.4	1240	312
Benzo(ghi)pérylène	2.24	23.1	542	150
Indénopyrène	< 0.50	12.5	417	285
Chlorophénols (µg/kg m.s.)				
2,3-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2,4-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2,5-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2,6-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
3,4-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
3,5-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2,4,5-Trichlorophénol	< 10	< 10	< 10	< 10
2,4,6-Trichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
Pentachlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
Pesticides organochlorés (µg/kg m.s.)				
Hexachlorobutadiène	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Hexachlorobenzène	< 0.05	< 0.05	4.20	< 0.05
Aldrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
Dieldrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
Endrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
OP DDD	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PP DDD	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
OP DDE	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PP DDE	< 0.25	< 0.25	1.25	< 0.25
OP DDT	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PP DDT	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
1,2-Dichlorobenzène	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
1,3-Dichlorobenzène	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
1,4-Dichlorobenzène	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
1,2,3-Trichlorobenzène	< 0.20	< 0.20	< 0.20	< 0.20
1,2,4-Trichlorobenzène	< 0.20	< 0.20	< 0.20	< 0.20
1,3,5-Trichlorobenzène	< 0.20	< 0.20	< 0.20	< 0.20
Polychlorobiphényles (µg/kg m.s.)				
PCB 28	< 0.20	< 0.20	1.65	< 0.20
PCB 52	< 0.20	< 0.20	5.56	< 0.20
PCB 101	< 0.15	< 0.15	6.15	2.13
PCB 118	< 0.20	< 0.20	4.23	1.31
PCB 138	< 0.20	< 0.20	4.85	2.49
PCB 153	< 0.20	< 0.20	5.72	3.85
PCB 180	< 0.50	< 0.50	< 0.50	1.96
Métaux (mg/kg m.s.)				
Arsenic	16.6	32.2	240	70.2
Chrome total	36.6	27.4	55.5	55.2
Cuivre	19.7	17.3	123	51.1
Cadmium	< 0.15	0.91	66.7	33.3
Plomb	28.6	47.6	379	166
Mercuré	0.04	0.05	4.79	1.06
Nickel	50.1	23.8	68.5	58.4
Zinc	126	148	3810	1570
Etain	0.7	0.7	6.2	4.9
Fer	38000	25800	76200	52800

Annexe V : Analyses physico-chimiques réalisées sur la fraction fine (< 1mm) des sédiments prélevés sur le site de la Sarthe (octobre 1996)

Sites	Site de référence	Amont	Aval 1	Aval 2
Paramètres physico-chimiques				
Matières sèches (%)	64.5	43.0	27.1	53.9
Carbone organique total (C) (g/kg m.s.)	14	64.9	92.1	23.5
Hydrocarbures polycycliques aromatiques (µg/kg m.s.)				
Fluoranthène	23.8	137	391	56.5
Benzo(b)fluoranthène	7.13	38.5	101	10.6
Benzo(k)fluoranthène	3.03	34.0	39.3	5.59
Benzo(a)pyrène	5.49	49.8	75.2	8.88
Benzo(ghi)pérylène	3.8	38.2	89.1	4.7
Indénopyrène	6.2	64	111	10.9
Chlorophénols (µg/kg m.s.)				
2,3-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2,4-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2,5-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2,6-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
3,4-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
3,5-Dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2,4,5-Trichlorophénol	< 10	< 10	< 10	< 10
2,4,6-Trichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
Pentachlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
Pesticides organochlorés (µg/kg m.s.)				
Hexachlorobutadiène	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Hexachlorobenzène	0.39	3.11	1.29	0.32
Aldrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
Dieldrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
Endrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
OP DDD	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PP DDD	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
OP DDE	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PP DDE	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
OP DDT	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PP DDT	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
1,2-Dichlorobenzène	27.3	19.5	21.8	26.8
1,3-Dichlorobenzène	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
1,4-Dichlorobenzène	13.5	4.0	19.3	17.8
1,2,3-Trichlorobenzène	5.87	2.28	< 0.20	4.47
1,2,4-Trichlorobenzène	6.10	5.88	6.56	5.76
1,3,5-Trichlorobenzène	5.71	< 0.20	< 0.20	< 0.20
Polychlorobiphényles (µg/kg m.s.)				
PCB 28	< 0.15	< 0.15	< 0.15	< 0.15
PCB 52	< 0.25	< 0.25	18.4	24.9
PCB 101	< 0.15	< 0.15	25.0	34.9
PCB 118	< 0.15	< 0.15	16.1	120
PCB 138	< 0.10	< 0.10	107	40.1
PCB 153	< 0.10	< 0.10	76.7	17.5
PCB 180	< 0.05	< 0.05	33.0	5.36
Métaux (mg/kg m.s.)				
Arsenic	12.8	9.3	16.6	25.8
Chrome total	30.5	21.0	186	48.9
Cuivre	10.0	8.3	68.5	7.9
Cadmium	< 0.1	0.13	159	16.2
Plomb	10.1	7.7	38.8	8.4
Mercure	0.08	0.24	0.06	0.65
Nickel	22.3	11.1	37.2	13.3
Zinc	47.9	55.4	1480	205
Etain	< 4	< 4	< 4	< 4
Fer	19100	25100	44700	44600

Annexe VI : Analyses physico-chimiques réalisées sur la fraction fine (< 1mm) des sédiments prélevés sur le site de la Sarthe (octobre 97)

Sites	Amont	Aval 1	Aval 2
Paramètres physico-chimiques			
Matières sèches (%)	37.3	20.3	42.3
Carbone organique total (C) (g/kg m.s.)	53.1	62.8	48.7
Hydrocarbures polycycliques aromatiques (µg/kg m.s.)			
Fluoranthène	23.8	46.0	9.19
Benzo(b)fluoranthène	42.2	53.1	5.80
Benzo(k)fluoranthène	19.2	26.3	3.80
Benzo(a)pyrène	24.8	33.8	9.30
Benzo(ghi)pérylène	25.3	68.6	20.0
Indénopyrène	18.9	27.2	8.30
Pesticides organochlorés (µg/kg m.s.)			
Hexachlorobutadiène	< 0.05	1.35	1.76
Hexachlorobenzène	< 0.05	0.93	< 0.05
Aldrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25
Dieldrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25
Endrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25
OP DDD	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PP DDD	0.47	3.86	< 0.25
OP DDE	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PP DDE	0.55	5.29	0.95
OP DDT	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PP DDT	< 0.25	< 0.25	< 0.25
1,2-Dichlorobenzène	< 0.5	7.1	7.1
1,3-Dichlorobenzène	< 0.5	1.4	1.6
1,4-Dichlorobenzène	27.5	3.8	11.5
1,2,3-Trichlorobenzène	< 0.20	< 0.20	< 0.20
1,2,4-Trichlorobenzène	< 0.20	39.1	47.7
1,3,5-Trichlorobenzène	< 0.20	< 0.20	< 0.20
Polychlorobiphényles (µg/kg m.s.)			
PCB 28	< 0.20	< 0.20	< 0.20
PCB 52	< 0.20	< 0.20	< 0.20
PCB 101	33.7	< 0.15	2.71
PCB 118	< 0.20	< 0.20	< 0.20
PCB 138	20.6	12.2	5.04
PCB 153	37.4	12.8	7.63
PCB 180	< 0.50	< 0.50	< 0.50
Métaux (mg/kg m.s.)			
Arsenic	9.6	17.7	16.2
Chrome total	14.2	214	41.7
Cuivre	5.3	57.5	7.9
Cadmium	< 2.7	106	19.9
Plomb	6.5	38.1	9.1
Mercure	0.22	0.81	0.10
Nickel	8.5	40.1	14.7
Zinc	55.6	1670	242
Etain	< 3.5	< 3.7	< 3.8
Fer	54300	177000	85100

Annexe VII

	Site de référence	Amont	Aval 1	Aval 2
Test TBA	10.1 ± 0.6	20.6 ± 0.6	15.0 ± 0.0	18.3 ± 0.1
	16.9 ± 0.3	29.3 ± 1.8	16.6 ± 2.6	38.0 ± 1.8
	38.5 ± 0.0	20.1 ± 0.3	18.5 ± 0.5	28.7 ± 0.8
CLHP	1.1 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.1
	4.0 ± 0.0	5.5 ± 0.1	1.8 ± 0.0	7.9 ± 0.0
	2.3 ± 0.3	1.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	2.8 ± 0.1
Moyenne	TBA 21.8 ± 12.1	23.3 ± 4.2	16.7 ± 1.4	28.3 ± 8.0
	CLHP 2.5 ± 1.2	3.5 ± 1.6	2.8 ± 0.8	4.6 ± 2.4

Tableau 1 : Taux de MDA mesurés par le test TBA et la technique CLHP dans les glandes digestives des bivalves transférés pendant 1 semaine dans le site de la Fensch (préliminaire). Les concentrations sont exprimées en ng MDA / mg de protéines. Pour chaque individu, les dosages ont été effectués en duplicat.

	Site de référence	Amont	Aval 1	Aval 2
Test TBA	32.9 ± 1.7	19.9 ± 0.0	22.0 ± 1.2	33.6 ± 1.5
	11.2 ± 0.9	25.8 ± 0.7	18.0 ± 0.0	32.3 ± 0.7
	29.7 ± 0.1	30.3 ± 0.0	31.6 ± 2.4	25.7 ± 1.5
CLHP	2.0 ± 0.2	2.3 ± 0.1	1.5 ± 0.0	3.5 ± 0.3
	1.4 ± 0.1	3.4 ± 0.1	1.8 ± 0.2	5.9 ± 0.4
	2.1	6.3 ± 0.1	4.1	3.7 ± 0.1
Moyenne	TBA 24.6 ± 9.6	25.3 ± 4.3	23.9 ± 5.7	30.5 ± 3.4
	CLHP 1.8 ± 0.3	4.0 ± 1.7	2.5 ± 1.2	4.4 ± 1.1

Tableau 2 : Taux de MDA mesurés par le test TBA et la technique CLHP dans les branchies des bivalves transférés pendant 1 semaine dans le site de la Fensch (préliminaire). Les concentrations sont exprimées en ng MDA / mg de protéines. Pour chaque individu, les dosages ont été effectués en duplicat.

Annexe VIII

	Site de référence			Amont		Aval 1		Aval 2
	T0	T15	T30	T15	T30	T15	T30	T15
Test TBA	15.5 ± 1.3	19.1 ± 0.5	16.8 ± 0.5	23.1 ± 0.6	19.3 ± 2.6	21.8 ± 3.5	13.9 ± 0.2	14.1 ± 2.2
	13.7 ± 0.5	15.8 ± 0.6	22.3 ± 1.9	18.2 ± 1.3	16.2 ± 0.9	14.2 ± 0.5	10.9 ± 0.7	16.6 ± 0.5
	18.2 ± 1.7	15.3 ± 2.5	23.8 ± 4.1	18.1 ± 0.0	24.6 ± 1.6	11.2 ± 0.5	13.1 ± 0.0	16.0 ± 0.8
	17.0 ± 1.5	12.6 ± 0.9	20.4 ± 1.0	22.1 ± 0.7	23.2 ± 1.6	12.0 ± 1.0	15.9 ± 0.1	12.3 ± 2.6
	18.1 ± 2.5	15.3 ± 0.2	18.5 ± 2.1	10.3 ± 0.1	29.8 ± 0.4	18.5 ± 0.9	14.4 ± 0.5	15.6 ± 0.9
CLHP	2.5 ± 0.4	-	2.5 ± 0.2	5.9 ± 0.4	3.4 ± 0.2	5.6 ± 0.3	3.4 ± 0.1	3.4 ± 0.2
	5.1 ± 0.4	6.3 ± 0.1	5.9 ± 0.1	3.3 ± 0.0	5.6 ± 0.2	3.2 ± 0.1	2.1 ± 0.2	5.3 ± 0.2
	3.6 ± 0.2	1.6 ± 0.2	5.9 ± 0.0	4.1 ± 0.3	4.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	2.8 ± 0.5	5.4 ± 0.2
	3.9 ± 0.3	2.9 ± 0.1	3.2 ± 0.1	1.7 ± 0.1	4.2 ± 0.1	1.5 ± 0.0	1.4 ± 0.1	4.1 ± 0.0
	1.7 ± 0.0	2.0 ± 0.1	3.3 ± 0.4	1.4 ± 0.3	3.6 ± 0.1	1.4 ± 0.0	1.6 ± 0.0	1.5 ± 0.2
Moyenne TBA	16.5 ± 1.7	15.6 ± 2.1	20.4 ± 2.5	18.4 ± 4.5	22.6 ± 4.6	15.5 ± 4.0	13.6 ± 1.6	14.9 ± 1.5
CLHP	3.4 ± 1.2	3.2 ± 1.8	4.2 ± 1.4	3.3 ± 1.7	4.2 ± 0.8	2.6 ± 1.7	2.3 ± 0.7	3.9 ± 1.4

Tableau 1 : Taux de MDA mesurés par le test TBA et la technique CLHP dans les glandes digestives des bivalves transférés pendant 15 et 30 jours sur le site de la Fensch. Les concentrations sont exprimées en ng MDA / mg de protéines. Pour chaque individu, les dosages ont été effectués en duplicat. - : non mesuré.

Annexe IX

	Site de référence			Amont		Aval 1		Aval 2
	T0	T15	T30	T15	T30	T15		T15
Test TBA	15.5 ± 0.9	20.6 ± 2.8	20.8 ± 2.5	54.5 ± 2.6	57.9 ± 3.4	50.0 ± 0.7	34.7 ± 2.7	53.3 ± 0.7
	19.2 ± 0.6	30.1 ± 2.5	41.8 ± 4.5	33.1 ± 2.9	32.2 ± 0.2	65.8 ± 0.3	22.8 ± 2.6	54.9 ± 1.3
	13.9 ± 0.4	16.6 ± 4.5	22.3 ± 3.5	14.5 ± 2.0	53.1 ± 3.1	15.6 ± 1.4	37.9 ± 1.8	80.7 ± 16.9
	48.5 ± 1.5	26.4 ± 0.7	30.4 ± 0.6	22.7 ± 0.0	14.4 ± 0.2	21.1 ± 0.0	34.4 ± 0.4	37.9 ± 3.1
	23.4 ± 1.2	22.7 ± 0.8	32.3 ± 1.5	39.7 ± 1.2	53.1 ± 1.7	27.5 ± 1.1	36.2 ± 2.5	34.1 ± 1.0
CLHP	1.7 ± 0.2	n.d.	1.5 ± 0.1	3.7 ± 0.2	2.0 ± 0.0	4.4 ± 0.1	0.8 ± 0.1	8.1 ± 0.7
	1.3 ± 0.2	0.8 ± 0.0	1.3 ± 0.0	0.7 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.6 ± 0.3	8.6 ± 0.5
	n.d.	1.0 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.1 ± 0.2	2.7 ± 0.1	1.1 ± 0.1	2.1 ± 0.2	9.1 ± 0.3
	5.0 ± 0.1	2.9 ± 0.0	3.1 ± 0.1	2.3 ± 0.3	1.8 ± 0.1	2.9 ± 0.0	3.4 ± 0.3	4.7 ± 0.2
	3.0 ± 0.0	1.7 ± 0.1	2.2 ± 0.2	3.1 ± 0.2	5.0 ± 0.1	4.2 ± 0.1	2.7 ± 0.0	3.9 ± 0.1
Moyenne TBA	24.1 ± 12.6	23.3 ± 4.6	29.5 ± 7.6	32.9 ± 13.8	42.1 ± 16.5	36.0 ± 18.9	33.2 ± 5.3	52.2 ± 16.4
CLHP	2.7 ± 1.5	1.6 ± 0.8	1.9 ± 0.7	2.2 ± 1.2	2.6 ± 1.2	2.9 ± 1.3	2.1 ± 0.9	6.9 ± 2.2

Tableau 1 : Taux de MDA mesurés par le test TBA et la technique CLHP dans les branchies des bivalves transférés pendant 15 et 30 jours sur le site de la Fensch. Les concentrations sont exprimées en ng MDA / mg de protéines. Pour chaque individu, les dosages ont été effectués en duplicat. n.d. : non détecté.

Annexe X

	Site de référence	Amont	Aval 1	Aval 2
Test TBA	29.5 ± 0.2	16.8 ± 0.4	24.0 ± 0.7	21.3 ± 2.3
	31.2 ± 0.4	25.2 ± 1.2	30.3 ± 1.4	20.7 ± 0.2
	23.0 ± 2.5	19.1 ± 1.0	25.2 ± 0.4	16.1 ± 1.2
	20.7 ± 1.9	15.7 ± 0.3	20.9 ± 0.9	17.6 ± 1.2
	36.0 ± 0.8	22.3 ± 0.6	22.2 ± 0.7	13.1 ± 0.3
CLHP	6.5 ± 0.2	3.9 ± 0.1	8.2 ± 0.2	4.1 ± 0.3
	9.4 ± 0.2	4.8 ± 0.0	7.0 ± 0.1	5.4 ± 0.0
	6.3 ± 0.5	5.0 ± 0.0	7.1 ± 0.1	3.8 ± 0.0
	2.9 ± 0.1	5.0 ± 0.1	2.9 ± 0.2	3.1 ± 0.1
	15.2 ± 0.1	5.9 ± 0.3	6.6 ± 0.2	3.9 ± 0.1
Moyenne TBA	27.9 ± 5.5	19.2 ± 3.7 *	24.5 ± 3.4	17.5 ± 3.2
CLHP	8.1 ± 4.1	4.9 ± 0.6	6.4 ± 1.8	4.1 ± 0.8

Tableau 1 : Taux de MDA mesurés par le test TBA et la technique CLHP dans les glandes digestives des bivalves transférés pendant 15 jours sur le site des Vosges. Les concentrations sont exprimées en ng MDA / mg de protéines. Pour chaque individu, les dosages ont été effectués en duplicat. Le symbole * correspond à une différence statistiquement significative par rapport au site de référence.

	Site de référence	Amont	Aval 1	Aval 2
Test TBA	23.2 ± 0.3	17.6 ± 1.0	26.2 ± 0.3	12.6 ± 1.8
	18.6 ± 0.0	16.4 ± 0.5	21.3 ± 0.2	18.1 ± 1.8
	23.3 ± 5.2	13.2 ± 1.7	13.3 ± 0.5	28.8 ± 0.0
	24.5 ± 5.2	17.9 ± 0.7	29.3 ± 2.3	26.5 ± 1.5
	16.3 ± 1.8	14.5 ± 0.5	29.1 ± 0.9	20.1 ± 1.4
CLHP	3.8 ± 0.2	2.0 ± 0.2	5.4 ± 0.3	1.6 ± 0.1
	2.2 ± 0.3	1.5 ± 0.1	3.5 ± 0.0	2.4 ± 0.1
	3.1 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.7 ± 0.1	3.9 ± 0.1
	2.3 ± 0.1	1.7 ± 0.0	3.1 ± 0.1	4.6 ± 0.4
	2.2 ± 0.2	1.7 ± 0.2	3.4 ± 0.6	2.3 ± 0.2
Moyenne TBA	21.2 ± 4.6	15.9 ± 2.1*	23.9 ± 6.1 [◇]	20.7 ± 5.9
CLHP	2.7 ± 0.7	1.6 ± 0.3 *	3.4 ± 1.2 [◇]	2.9 ± 1.1

Tableau 2 : Taux de MDA mesurés par le test TBA et la technique CLHP dans les branchies des bivalves transférés pendant 15 jours sur le site des Vosges. Les concentrations sont exprimées en ng MDA / mg de protéines. Pour chaque individu, les dosages ont été effectués en duplicat. Les symboles * et [◇] correspondent à une différence statistiquement significative respectivement par rapport au site de référence et au point amont.

Annexe XI

	Site de référence	Amont	Aval 1	Aval 2
Test TBA	18.2 ± 0.8	17.6 ± 3.2	24.8 ± 0.9	22.9 ± 2.1
	43.4 ± 1.2	24.6 ± 0.9	38.6 ± 6.4	26.7 ± 0.7
	26.2 ± 0.9	22.2 ± 4.6	23.3 ± 2.2	42.6 ± 4.3
	20.0 ± 1.4	16.1 ± 1.8	23.8 ± 0.6	16.7 ± 1.4
	20.1 ± 1.5	10.6 ± 1.2	12.6 ± 1.4	21.2 ± 1.2
CLHP	2.9 ± 0.4	10.4 ± 0.1	36.6 ± 1.9	56.0 ± 0.2
	6.4 ± 0.3	11.3 ± 0.2	36.4 ± 0.3	76.0 ± 2.4
	1.7 ± 0.2	5.5 ± 0.8	31.3 ± 0.1	132.6 ± 3.9
	1.5 ± 0.0	7.4 ± 0.1	36.2 ± 0.3	86.1 ± 2.0
	2.3 ± 0.2	3.8 ± 0.3	6.9 ± 0.1	73.1 ± 0.4
Moyenne TBA	24.5 ± 8.9	18.3 ± 5.7	24.6 ± 8.9	25.0 ± 8.8
CLHP	3.0 ± 1.8	7.7 ± 2.9 *	29.5 ± 11.5 *	84.8 ± 25.9 *

Tableau 1 : Taux de MDA mesurés par le test TBA et la technique CLHP dans les glandes digestives des bivalves transférés pendant 15 jours sur le site du Lot et Garonne (1^{ère} étude). Les concentrations sont exprimées en ng MDA / mg de protéines. Pour chaque individu, les dosages ont été effectués en duplicat. Le symbole * correspond à une différence statistiquement significative par rapport au site de référence.

	Site de référence	Amont	Aval 1	Aval 2
Test TBA	32.4 ± 10.1	24.3 ± 0.7	16.1 ± 0.8	15.5 ± 1.4
	20.1 ± 1.8	25.6 ± 3.0	26.4 ± 1.2	26.1 ± 1.0
	30.9 ± 4.1	24.3 ± 0.8	23.1 ± 2.1	12.5 ± 1.9
	32.3 ± 1.2	20.0 ± 0.8	17.1 ± 0.2	20.2 ± 2.3
	35.1 ± 2.3	18.8 ± 0.8	15.8 ± 0.8	21.7 ± 0.3
CLHP	4.3 ± 0.5	2.9 ± 0.1	2.4 ± 0.0	2.4 ± 0.2
	2.5 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.3 ± 0.3	3.7 ± 0.2
	3.4 ± 0.1	2.1 ± 0.1	3.3 ± 0.0	1.1 ± 0.1
	4.0 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.5 ± 0.3
	2.4 ± 0.0	3.1 ± 0.1	1.7 ± 0.0	2.7 ± 0.0
Moyenne TBA	30.1 ± 7.2	22.5 ± 3.1	19.7 ± 4.4	19.0 ± 5.1
CLHP	3.3 ± 0.8	2.6 ± 0.4	2.4 ± 0.5	2.5 ± 0.8

Tableau 2 : Taux de MDA mesurés par le test TBA et la technique CLHP dans les branchies des bivalves transférés pendant 15 jours sur le site du Lot et Garonne (1^{ère} étude). Les concentrations sont exprimées en ng MDA / mg de protéines. Pour chaque individu, les dosages ont été effectués en duplicat. Le symbole * correspond à une différence statistiquement significative par rapport au site de référence.

Annexe XII

	Site de référence	Amont	Aval 1	Aval 2	
Test TBA	51.5 ± 4.7	20.9 ± 0.4	30.7 ± 2.1	31.9 ± 2.3	
	26.2 ± 0.3	16.3 ± 0.3	11.4 ± 0.2	14.8 ± 0.1	
	18.6 ± 0.3	17.7 ± 1.3	9.1 ± 0.2	12.3 ± 0.8	
	17.7 ± 0.5	10.9 ± 0.1	9.2 ± 0.0	8.6 ± 0.5	
	15.3 ± 0.2	16.0 ± 0.3	11.4 ± 0.2	13.0 ± 0.3	
		10.5 ± 0.2	9.8 ± 1.5	7.8 ± 0.2	
		13.5 ± 0.1	9.1 ± 0.1	10.1 ± 1.0	
CLHP	-	3.3 ± 0.1	6.6 ± 0.4	5.7 ± 0.1	
	2.3 ± 0.1	3.6 ± 0.3	2.4	3.3 ± 0.2	
	3.1 ± 0.0	2.3 ± 0.0	2.6 ± 0.4	2.4 ± 0.3	
	3.2 ± 0.0	2.5 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.9 ± 0.1	
	2.5 ± 0.2	2.9 ± 0.0	1.5 ± 0.0	2.3 ± 0.5	
		1.5 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.5 ± 0.0	
		1.8 ± 0.0	1.7 ± 0.1	1.1 ± 0.0	
Moyenne	TBA	25.9 ± 13.5	15.1 ± 3.5	12.9 ± 7.3	14.1 ± 7.6
	CLHP	2.8 ± 0.4	2.6 ± 0.7	2.5 ± 1.8	2.6 ± 1.4

Tableau 1 : Taux de MDA mesurés par le test TBA et la technique CLHP dans les glandes digestives des bivalves transférés pendant 15 jours sur le site du Lot et Garonne (2^{ème} étude, 2^{ème} mise en cage). Les concentrations sont exprimées en ng MDA / mg de protéines. Pour chaque individu, les dosages ont été effectués en duplicat. - : non mesuré.

	Site de référence	Amont	Aval 1	Aval 2	
Test TBA	23.8 ± 0.7	34.0 ± 3.2	25.1 ± 2.4	21.1 ± 1.4	
	25.4 ± 0.3	19.3 ± 0.9	24.7 ± 0.4	15.8 ± 0.3	
	17.4 ± 0.3	27.0 ± 0.8	32.9 ± 5.6	24.3 ± 2.5	
	12.8 ± 0.3	23.5 ± 0.9	18.9 ± 1.0	20.9 ± 0.8	
	24.7 ± 0.9	16.5 ± 1.1	15.7 ± 2.6	17.6 ± 0.0	
		26.0 ± 1.4	20.8 ± 1.6	10.8 ± 0.4	
		19.6 ± 4.6	21.6 ± 0.2	15.9 ± 0.2	
CLHP	2.9 ± 0.7	4.3 ± 0.2	3.8 ± 0.2	2.6 ± 0.2	
	3.5 ± 0.4	4.0 ± 0.3	3.8 ± 0.1	2.4 ± 0.2	
	2.5 ± 0.1	3.4 ± 0.0	3.7 ± 0.2	3.8 ± 0.5	
	2.1 ± 0.0	4.3 ± 0.2	3.3 ± 0.0	6.1 ± 0.6	
	3.7 ± 0.3	3.8 ± 0.0	3.4 ± 0.2	3.1 ± 0.0	
		2.6 ± 0.2	3.4 ± 0.0	2.4 ± 0.2	
		3.0 ± 0.2	2.4 ± 0.1	2.1 ± 0.1	
Moyenne	TBA	20.8 ± 4.9	23.7 ± 5.5	22.8 ± 5.1	18.1 ± 4.1
	CLHP	2.9 ± 0.6	3.6 ± 0.6	3.4 ± 0.5	3.2 ± 1.3

Tableau 2 : Taux de MDA mesurés par le test TBA et la technique CLHP dans les branchies des bivalves transférés pendant 15 jours sur le site du Lot et Garonne (2^{ème} étude, 2^{ème} mise en cage). Les concentrations sont exprimées en ng MDA / mg de protéines. Pour chaque individu, les dosages ont été effectués en duplicat.

Annexe XIII

	Site de référence	Amont	Aval 1	Aval 2	
Glandes digestives	2.7 ± 0.2	2.8 ± 0.1	4.0 ± 0.1	2.1 ± 0.4	
	2.0 ± 0.0	3.6 ± 0.3	4.6 ± 0.2	2.2 ± 0.2	
	1.8 ± 0.0	5.6 ± 0.7	4.1 ± 0.0	2.4 ± 0.5	
	2.0 ± 0.0	3.3 ± 0.6	2.4 ± 0.4	2.6 ± 0.3	
	3.5 ± 0.2	6.8 ± 0.3	6.0 ± 0.9	3.3 ± 0.3	
			8.4 ± 0.2	3.6	1.7 ± 0.3
		2.9 ± 0.1	4.0 ± 0.4	1.4 ± 0.1	
Branchies	20.4 ± 1.9	30.3 ± 0.5	23.1 ± 0.3	21.1 ± 1.0	
	24.4 ± 0.6	25.6 ± 1.4	23.4 ± 1.1	25.6 ± 1.1	
	21.7 ± 2.4	23.5 ± 0.4	25.7 ± 0.9	27.7 ± 0.5	
	25.5 ± 0.0	21.7 ± 0.6	20.0 ± 1.3	13.7 ± 0.2	
	26.2 ± 0.3	23.8 ± 0.4	27.3 ± 1.3	23.9 ± 0.1	
		22.8 ± 1.2	23.0 ± 1.5	19.8 ± 0.3	
	25.4 ± 0.3	28.0 ± 0.6	17.3 ± 1.5		
Moyenne	GD	2.4 ± 0.6	4.8 ± 2.0	4.1 ± 1.0	2.2 ± 0.8
	Br	23.6 ± 2.2	24.7 ± 2.6	24.4 ± 2.6	21.3 ± 4.5

Tableau 1 : Taux de 8OHdG mesurés dans les glandes digestives et les branchies des bivalves transférés pendant 15 jours sur le site du Lot et Garonne (2^{ème} étude, 2^{ème} mise en cage). Les concentrations sont exprimées en 8OHdG/10⁵ dG. Pour chaque individu, les dosages ont été effectués en duplicat.

	Site de référence	Amont	Aval 1	Aval 2	
Glandes digestives	2.5 ± 0.3	3.1 ± 0.1	2.9 ± 0.3	2.6 ± 0.1	
	2.8 ± 0.3	5.0 ± 0.2	3.0 ± 0.1	1.8 ± 0.1	
	2.3 ± 0.2	1.6 ± 0.0	3.3 ± 0.0	2.2 ± 0.4	
	2.2 ± 0.5	2.9 ± 0.1	3.4 ± 0.3	1.5 ± 0.0	
	2.4 ± 0.4	2.7 ± 0.1	2.6 ± 0.3	2.4 ± 0.2	
Branchies	21.2 ± 0.5	17.5 ± 0.8	14.4 ± 1.2	21.7 ± 0.2	
	10.2 ± 0.1	22.6 ± 0.4	16.6 ± 2.3	10.0	
	21.7 ± 1.2	19.8 ± 1.8	14.3 ± 1.3	21.3 ± 1.1	
	21.0 ± 2.6	19.8 ± 0.4	22.2 ± 3.6	16.4 ± 0.4	
	24.3 ± 1.5	21.4 ± 2.5	13.5 ± 1.1	13.6 ± 0.9	
Moyenne	GD	2.4 ± 0.2	3.0 ± 1.1	3.1 ± 0.3	2.1 ± 0.4
	Br	19.7 ± 4.9	20.2 ± 1.7	16.2 ± 3.2	16.6 ± 4.5

Tableau 2 : Taux de 8OHdG mesurés dans les glandes digestives et les branchies des bivalves transférés pendant 15 jours sur le site du Lot et Garonne (2^{ème} étude, 1^{ère} mise en cage). Les concentrations sont exprimées en 8OHdG/10⁵ dG. Pour chaque individu, les dosages ont été effectués en duplicat.

Annexe XIV

	Site de référence	Amont	Aval 1	Aval 2
Test TBA	15.0 ± 1.1	6.1 ± 0.4	12.2 ± 0.1	9.7 ± 0.2
	10.2 ± 0.6	12.0 ± 1.0	10.6 ± 0.5	11.4 ± 0.3
	16.8 ± 1.9	8.2 ± 0.8	11.3 ± 0.8	6.6 ± 0.0
	13.4 ± 0.1	7.3 ± 0.3	11.4 ± 0.2	10.4 ± 1.0
	12.4 ± 1.2	8.0 ± 0.2	8.8 ± 0.4	7.5 ± 0.0
CLHP	6.2 ± 0.1	2.5 ± 0.2	3.5 ± 0.0	2.5 ± 0.1
	1.4 ± 0.1	3.2 ± 0.1	1.8 ± 0.0	2.8 ± 0.3
	3.2 ± 0.1	1.8 ± 0.1	3.7 ± 0.4	2.3 ± 0.4
	4.1 ± 0.4	1.9 ± 0.0	3.8 ± 0.2	4.8 ± 0.3
	2.7 ± 0.2	3.2 ± 0.5	4.6 ± 0.3	3.1 ± 0.3
Moyenne TBA	13.6 ± 2.2	8.3 ± 2.0	10.9 ± 1.1	9.1 ± 1.8
CLHP	3.5 ± 1.6	2.5 ± 0.6	3.5 ± 0.9	3.1 ± 0.9

Tableau 1 : Taux de MDA mesurés par le test TBA et la technique CLHP dans les glandes digestives des bivalves transférés pendant 15 jours sur le site du Lot et Garonne (2^{ème} étude, 1^{ère} mise en cage). Les concentrations sont exprimées en ng MDA / mg de protéines. Pour chaque individu, les dosages ont été effectués en duplicat.

	Site de référence	Amont	Aval 1	Aval 2
Test TBA	9.5 ± 1.1	10.5 ± 0.2	23.6 ± 1.4	20.4 ± 1.9
	7.6 ± 0.1	30.8 ± 4.3	14.8 ± 0.7	10.8 ± 0.2
	12.0 ± 0.2	14.2 ± 0.9	20.4 ± 3.8	26.3 ± 1.4
	18.7 ± 1.5	21.1 ± 0.2	27.1 ± 0.8	13.8 ± 0.3
	18.5 ± 0.7	27.3 ± 0.3	12.7 ± 0.4	17.6 ± 2.2
CLHP	1.8 ± 0.1	2.0 ± 0.1	3.1 ± 0.2	2.5 ± 0.1
	1.7 ± 0.1	4.8 ± 0.2	2.7 ± 0.1	2.9 ± 0.1
	2.0 ± 0.0	2.2 ± 0.0	3.0 ± 0.3	4.8 ± 0.1
	1.5 ± 0.1	2.4 ± 0.3	2.3 ± 0.2	2.7 ± 0.2
	2.5 ± 0.0	2.0 ± 0.1	3.4 ± 0.2	2.8 ± 0.0
Moyenne TBA	13.3 ± 4.6	20.8 ± 7.6	19.7 ± 5.4	17.8 ± 5.4
CLHP	1.9 ± 0.4	2.7 ± 1.1	2.7 ± 0.5	3.1 ± 0.8

Tableau 2 : Taux de MDA mesurés par le test TBA et la technique CLHP dans les branchies des bivalves transférés pendant 15 jours sur le site du Lot et Garonne (2^{ème} étude, 1^{ère} mise en cage). Les concentrations sont exprimées en ng MDA / mg de protéines. Pour chaque individu, les dosages ont été effectués en duplicat.

Annexe XV

	Site de référence	Amont	Aval 1	Aval 2
Test TBA	18.7 ± 0.6	19.2 ± 1.6	9.7 ± 0.5	9.6 ± 0.1
	15.1 ± 0.0	14.4 ± 0.2	19.3 ± 0.0	20.8 ± 0.7
	20.2 ± 1.1	11.5 ± 0.2	13.5 ± 0.6	11.1 ± 0.4
	8.1 ± 0.3	13.8 ± 0.3	16.1 ± 1.3	12.9 ± 0.4
	13.1 ± 0.7	17.8 ± 1.2	10.3 ± 0.5	14.0 ± 0.7
CLHP	7.6 ± 0.0	8.9 ± 0.5	4.8 ± 0.4	3.9 ± 0.2
	5.9 ± 0.1	7.0 ± 0.1	9.7 ± 0.3	10.4 ± 0.2
	8.2 ± 0.5	4.9 ± 0.0	6.0 ± 0.4	4.9 ± 0.1
	4.3 ± 0.3	6.8 ± 0.1	7.7 ± 0.2	5.4 ± 0.2
	4.8 ± 0.0	6.5 ± 0.4	3.2 ± 0.2	4.6 ± 0.3
Moyenne	TBA 15.0 ± 4.3	15.5 ± 3.1	13.6 ± 3.6	13.4 ± 3.6
	CLHP 6.2 ± 1.5	6.8 ± 1.3	6.3 ± 2.3	5.8 ± 2.3

Tableau 1 : Taux de MDA mesurés par le test TBA et la technique CLHP dans les glandes digestives des bivalves transférés pendant 15 jours sur le site de la Sarthe. Les concentrations sont exprimées en ng MDA / mg de protéines. Pour chaque individu, les dosages ont été effectués en duplicat.

	Site de référence	Amont	Aval 1	Aval 2
Test TBA	12.1 ± 2.4	22.0 ± 0.7	20.9 ± 1.1	24.3 ± 0.8
	23.8 ± 0.3	18.9 ± 0.6	36.1 ± 0.4	17.9 ± 2.5
	11.0 ± 0.2	15.4 ± 2.7	17.3 ± 1.6	10.8 ± 1.2
	8.5 ± 0.7	10.9 ± 0.6	14.3 ± 0.6	17.2 ± 0.5
	16.4 ± 0.8	21.7 ± 0.4	25.3 ± 4.4	23.3 ± 2.0
CLHP	2.1 ± 0.1	3.9 ± 0.3	4.3 ± 0.6	4.0 ± 0.0
	3.4 ± 0.2	3.3 ± 0.2	7.9 ± 0.4	3.0 ± 0.3
	2.5 ± 0.1	2.0 ± 0.0	2.6 ± 0.1	1.9 ± 0.1
	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.3	2.7 ± 0.0	2.6 ± 0.0
	2.6 ± 0.3	3.1 ± 0.0	3.8 ± 0.2	3.6 ± 0.0
Moyenne	TBA 14.3 ± 5.5	17.7 ± 4.4	22.8 ± 7.9	18.5 ± 5.5
	CLHP 2.5 ± 0.6	2.8 ± 0.8	4.3 ± 1.9	3.0 ± 0.7

Tableau 2 : Taux de MDA mesurés par le test TBA et la technique CLHP dans les digestives des branchies transférés pendant 15 jours sur le site de la Sarthe. Les concentrations sont exprimées en ng MDA / mg de protéines. Pour chaque individu, les dosages ont été effectués en duplicat.

Annexe XVI

	Contrôles	Contrôles DMSO	Cuivre	Thiram	Cuivre + Thiram
Test TBA	10.8 ± 0.8	14.0 ± 1.2	15.3 ± 0.7	17.1 ± 1.0	14.4 ± 0.1
	13.8 ± 0.5	18.9 ± 1.1	11.1 ± 0.2	19.6 ± 0.6	13.1 ± 0.4
	14.0 ± 0.8	14.4 ± 0.3	31.5 ± 0.2	12.0 ± 0.6	10.9 ± 0.6
	13.1 ± 2.5	13.5 ± 1.2	13.6 ± 0.6	8.8 ± 0.5	12.2 ± 0.2
	11.3 ± 1.7	9.7 ± 0.8	28.9 ± 0.1	22.0 ± 5.3	28.1 ± 1.0
Moyenne	12.6 ± 1.3	14.1 ± 2.9	20.0 ± 8.4	15.9 ± 4.9	15.7 ± 6.0

Tableau 1 : Taux de MDA mesurés par le test TBA dans les glandes digestives des bivalves exposés au cuivre (30 $\mu\text{g.l}^{-1}$) et/ou au thiram (100 $\mu\text{g.l}^{-1}$) pendant 3 jours. Les concentrations sont exprimées en ng MDA / mg de protéines. Pour chaque individu, les dosages ont été effectués en duplicat.

	Contrôles	Contrôles DMSO	Cuivre	Thiram	Cuivre + Thiram
Test TBA	31.6 ± 3.4	20.2 ± 1.0	89.3 ± 9.9	46.4 ± 0.5	57.3 ± 0.0
	27.6 ± 4.6	52.6 ± 1.3	54.4 ± 0.3	37.3 ± 0.2	42.1 ± 2.8
	54.2 ± 3.1	85.0 ± 1.2	27.6 ± 1.7	40.3 ± 0.3	58.1 ± 0.3
	45.7 ± 4.4	63.5 ± 1.5	47.4 ± 1.4	27.5 ± 0.1	51.1 ± 2.4
	36.3 ± 1.6	70.8 ± 8.8	48.2 ± 5.1	26.1 ± 1.4	77.9 ± 2.5
CLHP	4.9 ± 0.2	2.2 ± 0.2	5.6 ± 0.0	4.6 ± 0.0	8.3 ± 0.1
	4.7 ± 0.0	3.2 ± 0.4	4.8 ± 0.7	3.4 ± 0.4	7.7 ± 0.1
	3.6 ± 0.3	4.2 ± 0.0	6.1 ± 0.4	3.7 ± 0.1	5.3 ± 0.3
	5.2 ± 0.1	3.7 ± 0.1	5.3 ± 0.2	4.5 ± 0.3	4.5 ± 0.3
	3.5 ± 0.4	5.2 ± 0.1	5.5 ± 0.0	3.6 ± 0.2	7.6 ± 0.8
Moyenne TBA	39.1 ± 9.7	58.4 ± 21.8	53.4 ± 20.0	35.5 ± 7.7	57.3 ± 11.8
CLHP	4.4 ± 0.7	3.7 ± 1.0	5.5 ± 0.4	4.0 ± 0.5	6.7 ± 1.5

Tableau 2 : Taux de MDA mesurés par le test TBA et la technique CLHP dans les branchies des bivalves exposés au cuivre (30 $\mu\text{g.l}^{-1}$) et/ou au thiram (100 $\mu\text{g.l}^{-1}$) pendant 3 jours. Les concentrations sont exprimées en ng MDA / mg de protéines. Pour chaque individu, les dosages ont été effectués en duplicat.

Annexe XVII

	Contrôles	Cuivre + Thiram
Test TBA	16.9 ± 0.4	35.3 ± 1.4
	15.3 ± 0.7	20.7 ± 2.4
	9.7 ± 0.6	29.4 ± 1.1
	20.8 ± 0.6	20.5 ± 1.2
	15.9 ± 0.7	28.3 ± 1.0
CLHP	1.2 ± 0.1	13.8 ± 1.0
	1.3 ± 0.3	2.1 ± 0.2
	1.9 ± 0.0	4.8 ± 0.1
	1.8 ± 0.2	1.5 ± 0.1
	1.5 ± 0.1	4.1 ± 0.3
Moyenne TBA	15.7 ± 3.6	26.8 ± 5.6
CLHP	1.5 ± 0.3	5.3 ± 4.4

Tableau 1 : Taux de MDA mesurés par le test TBA et la technique CLHP dans les glandes digestives des bivalves exposés au cuivre (30 $\mu\text{g.l}^{-1}$) et au thiram (100 $\mu\text{g.l}^{-1}$) pendant 3 jours (répétition). Les concentrations sont exprimées en ng MDA / mg de protéines. Pour chaque individu, les dosages ont été effectués en duplicat.

	Contrôles	Cuivre + Thiram
Test TBA	21.1 ± 0.8	40.6 ± 2.1
	21.7 ± 1.4	31.8 ± 0.5
	32.8 ± 6.2	34.8 ± 0.7
	42.0 ± 5.4	38.9 ± 1.6
	18.3 ± 0.4	42.0 ± 3.4
CLHP	3.1 ± 0.0	19.9 ± 0.3
	2.1 ± 0.0	4.4 ± 0.2
	3.6 ± 0.2	3.9 ± 0.0
	3.2 ± 0.0	5.2 ± 0.1
	1.9 ± 0.0	6.0 ± 0.3
Moyenne TBA	27.2 ± 8.9	37.6 ± 3.8
CLHP	2.8 ± 0.7	7.9 ± 6.0

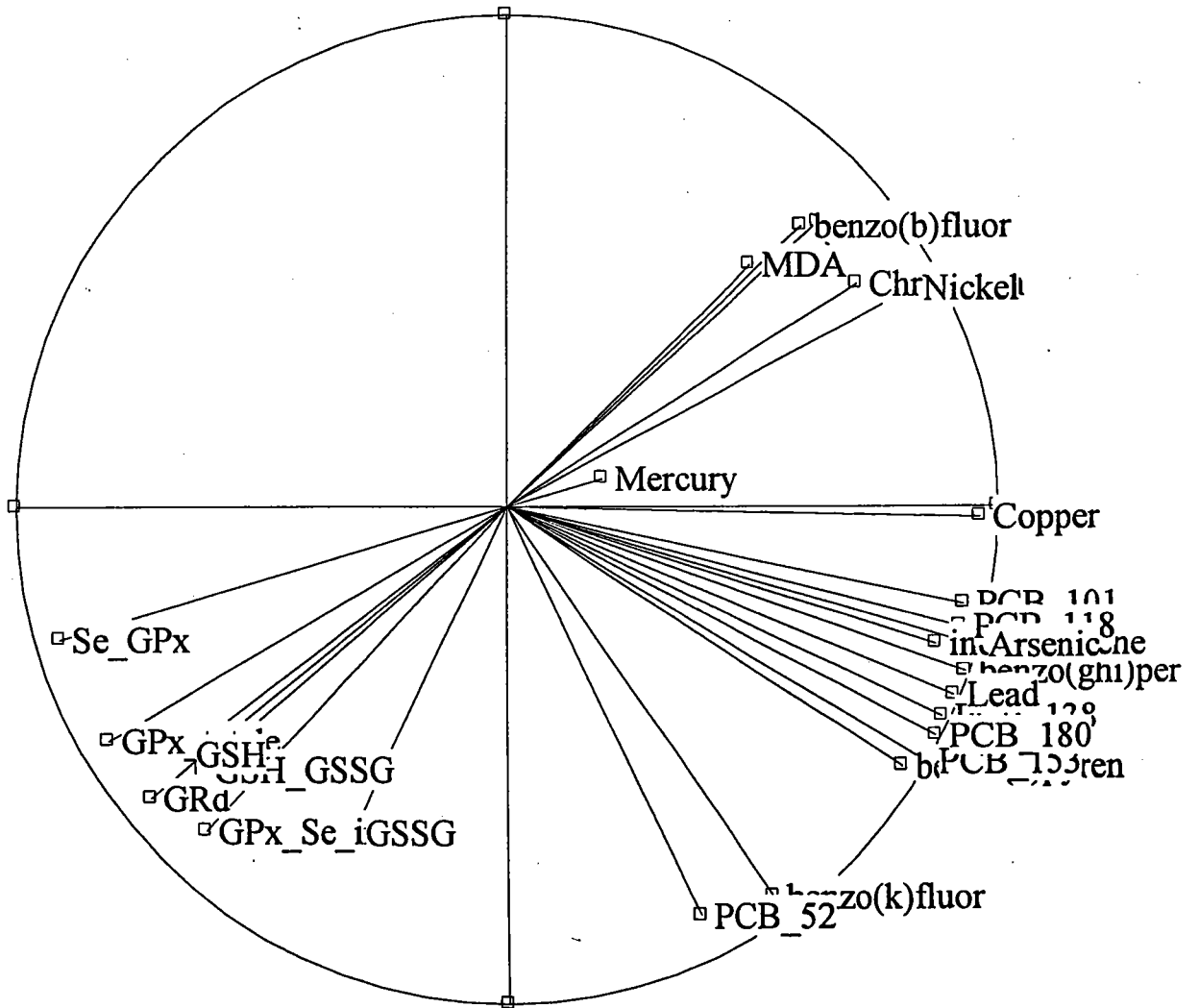
Tableau 2 : Taux de MDA mesurés par le test TBA et la technique CLHP dans les branchies des bivalves exposés au cuivre (30 $\mu\text{g.l}^{-1}$) et au thiram (100 $\mu\text{g.l}^{-1}$) pendant 3 jours (répétition). Les concentrations sont exprimées en ng MDA / mg de protéines. Pour chaque individu, les dosages ont été effectués en duplicat.

Annexe XVIII

Cercle des corrélations pour les branchies dans le site de la Fensch

Cercle des corrélations
Variables de base

Composante 2 - Inertie: 23.4%



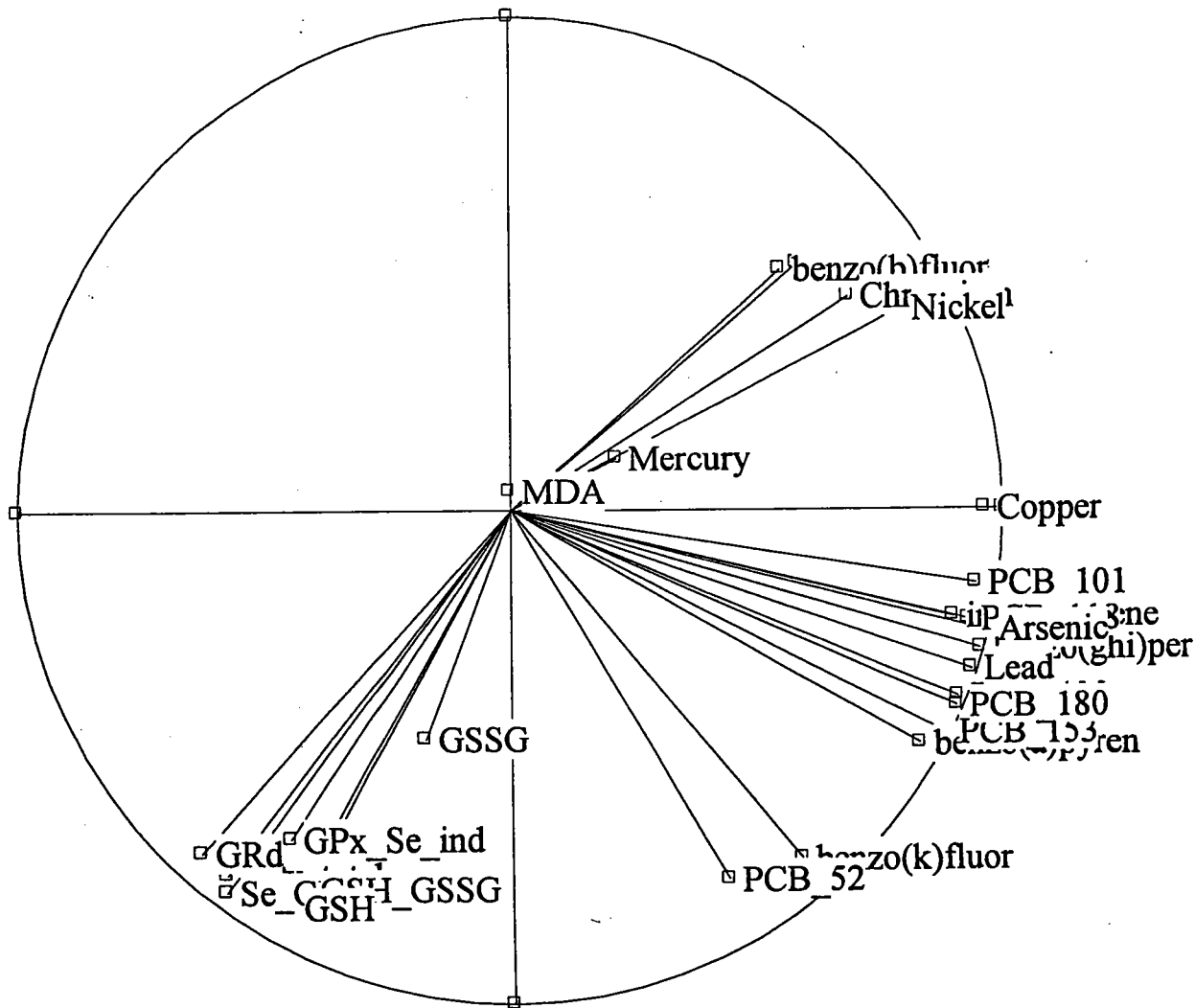
Composante 1 - Inertie: 57.7%

Annexe XIX

Cercle des corrélations pour les glandes digestives dans le site de la Fensch

Cercle des corrélations
Variables de base

Composante 2 - Inertie: 25.1%

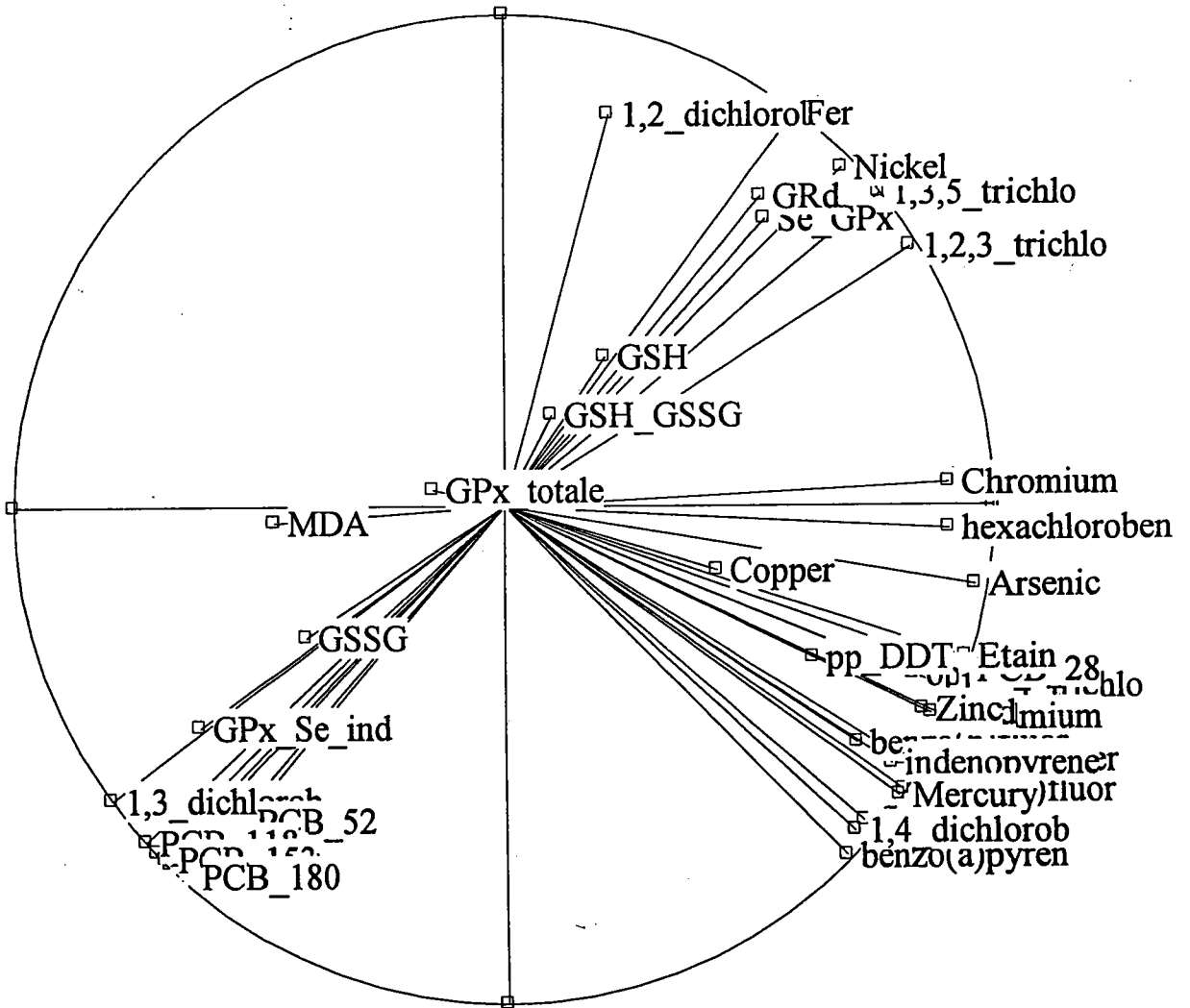


Composante 1 - Inertie: 51.3%

Cercle des corrélations pour les branchies dans le site des Vosges

Composante 2 - Inertie: 26.3%

Cercle des corrélations Variables de base

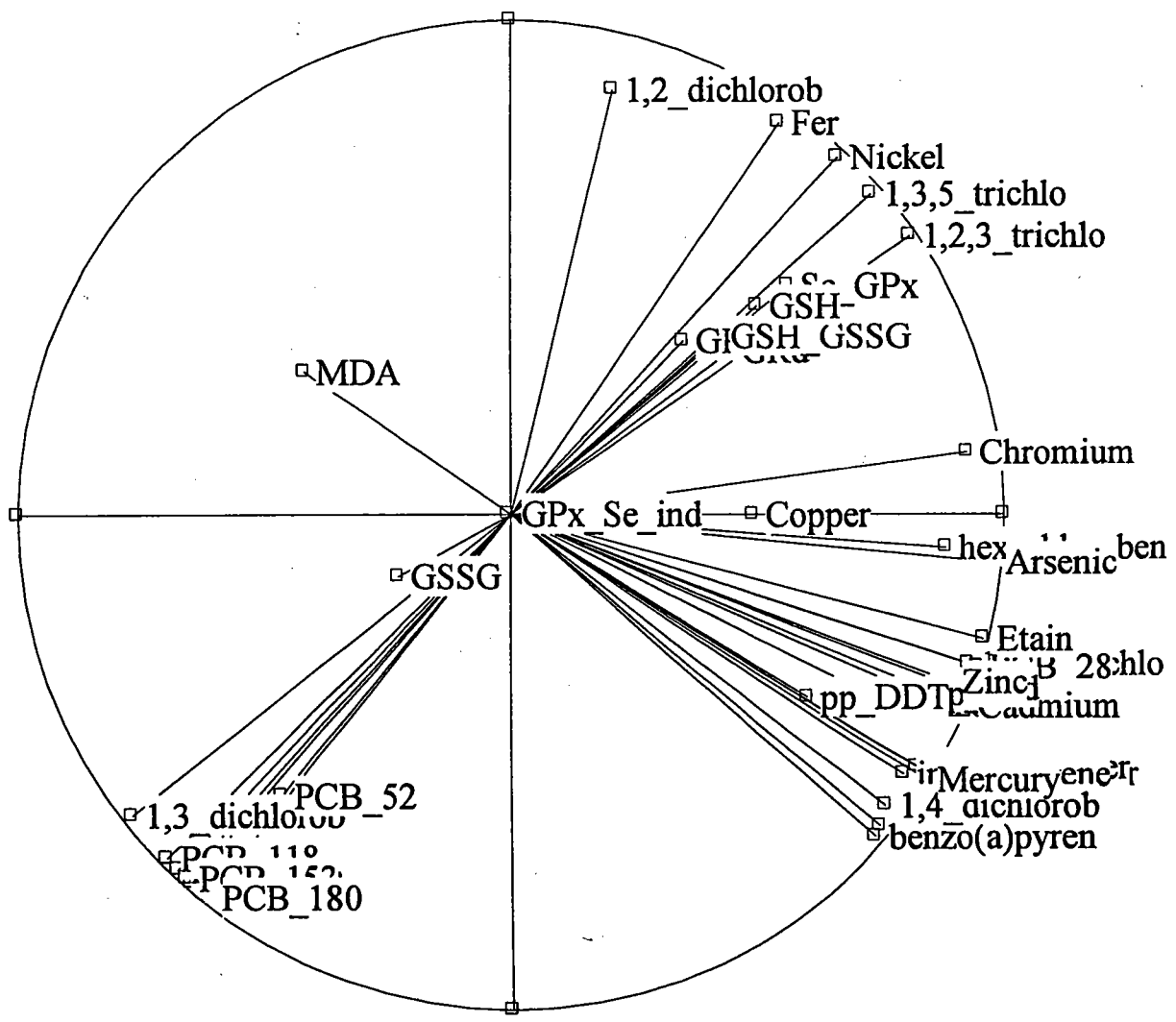


Composante 1 - Inertie: 50.6%

Cercle des corrélations pour les glandes digestives dans le site des Vosges

Composante 2 - Inertie: 25.2%

Cercle des corrélations Variables de base



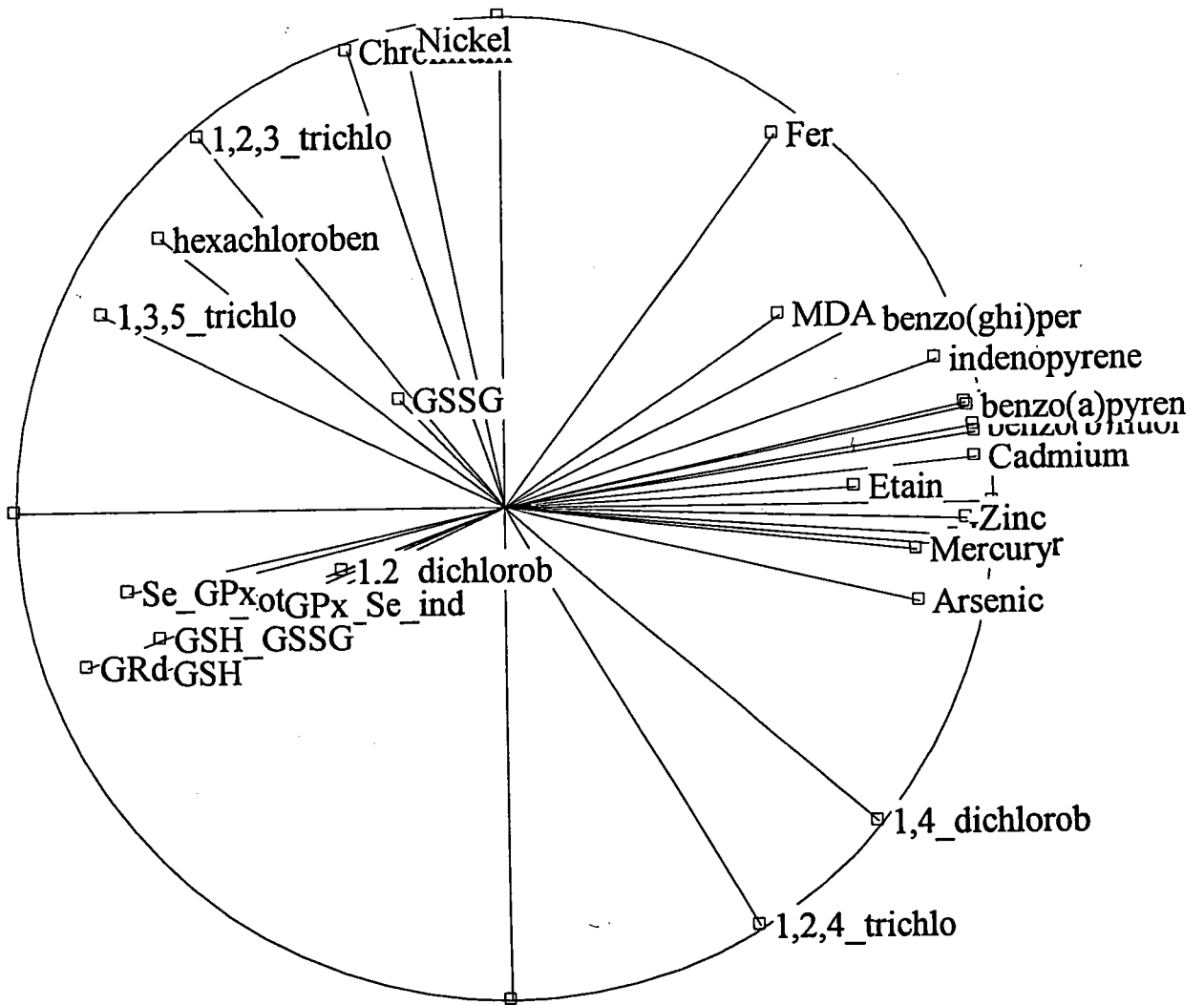
Composante 1 - Inertie: 50.3%

Annexe XXIII

Cercle des corrélations pour les glandes digestives dans le site du Lot et Garonne (première étude)

Cercle des corrélations
Variables de base

Composante 2 - Inertie: 18.5%



Composante 1 - Inertie: 55.9%