



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>

UNIVERSITE DE METZ – UFR Sci F.A.

Laboratoire d'Ecotoxicité, Santé Environnementale

081 622 227

UNIVERSITÉ DE METZ S.C.D.	
N° Inv.	2004 014 S
Cote	S / M3 04 / 05
Loc.	

THESE DE DOCTORAT
de l'Université de Metz
Mention « Sciences de la Vie »
Discipline "Toxicologie de l'Environnement"

soutenue le 9 juillet 2004

**Intérêt du test des Comètes pour l'évaluation de
la génotoxicité environnementale**

Sébastien LEMIERE

Membres du jury :

J.K. CHIPMAN, Professeur
School of Biosciences, University of Birmingham – Edgbaston, Rapporteur

A. DEVAUX, Docteur HDR
ENTPE, Vaulx en Velin, Rapporteur

H. BESSI-LAHRACH, Professeur habilité
Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia, Examineur

C. COSSU-LEGUILLE, Docteur
Laboratoire ESE, Université de Metz, co-Directeur de Thèse

P. VASSEUR, Professeur
Laboratoire ESE, Université de Metz, Directeur de Thèse

*A mes parents, Nadine et Jean-Pierre,
ce travail est en partie le leur...*

A Marie-Thérèse Lemièrre, ma grand-mère...

Je voudrais remercier, en premier lieu, Madame Paule Vasseur, Professeur à l'Université de Metz et Directrice du laboratoire Ecotoxicité et Santé Environnementale. Je ne saurais exprimer en quelques mots, le profond respect et la sincère admiration que j'ai pour elle et pour son travail. Je tiens à lui témoigner ma gratitude pour m'avoir encadré pendant cette thèse et m'avoir accueilli dans son laboratoire.

La deuxième personne vers qui iront mes remerciements est le Dr. Carole Cossu-Leguille, Maître de Conférences à l'Université de Metz. Pour sa disponibilité, sa patience, sa gentillesse et l'intérêt qu'elle a su porter à cette étude et à la rédaction de ce mémoire. Merci, sincèrement...

Je suis très sensible à l'honneur que me font Monsieur Alain Devaux, Ingénieur de Recherche à l'INRA, et Monsieur J. Kevin Chipman, Professeur à l'Université de Birmingham, en acceptant de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Sans oublier Madame Halima Bessi-Lahrach, Professeur habilité de l'Université de Mohammedia, pour sa participation dans ce jury.

Je remercie toute l'équipe des "Récollets" (sic...) pour leur accueil... Ces années m'ont permis d'apprécier leurs nombreuses qualités humaines... Claudine, Maryline, Rosy, Anne-Marie, Chantal, Marie-Andrée... presque des secondes mamans lorraines... pour nos discussions culturelles et artisanales, les pauses cafés, les découvertes culinaires...

Merci à Marie de m'avoir supporté au cours de ces années et Dieu sait si je peux être difficile à vivre... Il y aurait plusieurs chapitres à écrire sur notre amitié... Merci également à Augusta et Mathieu -il y aurait là matière également... Simon et Sandrine, Geoffrey, Sylvie, Gilles, Anne-Marie, et tous les autres... pour tous ces souvenirs communs... pour votre générosité, votre amitié, votre patience et vos attentions... Je n'oublie pas les étudiants de l'ESE : les Stéphanie(s), Sophie, Anna... Pour une certaine ambiance et nos conversations...

Une dernière pensée enfin vers mes proches coutançais, mes frères et ma sœur, ma famille et vers tous ces gens qui me manquent...

A Fred également...

INTRODUCTION	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I. LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES	3
I.1. GENERALITES	3
I.2. HAPs ET DOMMAGES A L'ADN	4
I.3. HAPs ET STRESS OXYDANT	6
II. LES DOMMAGES À L'ADN	8
III. TECHNIQUES D'ÉTUDES DES DOMMAGES À L'ADN	14
III.1. LE TEST DES COMETES	17
III.1.A. Historique et évolutions	17
III.1.B. Nature des dommages mis en évidence	18
III.1.C. Avantages et Limites de l'essai	19
III.1.D. Domaines d'applications	22
III.2. LA 8-OXO-7,8-DIHYDRO-2'-DEOXYGUANOSINE	23
III.3. AUTRES TECHNIQUES SPECIFIQUES DE RECHERCHE DE DOMMAGES A L'ADN	26
III.3.A. La recherche de sites abasiques	26
III.3.B. La recherche d'adduits à l'ADN	26
III.4. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVATION DES SYSTEMES DE REPARATION, MUTATIONS GENIQUES ET MICRONOYAUX	28
IV. APPLICATIONS DU TEST DES COMÈTES	31
IV.1. APPLICATIONS DU TEST DES COMETES AUX ORGANISMES TERRESTRES	31
IV.1.A. Etudes avec des rongeurs	31
IV.1.A.a. Expositions au laboratoire	31
IV.1.A.b. Expositions <i>in situ</i>	35
IV.1.B. Autres organismes terrestres	36
IV.2. APPLICATIONS DU TEST DES COMETES AUX ORGANISMES AQUATIQUES	36
IV.2.A. Les bivalves	36
IV.2.A.a. Expositions au laboratoire	36
IV.2.A.b. Expositions <i>in situ</i>	39
IV.2.B. Autres organismes aquatiques	40
V. LA 8-OXO-7,8-DIHYDRO-2'-DÉOXYGUANOSINE CHEZ LES ORGANISMES AQUATIQUES	42

MATERIELS ET METHODES	45
I.MATÉRIELS BIOLOGIQUES	45
I.1. LES BIVALVES	45
I.1.A. <i>Mytilus edulis</i>	45
I.1.A.a. Systématique	45
I.1.A.b. Echantillonnage et conservation	46
I.1.A.c. Préparation des rations de nourriture et analyses de contamination	46
I.1.B. <i>Unio tumidus</i>	46
I.1.B.a. Systématique	46
I.1.B.b. Morphologie et habitat	47
I.1.B.c. Echantillonnage et conservation des animaux	48
I.2. RATS WISTAR	48
I.2.A. Systématique	48
I.2.B. Origine et conditions d'élevage	49
II. PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX DES DIFFÉRENTS ESSAIS	49
II.1. PROTOCOLES DE PRELEVEMENTS DES TISSUS ET OBTENTION DES SUSPENSIONS CELLULAIRES	49
II.1.A. Prélèvement du sang total des rats	49
II.1.B. Prélèvements et obtention de suspensions cellulaires à partir des tissus solides de rat (Foie, Moelle osseuse)	50
II.1.C. Prélèvement de l'hémolymph chez <i>Unio tumidus</i>	50
II.1.D. Prélèvement et obtention de suspensions cellulaires à partir des tissus solides (branchies et glande digestive) d' <i>Unio tumidus</i>	51
II.1.E. Qualité de la suspension cellulaire	51
II.2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DU TEST DES COMETES	52
II.2.A. Dépôts des gels sur les lames	52
II.2.B. Lyse cellulaire	53
II.2.C. Déroulement de l'ADN	53
II.2.D. Electrophorèse	53
II.2.E. Neutralisation	54
II.2.F. Mise en attente des lames (déshydratation)	54
II.2.G. Lecture des lames	54
II.2.H. Paramètres mesurés, expression des résultats et analyse statistique	55
II.3. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DU DOSAGE DE LA 8-OXO-7,8-DIHYDRO-2'-DEOXYGUANOSINE	56
II.3.A. Extraction et hydrolyse de l'ADN	56
II.3.B. Conditions chromatographiques, de détection et expression des résultats	57
II.4. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE COLORATION ET D'OBSERVATION DES MICRONOYAUX	58

III. PROTOCOLES D'EXPOSITIONS	59
III.1. EXPOSITIONS ALIMENTAIRES DE RATS AVEC DES BIVALVES CONTAMINES PAR LES POLLUANTS DE MAREE NOIRE	59
III.1.A. Etude des dommages à l'ADN suite à des expositions alimentaires	59
III.1.B. Etude de la réversibilité des dommages à l'ADN suite à des expositions alimentaires	60
III.2. EXPOSITIONS IN VIVO AU BENZO(A)PYRENE ET AU FER FERRIQUE DES UNIO TUMIDUS	61
RESULTATS	62
PREMIERE PARTIE	62
Première étude (ARTICLE 1)	64
Seconde étude (ARTICLE 2)	79
Troisième étude (ARTICLE 3)	95
SECONDE PARTIE (ARTICLE 4)	106
DISCUSSION GÉNÉRALE	122
CONCLUSION	130

INTRODUCTION	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I. LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES	3
I.1. GENERALITES	3
I.2. HAPs ET DOMMAGES A L'ADN	4
I.3. HAPs ET STRESS OXYDANT	6
II. LES DOMMAGES À L'ADN	8
III. TECHNIQUES D'ÉTUDES DES DOMMAGES À L'ADN	14
III.1. LE TEST DES COMETES	17
III.1.A. Historique et évolutions	17
III.1.B. Nature des dommages mis en évidence	18
III.1.C. Avantages et Limites de l'essai	19
III.1.D. Domaines d'applications	22
III.2. LA 8-OXO-7,8-DIHYDRO-2'-DEOXYGUANOSINE	23
III.3. AUTRES TECHNIQUES SPECIFIQUES DE RECHERCHE DE DOMMAGES A L'ADN	26
III.3.A. La recherche de sites abasiques	26
III.3.B. La recherche d'adduits à l'ADN	26
III.4. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVATION DES SYSTEMES DE REPARATION, MUTATIONS GENIQUES ET MICRONOYAUX	28
IV. APPLICATIONS DU TEST DES COMÈTES	31
IV.1. APPLICATIONS DU TEST DES COMETES AUX ORGANISMES TERRESTRES	31
IV.1.A. Etudes avec des rongeurs	31
IV.1.A.a. Expositions au laboratoire	31
IV.1.A.b. Expositions <i>in situ</i>	35
IV.1.B. Autres organismes terrestres	36
IV.2. APPLICATIONS DU TEST DES COMETES AUX ORGANISMES AQUATIQUES	36
IV.2.A. Les bivalves	36
IV.2.A.a. Expositions au laboratoire	36
IV.2.A.b. Expositions <i>in situ</i>	39
IV.2.B. Autres organismes aquatiques	40
V. LA 8-OXO-7,8-DIHYDRO-2'-DÉOXYGUANOSINE CHEZ LES ORGANISMES AQUATIQUES	42

MATERIELS ET METHODES	45
I. MATÉRIELS BIOLOGIQUES	45
I.1. LES BIVALVES	45
I.1.A. <i>Mytilus edulis</i>	45
I.1.A.a. Systématique	45
I.1.A.b. Echantillonnage et conservation	46
I.1.A.c. Préparation des rations de nourriture et analyses de contamination	46
I.1.B. <i>Unio tumidus</i>	46
I.1.B.a. Systématique	46
I.1.B.b. Morphologie et habitat	47
I.1.B.c. Echantillonnage et conservation des animaux	48
I.2. RATS WISTAR	48
I.2.A. Systématique	48
I.2.B. Origine et conditions d'élevage	49
II. PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX DES DIFFÉRENTS ESSAIS	49
II.1. PROTOCOLES DE PRELEVEMENTS DES TISSUS ET OBTENTION DES SUSPENSIONS CELLULAIRES	49
II.1.A. Prélèvement du sang total des rats	49
II.1.B. Prélèvements et obtention de suspensions cellulaires à partir des tissus solides de rat (Foie, Moelle osseuse)	50
II.1.C. Prélèvement de l'hémolymphe chez <i>Unio tumidus</i>	50
II.1.D. Prélèvement et obtention de suspensions cellulaires à partir des tissus solides (branchies et glande digestive) d' <i>Unio tumidus</i>	51
II.1.E. Qualité de la suspension cellulaire	51
II.2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DU TEST DES COMETES	52
II.2.A. Dépôts des gels sur les lames	52
II.2.B. Lyse cellulaire	53
II.2.C. Déroulement de l'ADN	53
II.2.D. Electrophorèse	53
II.2.E. Neutralisation	54
II.2.F. Mise en attente des lames (déshydratation)	54
II.2.G. Lecture des lames	54
II.2.H. Paramètres mesurés, expression des résultats et analyse statistique	55
II.3. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DU DOSAGE DE LA 8-OXO-7,8-DIHYDRO-2'-DEOXYGUANOSINE	56
II.3.A. Extraction et hydrolyse de l'ADN	56
II.3.B. Conditions chromatographiques, de détection et expression des résultats	57
II.4. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE COLORATION ET D'OBSERVATION DES MICRONOYAUX	58

III. PROTOCOLES D'EXPOSITIONS	59
III.1. EXPOSITIONS ALIMENTAIRES DE RATS AVEC DES BIVALVES CONTAMINES PAR LES POLLUANTS DE MAREE NOIRE	59
III.1.A. Etude des dommages à l'ADN suite à des expositions alimentaires	59
III.1.B. Etude de la réversibilité des dommages à l'ADN suite à des expositions alimentaires	60
III.2. EXPOSITIONS IN VIVO AU BENZO(A)PYRENE ET AU FER FERRIQUE DES UNIO TUMIDUS	61
RESULTATS	62
PREMIERE PARTIE	62
Première étude (ARTICLE 1)	64
Seconde étude (ARTICLE 2)	79
Troisième étude (ARTICLE 3)	95
SECONDE PARTIE (ARTICLE 4)	106
DISCUSSION GÉNÉRALE	122
CONCLUSION	130

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Formule développée du -7 α ,8 β -dihydroxy-9 β ,10 β -époxy-7,8,9,10-tétrahydrobenzo(a)pyrène

Figure 2 : Voies principales d'activation du benzo(a)pyrène qui peuvent conduire à des dommages à l'ADN *in vivo*

Figure 3 : Réductions de la molécule de dioxygène et formation des espèces réactives de l'oxygène (anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$))

Figure 4 : Principaux produits d'oxydation des pyrimidines et des purines, consécutifs à un stress oxydant

Figure 5 : Types d'approches en surveillance environnementale : paramètres mesurables à différents niveaux d'organisation biologique et dans le biotope

Figure 6 : Représentation schématique des conséquences cellulaires éventuelles de l'exposition à un agent génotoxique

Figure 7 : Niveaux d'études de génotoxicité environnementale : de l'exposition à un agent génotoxique aux effets biologiques somatiques ultimes

Figure 8 : Principales lésions à l'ADN induites par l'exposition à des agents génotoxiques

Figure 9 : Sites potentiels de formation d'adduits sur les bases de l'ADN

Figure 10 : Structures chimiques de la thymine glycol (5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine), de la 5,6-dihydrothymine et du photoproduit pyrimidine(6-4)pyrimidone

Figure 11 : Principales origines des cassures à l'ADN

Figure 12 : Principales étapes du test des comètes

Figure 13 : Exemples d'observations de noyaux par le test des comètes

Figure 14 : Exemple d'observation qualifiée de cellule hérisson ou cellule fantôme

Figure 15 : Nature chimique de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine et représentation du mésappariement de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine avec l'adénine qui peut conduire à la transversion G:C $\Rightarrow$ A:T

Figure 16 : Attaque de la 2'-déoxyguanosine par l'oxygène singulet

Figure 17 : Attaque de la guanine par le radical hydroxyle et formation du précurseur radicalaire de la 8-oxoGua

Figure 18 : Principe de la technique de détection des sites AP

Figure 19 : Diagramme schématique illustrant la formation de micronoyaux

Figure 20 : photographie d'un *Unio tumidus*

Figure 21 : Principales étapes du protocole expérimental du test des comètes

Figure 22 : Schéma expérimental de l'étude sur la réversibilité des dommages à l'ADN suite à l'exposition alimentaire

Article 1

Figure 1 : DNA damage in hepatocytes of rats fed during 15 or 30 days with either standard food (St), mussels sampled in a non-impacted site (M^-) and mussels sampled in poorly (M^+) and heavily (M^{+++}) contaminated areas.

Figure 2 : DNA damage in bone marrow cells of rats fed during 15 or 30 days with either standard food (St), mussels sampled in a non-impacted site (M^-) and mussels sampled in poorly (M^+) and heavily (M^{+++}) contaminated areas.

Figure 3 : DNA damage in nucleated cells of peripheral blood of rats fed during 15 or 30 days with either standard food (St), mussels sampled in a non-impacted site (M^-) and mussels sampled in poorly (M^+) and heavily (M^{+++}) contaminated areas.

Figure 4 : Frequencies of micronucleated cells in bone marrow cells and in nucleated cells of peripheral blood for rats fed during 15 or 30 days with either standard food (St), mussels sampled in a non-impacted site (M^-) and mussels sampled in poorly (M^+) and heavily (M^{+++}) contaminated areas.

Article 2

Figure 1 : DNA damage in hepatocytes of rats fed during 15 or 30 days with either standard food (C), mussels sampled in a non impacted site (CM), or in areas impacted to various degrees by the oil slick (M^+ , M^{++} and M^{+++})

Figure 2 : DNA damage in bone marrow cells of rats fed during 15 or 30 days with either standard food (C), mussels sampled in a non impacted site (CM), or in areas impacted to various degrees by the oil slick (M^+ , M^{++} and M^{+++})

Figure 3 : DNA damage in peripheral blood nucleated cells of rats fed during 15 or 30 days with either standard food (C), mussels sampled in a non impacted site (CM), or in areas impacted to various degrees by the oil slick (M^+ , M^{++} and M^{+++})

Figure 4 : Examples of nuclei observations in each class of DNA damage

Article 3

Figure 1: Evolution of the proportions of cells observed in the classes of DNA damage : 20-40%, 40-60 % , 60-80 % and > 80 % (Tail DNA) for hepatocytes and bone marrow cells of rats fed during 15 days with standard food or with mussels sampled in a non impacted site (CM), or in less and more impacted areas (M^+ and M^{++}), and sacrificed at spread out dates : three days after the end of food exposure (t_0), seven days later (t_{+7}) and fourteen days later (t_{+14})

Article 4

Figure 1 : Lipid peroxidation index (MDA) in the digestive gland (a) and the gills (b) of *Unio tumidus* exposed to benzo(a)pyrene and/or ferric iron during 6 days

Figure 2 : Levels of 8-oxodGuo in the digestive gland (a) and the gills (b) of *Unio tumidus* exposed to benzo(a)pyrene and/or ferric iron during 6 days

Figure 3 : DNA breaks (averaged Tail DNA and S.E.M.) in the three cells population ((a) hemocytes, (b) digestive gland cells and (c) gill cells) of *Unio tumidus* exposed to benzo(a)pyrene and/or ferric iron during 6 days

Figure 4 : Relationships between the responses of the three parameters (DNA breaks (Tail DNA), oxidative DNA damage (8-oxodGuo) and lipid peroxidation (MDA)) in the digestive gland and the gills of *Unio tumidus* after 6 days of exposure to benzo(a)pyrene and ferric iron or to mixtures of the two compounds

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Caractéristiques et classification de la série des seize HAPs en terme de cancérogénicité et de génotoxicité

Tableau II : Principales techniques d'étude des cassures à l'ADN

Tableau III : Principaux avantages et inconvénients du test des comètes pour l'étude des dommages à l'ADN

Tableau IV : Doses, concentrations minimales d'agent génotoxique ou modalité la plus réduite, induisant un effet significatif (dommages à l'ADN), relevées dans les travaux ayant appliqué le test des comètes en complément d'autres essais pour l'étude des dommages à l'ADN suite aux expositions

Tableau V : Principales techniques d'étude de la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine

Tableau VI : Principales techniques d'études des adduits à l'ADN

Tableau VII : Travaux rapportés dans la littérature d'association pour l'étude de la génotoxicité, du test des comètes et de la recherche de micronoyaux avec des poissons et de bivalves, suite à des expositions in vivo, au laboratoire ou des expositions in situ

Tableau VIII : Applications du test des comètes pour l'étude des dommages à l'ADN, avec des cellules de bivalves marins exposés au laboratoire en conditions contrôlées in vitro & in vivo

Tableau IX : Applications du test des comètes pour l'étude des dommages à l'ADN, avec des cellules de bivalves dulçaquicoles exposés au laboratoire en conditions contrôlées in vitro & in vivo

Tableau X : Applications du test des comètes pour l'étude des dommages à l'ADN avec des cellules de bivalves marins et dulçaquicoles exposés in situ

Tableau XI : Travaux rapportés dans la littérature de l'application de la recherche de 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine comme marqueur des dommages oxydatifs à l'ADN, dans les tissus de poissons et d'invertébrés aquatiques exposés au laboratoire, en conditions contrôlées, in vivo

Tableau XII : Travaux rapportés dans la littérature de l'application de la recherche de 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine comme marqueur des dommages oxydatifs à l'ADN, dans les tissus de poissons et de bivalves exposés in situ

Tableau XIII : Séquence des différentes étapes du protocole d'extraction et d'hydrolyse de l'ADN à partir des tissus (branchies, glande digestive) d'*Unio tumidus* en utilisant le kit « Oxytek DNA Isolation kit », référence 0805001 de la gamme ZeptoMetrix

Tableau XIV : Récapitulatif des conditions d'expositions lors des deux premières expérimentations avec un repas de moules tous les 2 jours (première étude) et un repas de moules tous les jours (seconde étude)

Tableau XV : Récapitulatif des conditions d'expositions lors de l'expérience sur la réversibilité des dommages à l'ADN suite à l'exposition alimentaire

Tableau XVI : Composition des différents milieux d'intoxication de l'exposition définitive in vivo au Benzo(a)pyrène et au fer ferrique d'*Unio tumidus*

Tableau XVII : Récapitulatif des différents lots de nourriture utilisés dans les expositions alimentaires de rats avec des bivalves contaminés par les polluants de marée noire

Article 1

Table 1: PAHs and related contaminants in the food constituted with either standard croquettes (St), or mussels sampled in a non-impacted site (M^-) and in poorly (M^+) and heavily (M^{+++}) contaminated areas

Table 2 : Distribution parameters of DNA damage in the three cell populations by Comet assay (expressed in terms of DNA percentage in the tail) in rats fed during 15 or 30 days (15 or 30) with food constituted with either standard croquettes (St), or mussels sampled in a non-impacted site (M^-) and in poorly (M^+) and heavily (M^{+++}) contaminated areas

Article 2

Table 1: PAHs and related contaminants in standard croquettes (C), and mussels sampled in a non impacted site (CM), and in impacted areas (M^+ ; M^{++} ; M^{+++}) : chemical analyses of the 16 PAHs on the priority list of US-EPA by HPLC (in $\mu\text{g/kg}$ dry weight) and analysis of substituted and related PAHs by GC-MS (in $\mu\text{g/kg}$ dry weight)

Table 2 : Distribution parameters of DNA damage in the three cell populations by comet assay (expressed in terms of DNA percentage in the tail : averaged Tail DNA and S.E.M.) for rats fed during 15 or 30 days with food constituted with either standard croquettes (C), or mussels sampled in a non impacted site (CM) and in less and more impacted areas (M^+ ; M^{++} ; M^{+++})

Table 3 : PAH concentrations in the batches of control and contaminated mussels and corresponding daily intake of rats fed with mussels

Article 3

Table 1: PAHs and related contaminants in standard food (C) and in mussels sampled in a non impacted site (CM), and in impacted areas (M^+ and M^{++})

Table 2 : DNA damage (averaged TAIL DNA percentages and S.E.M.) in the three cell populations by comet assay for rats fed during 15 days with either standard food or mussels and sacrificed at spread out dates 3 days after the end of food exposure (t_0), 7 days later (t_{+7}) and 14 days later (t_{+14})

Article 4

Table 1 : Lipid peroxydation index, oxidative DNA damage and DNA breaks, in the digestive gland, in the gills and in the hemocytes of *Unio tumidus* exposed to benzo(a)pyrene and/or ferric iron during 6 days

LISTE DES ABREVIATIONS

α -T : α -tocophérol acétate
1-NP : 1-nitropyrène
3AT : 3-aminotriazole
4-NQO : 4-nitroquinoline-*N*-oxide
8OHGua : 8-hydroxyguanine
8-oxoAde : 8-oxo-7,8-dihydroadénine
8-oxodGuo : 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine
8-oxoGua : 8-oxo-7,8-dihydroguanine
A : Adénine
AA : acide ascorbique
AAF : *N*-acétyl-2-aminofluorène
ADN : Acide désoxyribonucléique
AF : 2-aminofluorène
AFNOR : Association Française de Normalisation
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ANF : α -naphtoflavone
ara-C : cytosine- β -D-arabinofuranoside
ARN : Acide ribonucléique
ARP : *Aldehyde reagent probe*
B(a)P : benzo(a)pyrène
BA : benzo(a)anthracène
BeT : bromure d'éthidium
BPDE : benzopyrène diol époxyde
BSO : buthionine sulfoximine
C : Cytosine
CCM : chromatographie sur couche mince
CE : électrophorèse capillaire
CP : cyclophosphamide
CT : clotrimazole
DBO : demande biologique en oxygène
DC : dicoumarol
DCO : demande chimique en oxygène
DDC : acide diéthylldithiocarbamique

DEB : diépoxybutane

DEM : diéthyl maléate

DEP : particules de fumée de diesel

DMSO : diméthylsulfoxyde

EC : détection électrochimique

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

EGME : éthylène glycol monométhyl éther

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*

EMS : éthylméthane sulfonate

ENU : *N*-éthyl-*N*-nitrosourée

EROD: éthoxurésorufine-*O*-dééthylase

ETM : *Extent tail Moment*

FADU : *Fluorescent analysis of DNA unwinding* - analyse fluorimétrique du déroulement de l'ADN

Fapy-Ade : 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine

Fapy-Gua : 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine

FISH : Hybridation *in situ*

Fpg : Formamidopyrimidine glycosylase

G : Guanine

GC : chromatographie en phase gazeuse

GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

HAPs : hydrocarbures aromatiques polycycliques

HPLC : chromatographie liquide haute performance

IARC : *International Agency for Research on Cancer* - Centre International pour la Recherche contre le Cancer

IBGN : Indice biologique global normalisé

IRH : Institut de Recherches Hydrobiologiques

LC : chromatographie liquide

LH : acides gras polyinsaturés

LOEL : low observed effect level

MDA : malonaldialdéhyde

m.s. : matière sèche

MEL : cellules érythroleucémiques de souris

MMC : mitomycine C

MMS : méthylméthane sulfonate

MNNG : *N*-méthyl-*N'*-nitrosoguanidine

MX : chloro-3 dichlorométhyl-4 hydroxy-5(5H)-furanone-2

NDEA : *N*-diéthylnitrosamine

NDMA : *N*-nitrosodiméthylamine

NF : nitrofurantoïne

OFR : *Office of the Federal Register* - Bureau de Registration Fédérale

OCDE : *Organisation for Economic Co-operation and Development* – Organisation de Coopération et de Développement Economiques

OWD : *oil-water dispersion* - dispersion pétrole - eau

PAA : acide peracétique

PBN : *N-N-t*-butyl- α -phénylnitron

PBS : *Phosphate Buffered saline*

PCB 77 : 3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle

PCBs : polychlorobiphényles

ROS : espèces réactives de l'oxygène

SCF : *Scientific Committee on Food* - Comité Scientifique Européen de l'Alimentation

SDS : dodécyl sulfate de sodium

Sites AP : sites abasiques

SOD : superoxyde dismutase

T : Thymine

tBOOH : *tert*-butyl hydroperoxide

TEFs : *Toxic Equivalent Factors* - Facteurs d'équivalents toxiques

Tempo : 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-*N*-oxyl

TEQs : *Toxic Equivalent Quantities* - Quantités d'équivalents toxiques

Topo I : topoisomérase I

Topo II : topoisomérase II

Tris : Tris(hydroxyméthyl)-aminoéthane

Triton : *t*-octylphénoxyéthoxyéthanol

UDS : *unscheduled DNA synthesis* - synthèse non programmée d'ADN

UK : *United Kingdom* - Royaume Uni

USA : *United States of America* - Etats-Unis d'Amérique

US-EPA : *Environment Protection Agency, United States of America* - Agence de Protection de l'Environnement, Etats-Unis d'Amérique

UV : rayonnements ultra-violets

WSF : *water soluble fraction* -fraction hydrosoluble

LISTE DES ARTICLES ET COMMUNICATIONS

Articles acceptés, soumis ou en préparation :

GENOTOXICITY RELATED TO OIL SPILL POLLUTANT TRANSFER FROM MUSSELS TO MAMMALS VIA THE FOOD.

LEMIERE Sébastien, COSSU-LEGUILLE Carole, BISPO Antonio, JOURDAIN Marie-José, LANHERS Marie-Claire, BURNEL Daniel et VASSEUR Paule

Accepté dans Environmental Toxicology

GENOTOXIC AND CYP1A ENZYME EFFECTS CONSECUTIVE TO THE FOOD TRANSFER OF OIL SPILL CONTAMINANTS FROM MUSSELS TO MAMMALS

LEMIERE Sébastien, COSSU-LEGUILLE Carole, CHATY Sylvie, RODIUS François, BISPO Antonio, JOURDAIN Marie-José, LANHERS Marie-Claire, BURNEL Daniel. et VASSEUR Paule

Accepté dans Aquatic Living ressources

DNA DAMAGE MEASURED BY THE SINGLE-CELL GEL ELECTROPHORESIS (COMET) ASSAY IN MAMMALS FED WITH ERIKA OIL-SPILL CONTAMINATED MUSSELS

LEMIERE Sébastien, COSSU-LEGUILLE Carole, BISPO Antonio, JOURDAIN Marie-José, LANHERS Marie-Claire, BURNEL Daniel et VASSEUR Paule

(soumis à Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis)

REVERSIBILITY OF GENOTOXIC EFFECTS IN MAMMALS FED A DIET OF OIL SPILL-CONTAMINATED MUSSELS

(soumis à Marine Environmental Research)

COMPLEMENTARITIES OF THE STUDY OF DNA DAMAGE (COMET ASSAY) AND MEASUREMENT OF 8-OXODGUO (HPLC-EC) TO ASSESS DNA INTEGRITY IN CELLS OF THE FRESHWATER BIVALVE *UNIO TUMIDUS*

LEMIERE Sébastien, COSSU-LEGUILLE Carole, CHARISSOU Anne-Marie et VASSEUR Paule

manuscrit en préparation

Communications orales

FOOD CONTAMINATION TRANSFER OF OIL SPILL POLLUTANTS FROM MUSSELS TO MAMMALS : A CASE STUDY

LEMIERE Sébastien, COSSU-LEGUILLE Carole, CHATY Sylvie, RODIUS François, BISPO Antonio, JOURDAIN Marie-José, LANHERS Marie-Claire, BURNEL Daniel. et VASSEUR Paule

International symposium on Toxicity Assessment, 11th, Vilnius, Lituanie, 1-6 Juin 2003

Communications orales avec publication dans les actes du colloque :

APPROCHE DES RISQUES SANITAIRES PAR ETUDE DU TRANSFERT DE LA CONTAMINATION ET DE LA TOXICITE DES POLLUANTS DE L'ERIKA PAR VOIE ALIMENTAIRE.

CHATY Sylvie et LEMIERE Sébastien (*COMMUNICATION en DUO*), COSSU-LEGUILLE Carole, RODIUS François, BISPO Antonio, JOURDAIN Marie-José, LANHERS Marie-Claire, BURNEL Daniel et VASSEUR Paule

Colloque international SAFERSEAS. Les leçons techniques de l'Erika et des autres accidents maritimes, Brest : 13-16 Mars 2002

TOXICITE PAR TRANSFERT DES POLLUANTS PAR LA VOIE ALIMENTAIRE : VERS UNE EVALUATION DES RISQUES SANITAIRES.

LEMIERE Sébastien, COSSU-LEGUILLE Carole, CHATY Sylvie, RODIUS François, BISPO Antonio, JOURDAIN Marie-José, LANHERS Marie-Claire, BURNEL Daniel. et VASSEUR Paule
 3^{ème} journée d'Etudes du Pôle Européen Jean MONNET, Faculté de Droit-Economie-Administration, Université de Metz, « ACTIVITES HUMAINES, RISQUES ET DOMMAGES ECOLOGIQUES », 19 novembre 2002

ETUDE DE MARQUEURS DE GENOTOXICITE CHEZ LES INVERTEBRES BENTHIQUES

LEMIERE Sébastien, COSSU-LEGUILLE Carole et VASSEUR Paule
 Séminaire de l'école doctorale RP2E, Nancy, 17 janvier 2002

Publications dans les actes du colloque :

BIOMARKERS FOR HUMAN AND ENVIRONMENTAL HEALTH

VASSEUR Paule, COSSU-LEGUILLE Carole, CHATY Sylvie, LEMIERE Sébastien et RODIUS François
 Colloque SECOTOX, 7th European Meeting. Brno, Czech Republic : 14-16 Octobre 2002

Communications affichées :

FOOD CONTAMINATION TRANSFER OF ERIKA POLLUTANTS FROM MUSSELS TO MAMMALS.

CHATY Sylvie et LEMIERE Sébastien (Collaboration), COSSU-LEGUILLE Carole, RODIUS François, BISPO Antonio, JOURDAIN Marie-José, LANHERS Marie-Claire, BURNEL Daniel et VASSEUR Paule
 Colloque Les évaluations des suites du naufrage de l'Erika, Nantes, 23-25 Janvier 2002

FOOD TRANSFER OF OIL SPILL CONTAMINANTS FROM MUSSELS TO MAMMALS

LEMIERE Sébastien, COSSU-LEGUILLE Carole, CHATY Sylvie, RODIUS François, BISPO Antonio, JOURDAIN Marie-José, LANHERS Marie-Claire, BURNEL Daniel. et VASSEUR Paule
 Colloque L'après ERIKA : le milieu marin sous surveillance, IFREMER, Centre de Nantes, 20 et 21 novembre 2003

MARQUEURS DE GENOTOXICITE CHEZ UN INVERTEBRE DU BASSIN DE LA MOSELLE

LEMIERE Sébastien, COSSU-LEGUILLE Carole et VASSEUR Paule
 Séminaire de l'école doctorale RP2E, Nancy, 23 janvier 2003

Rapport d'avancement :

APPROCHE DES RISQUES SANITAIRES PAR ETUDE DU TRANSFERT DE LA CONTAMINATION ET DE LA TOXICITE DES POLLUANTS DE L'ERIKA PAR LA VOIE ALIMENTAIRE : Rapport d'avancement

LEMIERE Sébastien, COSSU-LEGUILLE Carole, CHATY Sylvie, RODIUS François, BISPO Antonio, JOURDAIN Marie-José, LANHERS Marie-Claire, BURNEL Daniel et VASSEUR Paule,
 EBSE, avril 2002

INTRODUCTION

L'exposition aux agents chimiques et physiques de l'environnement peut générer directement ou indirectement des dommages à l'ADN. Ces lésions participent à la mutagenèse et à l'initiation de la cancérogenèse et leur possible impact sur le génome des populations naturelles constitue une préoccupation justifiée. L'objectif de notre travail était la mise en œuvre du test des comètes dans des études de génotoxicité environnementale. Cette technique récente permet la mesure du degré de dommages à l'ADN au sein d'une population cellulaire nucléée. En toxicologie génétique, de nombreux essais sont applicables à la recherche des lésions de l'ADN, mais les travaux avec des organismes exposés à des échantillons de l'environnement ou des individus autochtones exposés *in situ* sont restés rares jusqu'au développement du test des comètes.

Dans le contexte de la marée noire de l'Erika et de celui plus large des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), nous avons étudié, au moyen de ce test, les dommages à l'ADN, chez des mammifères contaminés par la voie alimentaire, et chez un invertébré d'eau douce, *Unio tumidus*, suite à une exposition directe par le milieu.

La première partie de ce travail, s'inscrivait dans le cadre du programme de recherche « *Approche des risques sanitaires par étude du transfert de la contamination et de la toxicité des polluants de l'ERIKA par la voie alimentaire* ».

20 000 tonnes de fioul ont été déversées dans l'océan suite au naufrage du pétrolier maltais Erika et cette marée noire a touché plus de 400 km de côtes françaises, en Bretagne. Le produit, que transportait l'Erika, consistait en un fuel lourd, de type n°2, résidu de distillation du pétrole brut. Dans cette fraction se trouvent concentrés les composés toxiques du pétrole dont une forte proportion d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). Ces HAPs sont des polluants persistants, au caractère mutagène et/ou cancérigène reconnu. Ils suivent au sein des organismes diverses voies de métabolisation dont certaines potentialisent leur caractère génotoxique et peuvent conduire à l'apparition de dommages à l'ADN. Les bivalves sont reconnus pour bioaccumuler les contaminants minéraux et organiques, notamment les HAPs et ces organismes sont largement utilisés dans les études sur les conséquences des marées noires et plus généralement comme organismes sentinelles, du fait de leur large distribution, de leur nature sessile, et de leur intérêt socio-économique (mytiliculture, conchyliculture, ostréiculture...). Des effets à long terme pouvaient être suspectés suite à une exposition directe aux polluants de la marée noire de l'ERIKA ou lors

de leur transfert *via* la chaîne alimentaire, des moules jusqu'aux consommateurs. C'est pourquoi l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) a aussitôt recommandé le dosage des HAPs dans les moules au moment du naufrage et a fixé à 500 µg de HAPs par kg de matière sèche la valeur limite de contamination des produits de la mer. Peu de données sont disponibles sur le rôle des invertébrés dans le transfert de contamination et de toxicité des polluants et des agents génotoxiques, vis à vis des niveaux trophiques supérieurs et des mammifères. Nous avons souhaité en partie répondre à cette question, en étudiant les dommages à l'ADN par le test des comètes chez des rats, ayant été nourris par des moules, *Mytilus edulis*, échantillonnées sur des sites impactés par la marée noire de l'Erika.

Dans la seconde partie de ce travail, le test des comètes a été mis en œuvre chez un invertébré d'eau douce, *Unio tumidus*, suite à des expositions directes, *in vivo*, par le milieu. De nombreux biomarqueurs ont été développés chez ce bivalve et ce dernier s'est révélé un organisme bioindicateur de pollution fiable. Nos objectifs étaient l'étude des complémentarités de la mesure des dommages à l'ADN dans une approche multimarqueur, en vue d'applications ultérieures sur le terrain, en conditions environnementales ainsi que l'étude des liens entre un stress oxydant et les effets génotoxiques chez cet invertébré benthique. Ce travail a été réalisé en exposant des bivalves, en conditions contrôlées, au benzo(a)pyrène (B(a)P), représentant type de la famille des HAPs, et au fer ferrique. Des effets de synergies génotoxiques entre ces deux composés ont été rapportés dans la littérature. Dans l'optique de la comparaison des réponses dans différents tissus d'*Unio tumidus* (hémolymph, glande digestive et branchies), notre recherche s'est articulée autour de l'étude des dommages à l'ADN à l'aide du test des comètes et de l'évaluation des dommages cellulaires oxydatifs (recherche de la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine, marqueur des dommages oxydatifs à l'ADN et du malondialdéhyde, marqueur de dommages oxydatifs membranaires).

Avant de présenter les résultats de nos travaux, nous commencerons par aborder brièvement quelques généralités sur les hydrocarbures aromatiques polycycliques et leur génotoxicité. Nous développerons ensuite les différents types de dommages à l'ADN et leurs techniques d'études, applicables en biosurveillance environnementale ou au laboratoire. Un intérêt particulier sera accordé au test des comètes et des exemples d'applications de cette technique avec les rongeurs et les bivalves illustreront notre propos.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les Hydrocarbures aromatiques polycycliques

I.1. Généralités

La famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), encore appelés hydrocarbures aromatiques polycondensés, regroupe des composés organiques, à au moins deux noyaux aromatiques accolés à structure plane, formés lors de la combustion incomplète de molécules carbonées. Ils sont présents dans les fumées d'incinération, les gaz d'échappements des véhicules automobiles, les résidus de cracking et de distillation des pétroles, les goudrons ou les suies. Ce sont des polluants persistants dans l'environnement où ils se trouvent sous forme de mélanges complexes. La plupart des composés à plus de quatre noyaux aromatiques présentent un caractère mutagène et/ou cancérigène (IARC, 1973 ; 1987). La cancérogénicité des HAPs pour l'homme, suite à l'exposition par inhalation ou contact cutané est reconnue. Les données sur leur potentiel cancérigène par voie orale sont moins nombreuses. Pourtant des effets à long terme peuvent être suspectés, suite à une exposition directe ou lors du transfert de ces composés *via* la chaîne alimentaire, jusqu'à l'homme (Schneider *et al.*, 2002), mais les études d'évaluation des risques sont pour la plupart rétrospectives et consistent en la comparaison des niveaux de contamination et les seuils individuels pour chaque composé, sans prendre en compte l'exposition en situation réelle afin d'intégrer la biodisponibilité des polluants, leurs interactions possibles et leur toxicité.

Seize HAPs ont été reconnus comme prioritaires lors d'études de biomonitoring par l'US-EPA (OFR, 1982). Leur liste est la suivante : naphthalène, acénaphthylène, acénaphtène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, dibenzo(ah)anthracène, benzo(ghi)pérylène et indéno(1,2,3-cd)pyrène. Les caractéristiques et la classification de ces HAPs en terme de cancérogénicité et de génotoxicité sont présentées dans le tableau I. Leur dosage a été recommandé dans les produits de la mer, et principalement les bivalves (moules et huîtres) par l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) au moment des naufrages de l'Erika et du Prestige (AFSSA, 2000, 2003). La valeur-guide de 500 µg de HAPs (somme des seize) par kg de matière sèche a été définie comme le seuil de contamination des

	CAS ^a	TEFs ^b	Classification Cancérogénicité (IARC) ^c	Classification Génotoxicité (SCF) ^d
Naphtalène	91-20-3	0,001		png
Acénaphthylène	208-96-8	0,001		id
Acénaphène	83-32-9	0,001		id
Fluorène	86-73-7	0,001	3	id
Phénanthrène	85-01-8	0,001	3	e
Anthracène	120-12-7	0,01	3	ng
Fluoranthène	206-44-0	0,001	3	e
Pyrène	129-00-0	0,001	3	ng
Benzo(a)anthracène	56-55-3	0,1	2A	g
Chrysène	218-01-9	0,01	3	g
Benzo(b)fluoranthène	205-99-2	0,1	2B	g
Benzo(k)fluoranthène	207-08-9	0,1	2B	g
Benzo(a)pyrène	50-32-8	1	2A	g
Dibenzo(ah)anthracène	53-70-3	5	2B	g
Benzo(ghi)pérylène	191-24-2	0,01	3	g
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	193-39-5	0,1	2B	g

Tableau I : Caractéristiques et classification de la série des seize HAPs en terme de cancérogénicité et de génotoxicité

^a Chemical Abstracts Service registry number

^b Facteurs d'équivalent toxique définis par Nisbet et LaGoy (1992)

^c Classification IARC des cancérogènes : 2A : cancérogène probable pour l'homme ; 2B : cancérogène possible pour l'homme ; 3 : non classifiable en terme de cancérogénicité (IARC, 1987)

^d Evaluation de la génotoxicité par le Comité Scientifique Européen de l'Alimentation (SCF : Scientific Committee on Food) : png : probablement non génotoxique ; id : données inadéquates ; e : données équivoques ; ng : non génotoxique ; g : génotoxique (SCF, 2002)

produits de la mer, au-dessus duquel leur consommation et leur commercialisation sont interdites. Les Agences de l'eau ont fixé des seuils de qualité de l'eau pour 6 HAPs. Ces seuils de qualité, en terme de protection de l'écosystème, qui définissent la classe 4, où l'eau peut-être considérée comme de très mauvaise qualité sont de 5 µg/L pour le B(a)P et de 28 µg/L pour le fluoranthène, le benzo(b)fluoranthène, le benzo(k)fluoranthène, le benzo(ghi)pérylène et l'indéno(1,2,3-cd)pyrène (Système d'évaluation de la qualité de l'eau, 1997).

Le benzo(a)pyrène, représentant type de la famille des HAPs, substance de référence dans de nombreuses études de cancérogenèse et classé 2A (probablement cancérigène pour l'homme) par l'IARC, est souvent utilisé comme indicateur de la contamination par les HAPs dans les échantillons environnementaux. Parmi les seize HAPs, deux sont classés en classe 2A (cancérigène probable pour l'homme : B(a)P et benzo(a)anthracène), quatre en classe 2B (cancérigène possible pour l'homme : benzo(b)fluoranthène, le benzo(k)fluoranthène le dibenzo(ah)anthracène et l'indéno(1,2,3-cd)pyrène et sept en classe 3 (non classifiable en terme de génotoxicité pour l'homme : le fluorène, le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène, le pyrène, le chrysène et le benzo(ghi)pérylène).

Nisbet et LaGoy (1992) ont défini des facteurs d'équivalent toxique (TEFs) pour rapporter la contamination par les HAPs en quantités d'équivalent toxique au B(a)P (TEQs). Ces facteurs se basent sur la toxicité propre à chaque composé -notamment sur leur mutagénicité et leur cancérogénicité- et sont rapportés au potentiel toxique du benzo(a)pyrène dont le TEF est pris pour unité. Seul le TEF du dibenzo(a,h)anthracène est supérieur à celui du B(a)P.

I.2. HAPs et dommages à l'ADN

Le métabolisme des HAPs est complexe. Sur les seize HAPs, huit sont reconnus comme génotoxique par la voie alimentaire (benzo(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, dibenzo(ah)anthracène, benzo(ghi)pérylène et indéno(1,2,3-cd)pyrène) (Scientific Committee on Food, 2002).

Les HAPs peuvent suivre au sein des organismes diverses voies de métabolisation, qui sont à l'origine de leur génotoxicité et de leur cancérogénicité, comme la formation d'intermédiaires diol époxyde lors de réactions d'oxydation catalysées par les monooxygénases à cytochromes P450. Ainsi pour le B(a)P, le cancérigène ultime le plus réactif est son dérivé -7 α ,8 β -dihydroxy-9 β ,10 β -époxy-7,8,9,10-tétrahydrobenzo(a)pyrène (benzopyrène diol époxyde (BPDE)).

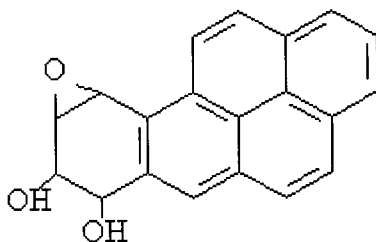
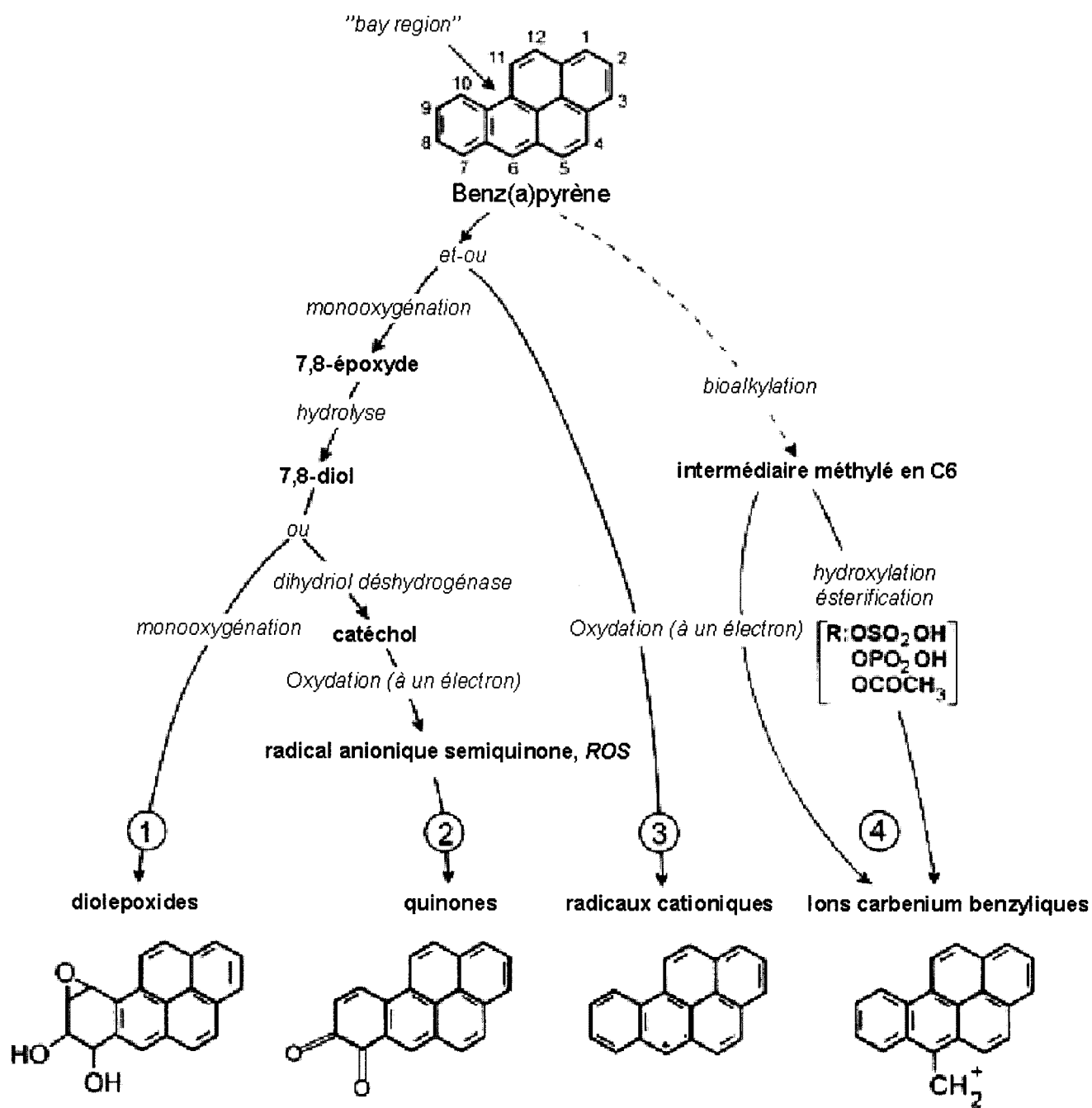


Figure 1 : Formule développée du -7 α ,8 β -dihydroxy-9 β ,10 β -époxy-7,8,9,10-tétrahydrobenzo(a)pyrène

Le B(a)P est métabolisé en une vingtaine de métabolites oxydés et en un grand nombre de composés conjugués. Les principales voies d'activation du B(a)P, qui peuvent conduire à des dommages à l'ADN, sont présentées sur la figure 2 (Canova *et al.*, 1998). La voie majoritaire chez les mammifères (voie 1 sur la figure) est une oxydation réalisée par une monooxygénase à cytochrome P450 et conduit à la formation d'époxydes, de phénols, de diols et de tétrols (Sims *et al.*, 1974). La voie 2 illustre la déshydrogénation des diols qui conduit à la formation de quinones (Penning, 1993), la voie 3 conduit à la formation de radicaux cations, suite à une oxydation à un électron et la voie 4 à la formation de l'ion carbénium benzylique, métabolite nucléophile qui peut se fixer à l'ADN.

La monooxygénation et l'oxydation à un électron sont considérés comme les deux voies majoritaires d'activation métaboliques chez les mammifères pour le B(a)P et les HAPs en général. Il faut noter que chez les moules marines *Mytilus sp.*, la formation de benzo(a)pyrène quinones est une voie importante (Michel *et al.*, 1995 ; Mitchelmore *et al.*, 1998 b).



Dommages à l'ADN

Adduits, dommages oxydatifs, dépurination, coupures

Figure 2 : Voies principales d'activation du benzo(a)pyrène qui peuvent conduire à des dommages à l'ADN *in vivo* (Canova *et al.*, 1998)

ROS : espèces réactives de l'oxygène

I.3. HAPs et stress oxydant

Les dérivés quinoniques des HAPs, par le biais du cycle redox des quinones, entraîneront la formation d'espèces réactives (radical anionique semiquinone et espèces réactives de l'oxygène), responsables dans la cellule d'un stress oxydant.

In vivo, aux conditions physiologiques, un équilibre existe entre la production d'espèces réactives et les défenses antioxydantes. Le déséquilibre de la balance prooxydants-antioxydants en faveur des radicaux libres entraînera un stress oxydant (Sies, 1991). L'oxygène moléculaire (O_2) peut conduire aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) par suite soit d'une activation photodynamique qui produit l'oxygène singulet (1O_2), soit d'une activation réductrice générant l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), puis le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) (figure 3) (Cossu *et al.*, 1997 a).

Les ROS n'ont pas le même potentiel de réactivité. L'oxygène singulet très labile va interagir avec les molécules cellulaires proches de son lieu de formation (Epe, 1993) de même que le radical hydroxyle (Halliwell et Gutteridge, 1984). Le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde sont plus diffusibles et moins réactifs (Cossu *et al.*, 1997 a). Les principaux constituants cellulaires cibles des ROS sont les lipides membranaires, les protéines et les acides nucléiques. Leur formation s'effectue au niveau intracellulaire dans les mitochondries, dans le réticulum endoplasmique, dans les peroxysomes, dans le noyau ainsi que dans le cytoplasme. Dans le milieu extracellulaire, l'autooxydation de l'hémoglobine, des flavines réduites, des quinones et des catécholamines peut générer également des espèces réactives de l'oxygène (Kehrer, 1993).

De nombreux composés peuvent induire, soit directement, soit indirectement un stress oxydant : certains métaux, les dérivés quinoniques, les composés nitroaromatiques, le lindane, les polychlorobiphényles, les HAPs... (Cossu *et al.*, 1997 a ; Charissou, 2002). La cellule dispose d'un ensemble de systèmes de protection pour limiter l'action toxique de ces espèces réactives.

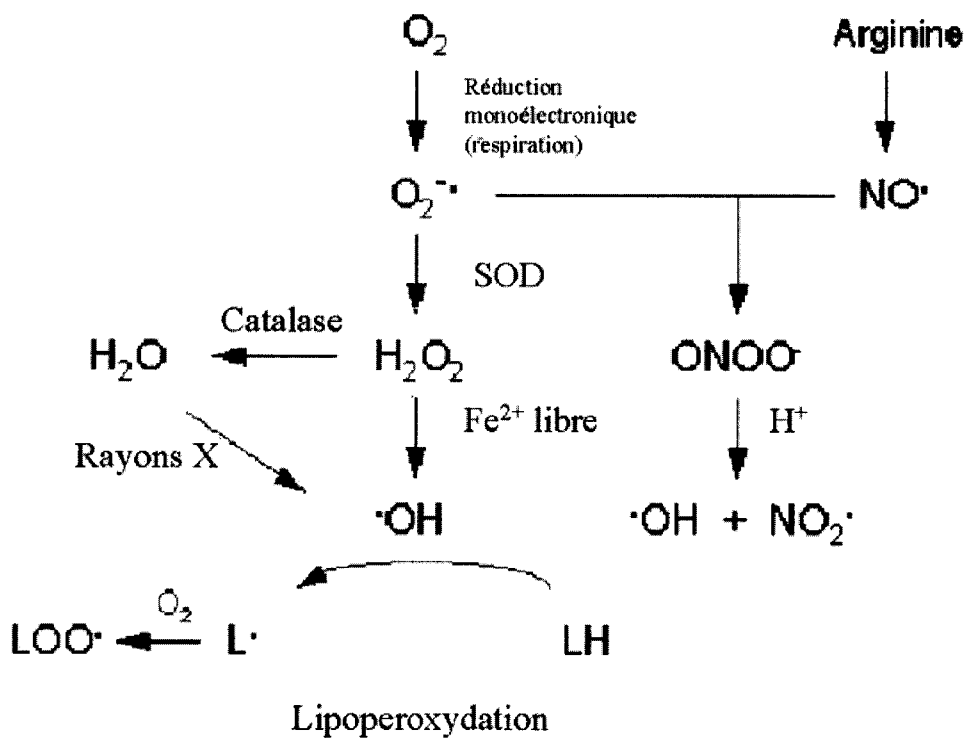


Figure 3 : Réductions de la molécule de dioxygène et formation des espèces réactives de l'oxygène (anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$)) (d'après Stahl et Sies, 2002)

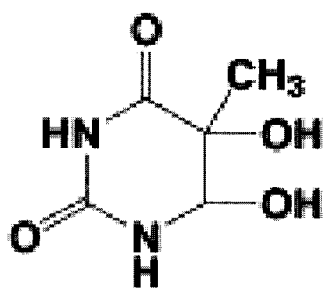
SOD : superoxyde dismutase
LH : acides gras polyinsaturés

La distribution des systèmes de défense selon les tissus est très inégale. On pourra distinguer trois types de systèmes de protection, préventifs ou curatifs contre les attaques radicalaires :

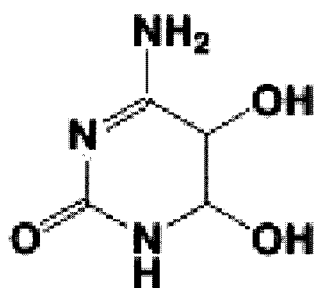
- des systèmes enzymatiques qui limitent la génération des ROS (les superoxyde dismutases, les glutathion peroxydases selenium-dépendante et selenium-indépendante, et la catalase) (Mc Cord et Fridovich, 1969 ; Flohe *et al.*, 1973 ; Lawrence et Burk, 1976 ; Cossu *et al.*, 1997 a),
- des molécules antioxydantes, qui piègent les radicaux libres et regroupent de nombreux composés alimentaires comme les polyphénols, les caroténoïdes et les lycopes (Griffiths *et al.*, 2002) ainsi que certains composés endogènes comme la mélatonine (Reiter, 1996), le glutathion réduit (Deneke et Fanburg, 1989), la vitamine C (Drake *et al.*, 1996), l' α -tocophérol (Dmitriev et Ivanova, 1994) et l'ubiquinol Q₁₀ (coenzyme Q₁₀) (Witting *et al.*, 1998),
- et des mécanismes de réparation pour les dommages induits par les radicaux libres au niveau de l'ADN, des protéines ou des lipides (Griffiths *et al.*, 2002 ; Wallace, 2002).

L'ADN nucléaire et mitochondrial sont des cibles importantes d'attaques radicalaires et les principaux dommages oxydatifs à l'ADN consécutifs à un stress oxydant sont les suivants (figure 4) :

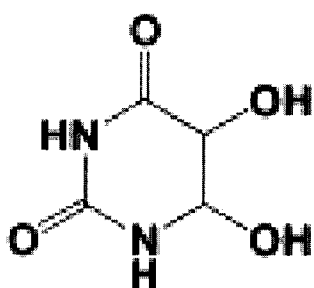
- la thymine glycol, modification de la thymine la plus commune, formée suite à l'exposition à des agents oxydants comme le peroxyde d'hydrogène, le permanganate de potassium ou les radiations ionisantes (Breimer et Lindhal, 1985 ; Wallace, 2002),
- la cytosine glycol, suite à l'attaque de la cytosine par le radical hydroxyle. Ce produit instable se désamine rapidement en uracile glycol ou se déshydrate pour former la 5-hydroxycytosine (Von Sonntag, 1987).
- La 8-oxoguanine, produit majoritaire consécutif à une attaque radicalaire de la guanine (Dizdaroglu *et al.*, 1991),
- et la 8-oxoadénine, produit de l'oxydation en C8 de l'adénine (Halliwell et Dizdaroglu, 1992).



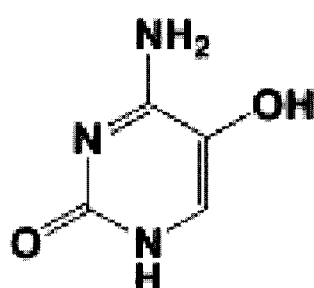
Thymine glycol



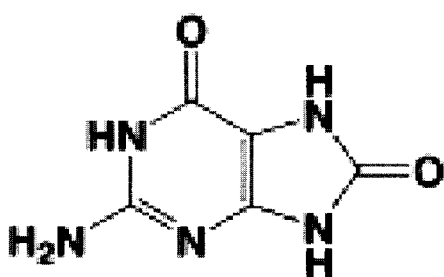
Cytosine glycol



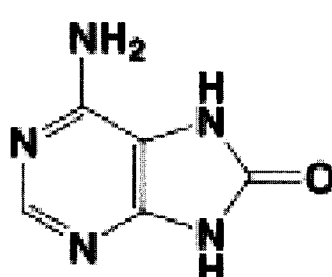
Uracile glycol



5-hydroxycytosine



8-oxoguanine



8-oxoadénine

Figure 4 : Principaux produits d'oxydation des pyrimidines et des purines, consécutifs à un stress oxydant

II. Les dommages à l'ADN

Le développement des études écotoxicologiques, ces dernières années, résulte de la nécessité de la détection des effets toxiques et génotoxiques des polluants. Et ce, en terme de gestion de la qualité des milieux naturels, de prévention de l'altération des populations exposées et de l'intérêt de préservation à long terme des espèces vivantes, des écosystèmes et de l'homme.

De nombreuses substances polluent les écosystèmes aquatiques, qu'ils soient marins ou dulçaquicoles. En effet, ce compartiment se trouve être le réceptacle de nombreux rejets urbains, industriels, domestiques ou agricoles sans oublier les apports atmosphériques par le biais des précipitations ou du ruissellement par exemple, ou les accidents de pollution. On évalue à 5 % la part des composés génotoxiques sur la globalité des polluants anthropogéniques émis dans les écosystèmes (Rajaguru *et al.*, 2001) et il est établi que le milieu aquatique est contaminé par des agents génotoxiques de manière non négligeable (Black *et al.*, 1996). La fragilité de ces milieux est plus qu'évidente : les accidents de pollution, la désertion des eaux contaminées et les mortalités élevées des organismes aquatiques, la fréquence croissante de malformations et de tumeurs chez les poissons, peuvent inquiéter et soulignent le besoin au niveau des individus, d'outils prédictifs d'altérations des peuplements.

Cela peut expliquer le développement des biomarqueurs et de multiples méthodes pour évaluer l'impact des polluants chimiques sur les organismes et l'état de santé de l'environnement (figure 5). Les instances gouvernementales et les organisations internationales ont reconnu en effet que l'évaluation du risque environnemental et la définition de seuils de qualité ne pouvaient plus se baser seulement sur des analyses physico-chimiques mais devaient inclure les effets biologiques délétères des contaminants sur les biocénoses et ce, aux différents niveaux d'organisation biologique (Système d'évaluation de la qualité de l'eau, 1997 ; Lagadic *et al.*, 1997, 1998).

La justification des études de génotoxicité environnementale, se trouve dans le rôle universel de la molécule d'ADN, support du patrimoine génétique, et dans le caractère potentiellement transmissible des altérations de l'information génétique. En effet, dans le noyau de toutes les cellules vivantes, végétales ou animales, l'ADN présente une organisation

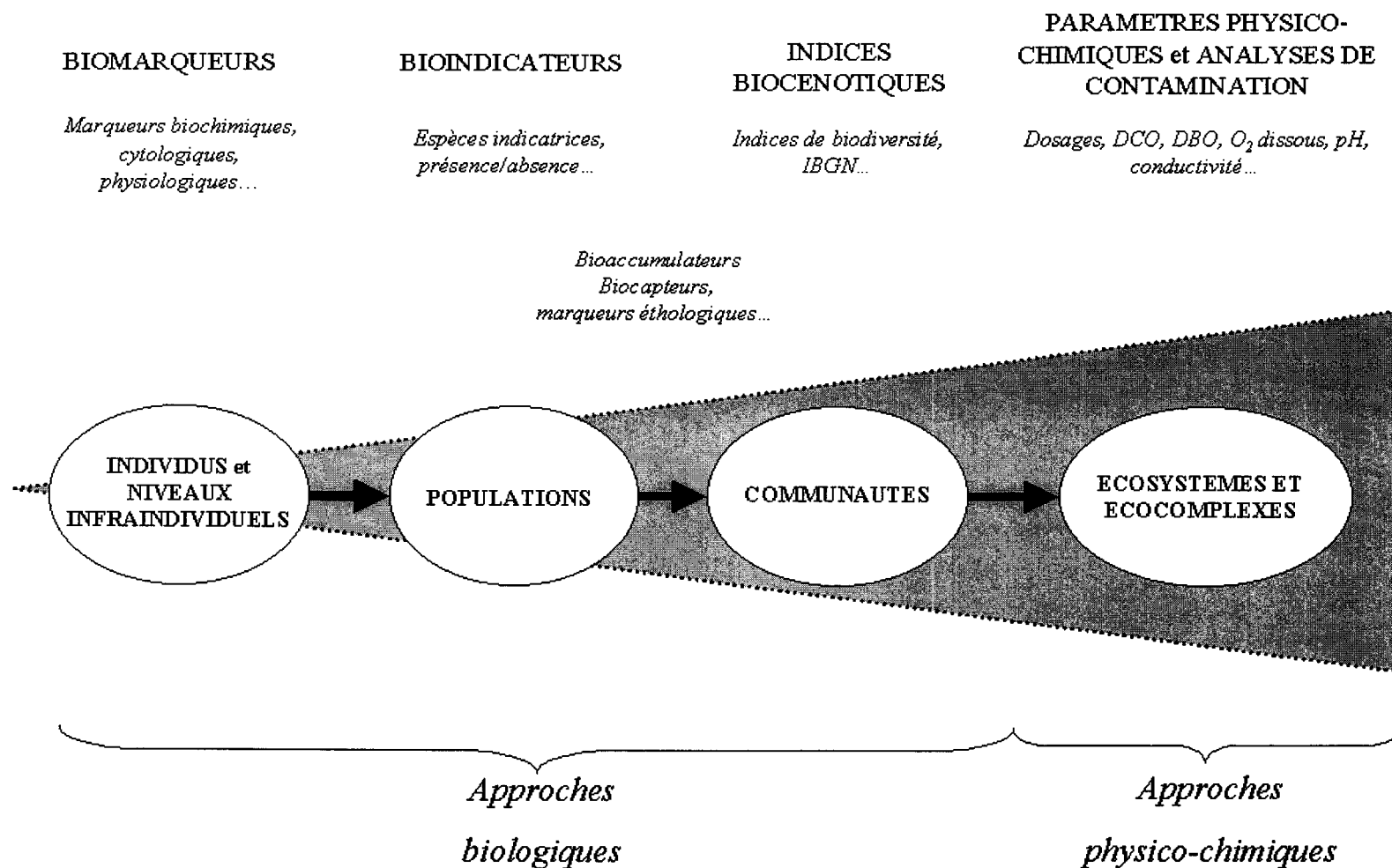


Figure 5 : Types d'approches en surveillance environnementale : paramètres mesurables à différents niveaux d'organisation biologique et dans le biotope (d'après Amiard, 1994)

DCO : demande chimique en oxygène ; DBO : demande biologique en oxygène ; IBGN : Indice biologique global normalisé.

et une structure complexe, qui peuvent être altérées par des agents génotoxiques. La transmissibilité éventuelle d'atteintes à l'information génétique et l'impact possible sur les génomes des populations, représentent des préoccupations essentielles aux écotoxicologistes.

Les dommages à l'ADN peuvent être générés directement ou indirectement par l'exposition aux agents chimiques et physiques de l'environnement (radiations UV, radiations ionisantes, contaminants chimiques...) (Samson, 1992). Des dommages endogènes, existent également, mais à un degré moindre, du fait d'erreurs de la réplication (Rajski *et al.*, 2000), des mécanismes de réparation (Speit et Hartmann, 1995), d'instabilités en conditions physiologiques de certaines liaisons, de l'accumulation ou de la production de métabolites et d'intermédiaires métaboliques cellulaires réactifs, et de la génération au niveau des mitochondries et du réticulum endoplasmique d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Lindahl et Nyberg, 1972 ; Eastman et Barry, 1992).

Les conséquences biologiques des lésions à l'ADN sont les suivantes (figure 6) :

- elles peuvent induire la mort cellulaire,
- les mécanismes de réparation de l'ADN peuvent restaurer la structure de l'ADN endommagé,
- une mutation peut apparaître ou persister à l'issue des processus de réparation inopérants ou défaillants.

Les dommages à l'ADN représentent la cause majeure d'apparition des mutations au sein des génomes cellulaires (Moustacchi, 2000). On admet aujourd'hui que ces mutations participent à l'initiation de la cancérogenèse chez les vertébrés, à l'apparition de *genotoxic disease syndrome* chez les invertébrés, à l'embryotoxicité et à la tératogenèse (Kurelec, 1993 ; Nacci *et al.*, 1996 ; Depledge, 1998 ; Moustacchi, 2000). Les dysfonctionnements au cours de divisions cellulaires (perte/gain d'un chromosome (aneuploïdie), perte/gain d'un lot de chromosomes (haplo/polyploïdie)) y participent au même titre (Depledge, 1998 ; Griffiths *et al.*, 2002).

Dans le cas d'un agent génotoxique, l'exposition peut se traduire par différentes modalités consécutives (figure 7) : induction de dommages à l'ADN et des mécanismes de réparation du génome, mutation génique, altération chromosomique, mort cellulaire,

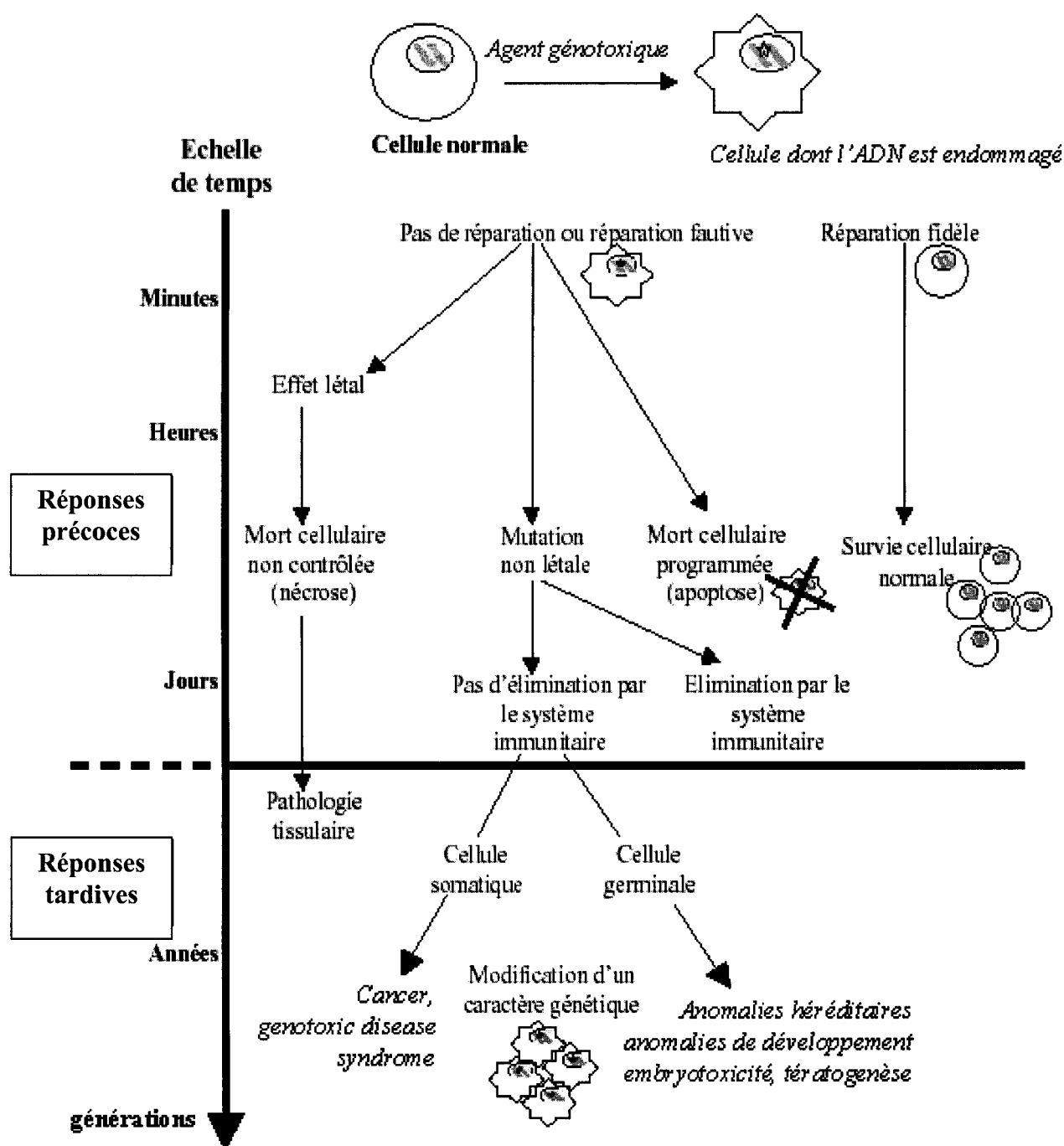


Figure 6 : Représentation schématique des conséquences cellulaires éventuelles de l'exposition à un agent génotoxique (d'après Frelon, 2001)

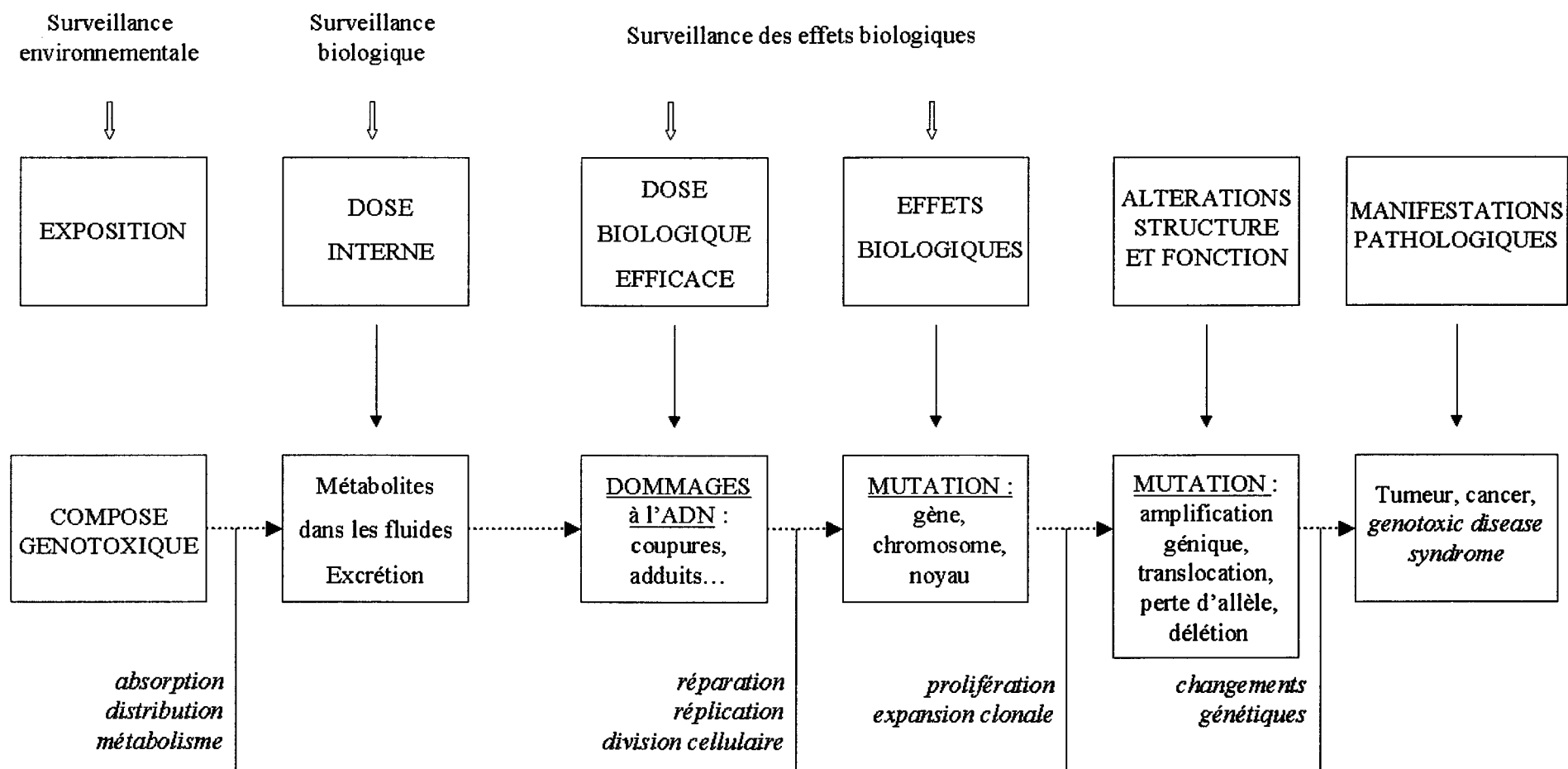


Figure 7 : Niveaux d'études de génotoxicité environnementale : de l'exposition à un agent génotoxique aux effets biologiques somatiques ultimes (adapté de Van Delft *et al.*, 1998)

processus de tumorigénèse, nécrose, incapacité à la reproduction, susceptibilité aux maladies, létalité, voire atteinte des populations. Ces modifications pourront être observées aux niveaux moléculaire, cellulaire, tissulaire ou de l'organisme, voire des peuplements (Kurelec, 1993 ; Nunn *et al.*, 1996).

Les dommages à l'ADN, se situent en amont des mutations géniques et chromosomiques et restent susceptibles d'être pris en charge par les mécanismes de réparation (Léonard, 1990 ; Friedberg, 1995 b ; Moustacchi, 2000). Si l'occurrence de ces dommages à l'ADN est considérée plutôt comme un marqueur d'exposition en écotoxicologie (Shugart, 1990), leurs implications dans la mutagenèse pourrait permettre de les considérer comme un marqueur d'effets toxiques (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003).

Pour des applications en surveillance de génotoxicité environnementale, des outils de diagnostic, rapides, peu coûteux, précis et reproductibles étaient nécessaires. Belpaeme *et al.* constataient en 1998, qu'aucun marqueur de génotoxicité ne remplissait l'ensemble de ces conditions. Certains essais, comme le test d'échange de chromatides-sœurs, sont des techniques longues à mettre en œuvre. D'autres, telles la recherche d'adduits à la molécule d'ADN ou l'élution alcaline, restent encore onéreux ; les techniques cytogénétiques - recherche d'aberrations chromosomiques, test des micronoyaux- sont parfois controversées. Les auteurs se sont alors intéressés à une technique plus récente, le test des comètes (encore appelé *Comet assay* ou *single-cell gel electrophoresis assay*), bien connu aujourd'hui pour ses nombreux avantages (Singh *et al.*, 1988, McKelvey-Martin *et al.*, 1993 ; Fairbairn *et al.*, 1995 a ; Collins *et al.*, 1997 ; Rojas *et al.*, 1999). Cette technique permet la mesure du degré de dommages à l'ADN au sein d'une population cellulaire nucléée. Ses applications dans divers domaines, de la recherche médicale à l'écotoxicologie, sont très nombreuses.

On classe généralement les dommages à l'ADN selon leur nature chimique ou leur localisation sur la molécule d'ADN. Sur un segment donné de cette molécule, la fréquence et la nature des lésions consécutives à un agent génotoxique, dépend à la fois de la nature chimique de cet agent, de sa réactivité, mais aussi de la séquence nucléotidique affectée par cet agent (Friedberg, 1995 a).

Les types majeurs de lésions à l'ADN, d'origines endogènes ou exogènes, qui peuvent se produire au niveau moléculaire, sont les suivants (figure 8) :

- les sites abasiques (sites AP), apuriniques ou apyrimidiniques, sur la molécule d'ADN peuvent être induits ou spontanés. Ils constituent un type commun de dommages à l'ADN (Friedberg, 1985 ; Matsumoto *et al.*, 1994), au caractère promutagène et peuvent bloquer la réplication (Schaaper *et al.*, 1982, 1983 ; Loeb et Preston, 1986). L'instabilité de la liaison glycosylique (base-désoxyribose), aux conditions physiologiques, constitue la cause principale de création des sites AP (von Sonntag, 1987 ; Evans et Cooke, 2004). On estime à plusieurs milliers de bases puriques et plusieurs centaines de bases pyrimidiques, les pertes, par ces phénomènes, au sein d'un noyau de cellule, chez un mammifère (Lindahl et Nyberg, 1972). Ainsi l'ADN cellulaire subirait des pertes de bases puriques estimées entre 250 et 500 par heure (Lindahl et Karlström, 1973). Sinon, ces sites AP peuvent être générés lors des processus de réparation par excision de base et par les radicaux libres, endogènes ou consécutifs à un stress oxydant (Memisoglu et Samson, 2000 ; Evans et Cooke, 2004).
- Les modifications de bases consistent en des modifications chimiques et se révèlent souvent promutagènes (Léonard, 1990 ; Samson, 1992 ; Aqualina, 1994 ; Moustacchi, 2000). Les plus courantes comprennent :
 - des alkylations, par addition de groupements méthyls ou alkyls (Aqualina, 1994 ; Bouziane *et al.*, 1998 ; Ehrlich, 2002),
 - des désaminations par perte des groupements $-NH_2$, qui peuvent être instables, notamment après méthylation de la cytosine, et qui conduisent à des mésappariements (Aqualina, 1994 ; Lutsenko et Bhagwat, 1999),
 - des hydroxylations et des oxydations par les ROS et les radiations ionisantes par exemple (von Sonntag, 1987 ; Memisoglu et Samson, 2000),
 - la formation de dimères, principalement les dimères de pyrimidines, consécutifs aux rayonnements UV et qui provoquent des distorsions dans la structure hélicoïdale de l'ADN (Léonard, 1990 ; Friedberg, 1995 b),
 - la formation de pontages entre les 2 brins ou sur le même brin (McHugh *et al.*, 2001) ou entre un brin et une protéine, suite notamment à l'exposition aux UV (Moss *et al.*, 1997).

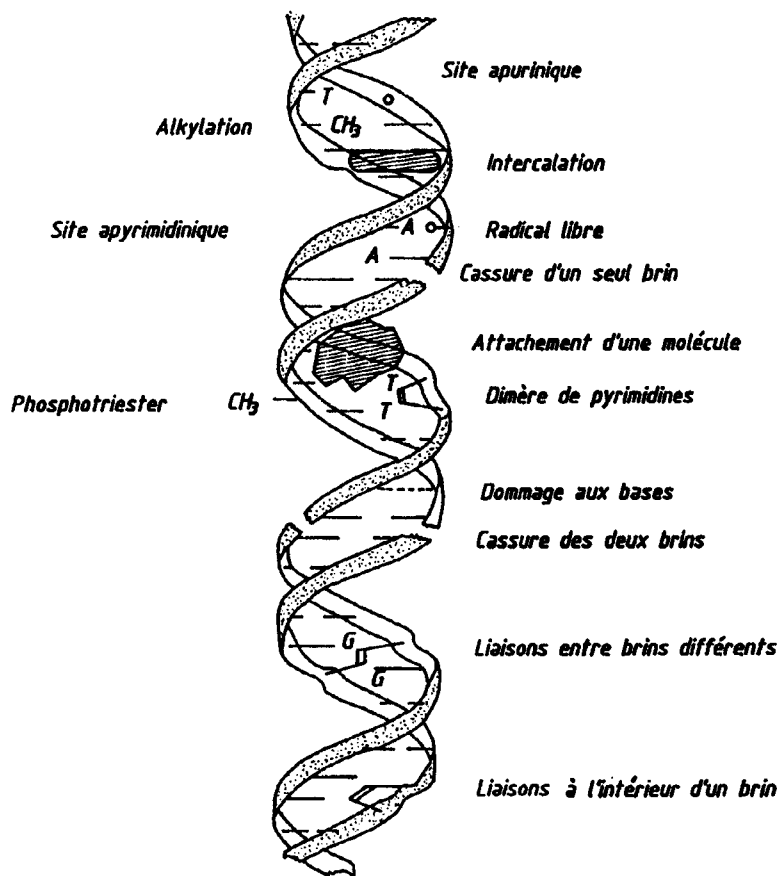


Figure 8 : Principales lésions à l'ADN induites par l'exposition à des agents génotoxiques (d'après Léonard, 1990)

- Les adduits à l'ADN sont constitués de nucléotides sur lesquels se sont fixés de manière covalente les mutagènes chimiques (Swenberg *et al.*, 1995 ; de Kok *et al.*, 2002). La propriété commune aux molécules susceptibles de former des adduits à l'ADN, est leur caractère électrophile. Les sites électrophiles (déficience d'un ou plusieurs électrons) se lient avec les sites nucléophiles, rencontrés au niveau des protéines et de l'ADN, pour former des liaisons covalentes, qui conduisent à la formation d'adduits. Les sites nucléophiles de l'ADN, sont principalement les noyaux puriques et pyrimidiques et les liaisons phosphates (Swenberg *et al.*, 1995 ; de Kok *et al.*, 2002 ; Esaka *et al.*, 2003 ; Marnett, 2003 ; Farmer, 2004). Ainsi, il existe 17 sites potentiels (figure 9) de formation d'adduits au niveau des bases (La et Swenberg, 1996 ; Esaka *et al.*, 2003). Les adduits peuvent provoquer tout comme les dimères de pyrimidines des distorsions de la conformation de la molécule d'ADN et bloquer la réplication et la transcription (Léonard, 1990). Leur participation à la mutagenèse et à l'initiation de la cancérogenèse est indiscutée aujourd'hui (Lutz, 1979 ; Kriek *et al.*, 1998 ; Otteneder et Lutz, 1999 ; de Kok *et al.*, 2002 ; Farmer, 2004).

- Les coupures simple- et double-brin : peu d'agents induisent des cassures franches à l'ADN. Les plus connues sont les radiations ionisantes (Léonard, 1990). Par le biais du métabolisme de certains composés exogènes, voire endogènes, des coupures simple- et double-brin peuvent être induites du fait de la production d'espèces radicalaires (Eastman et Barry, 1992 ; Moller et Wallin, 1998).

Si la plupart des dommages à l'ADN n'apparaissent pas sous forme de coupures mais plutôt de modifications des bases ou des groupements phosphates, les cassures de brins à l'ADN peuvent résulter de l'intervention des mécanismes de réparation de ces dommages : activités des ADN glycosylases, des endonucléases... (Eastman et Barry, 1992 ; Speit et Hartmann, 1995 ; Collins *et al.*, 1997).

En conditions alcalines, certaines lésions à l'ADN se traduiront par des coupures de brins (Ahnström, 1988 ; Olive, 1990). Ces sites, qualifiés d'alcali labiles, comprennent notamment les sites AP, certains adduits, la thymine glycol (5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine), la 5,6-dihydrothymine, des photoproduits comme la pyrimidine(6-4)pyrimidone (figure 10) et certaines lésions induites par la bléomycine (Horvathova *et al.*, 1998 ; Aso *et al.*, 1999 ; Higurashi *et al.*, 2003).

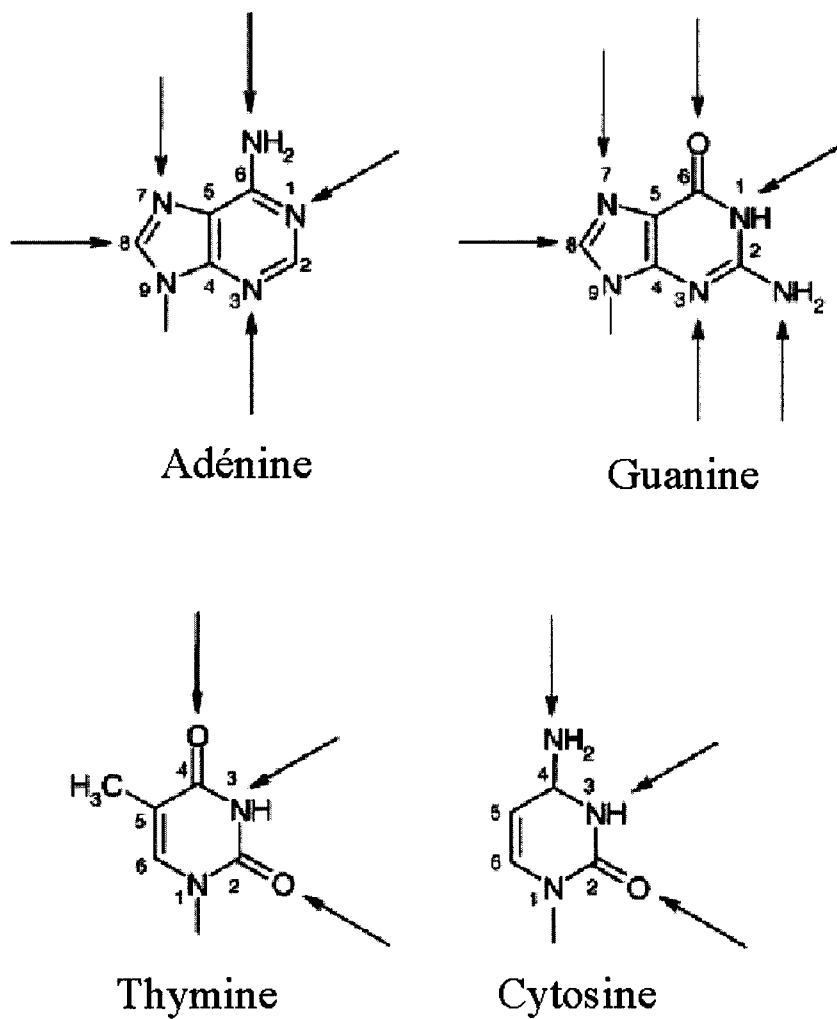


Figure 9 : Sites potentiels de formation d'adduits sur les bases de l'ADN (Esaka *et al.*, 2003)

Les coupures de brins peuvent également être consécutives à l'intercalation d'un xénobiotique, aux adduits et aux dimères de pyrimidines, qui bloquent la fourchette de réplication (Léonard, 1990) ou à l'activation de certaines enzymes telles que les topoisomérases, les nucléases et les hydrolases lysosomales (Eastman et Barry, 1992 ; Horvathova *et al.*, 1998). Différentes origines des cassures simple- et double-brin sont représentées sur la figure 11. Les conséquences éventuelles des coupures double-brin de l'ADN sont des effets clastogènes, et la formation possible de micronoyaux intracytoplasmiques (Edwards *et al.*, 1994, Van Goethem *et al.*, 1997 ; Klobucar *et al.*, 2003).

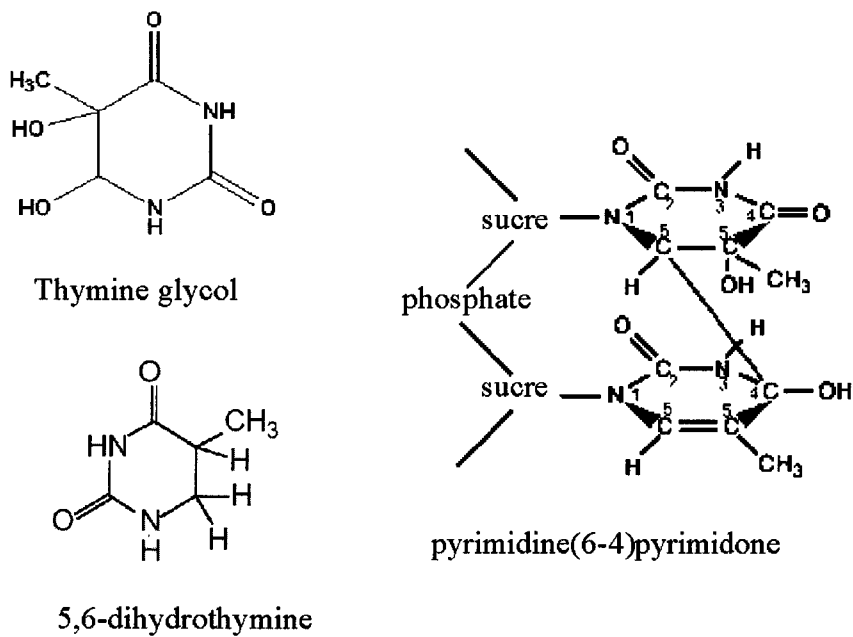


Figure 10 : Structures chimiques de la thymine glycol (5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine), de la 5,6-dihydrothymine et du photoproduit pyrimidine(6-4)pyrimidone

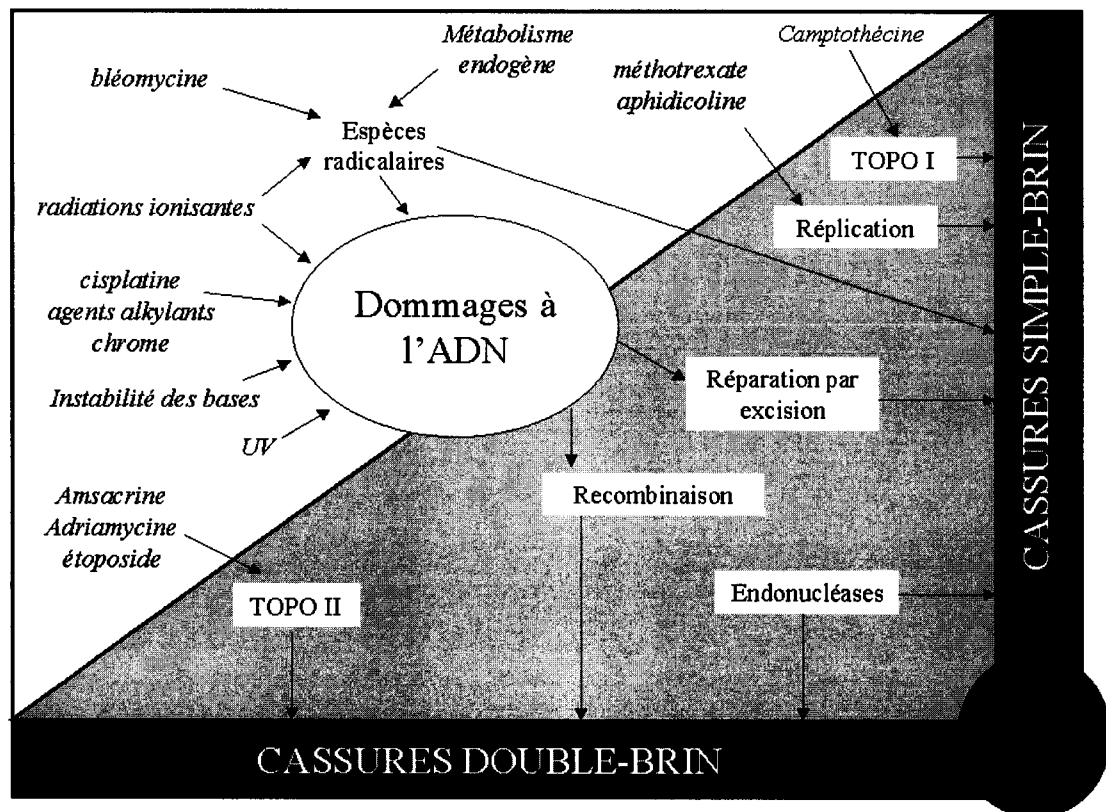


Figure 11 : Principales origines des cassures à l'ADN (d'après Eastman et Barry, 1992)
 La partie en blanc illustre des facteurs et des agents, exogènes et endogènes à l'origine des lésions à l'ADN. La partie sur fond gris décrit les processus cellulaires influencés par ces lésions et la formation des coupures à l'ADN.
 TOPO I et II : topoisomérases I et II.

III. Techniques d'études des dommages à l'ADN

Historiquement, c'est une technique basée sur la vitesse de sédimentation de molécules d'ADN radiomarquées sur gradient de sucrose en conditions alcalines (*velocity sedimentation* ; Burgi et Hershey, 1963) qui fut utilisée pour l'étude des dommages à l'ADN (Ahnström, 1988), et ce depuis les travaux de Davidson *et al.* (1964) qui avaient montré son aptitude à détecter les cassures de brins et ceux de McGrath et Williams (1966), qui avaient développé des conditions alcalines pour l'essai.

La recherche de coupures à l'ADN préside en général, à l'étude des dommages à l'ADN (Ahnström, 1988) car de nombreux dommages à l'ADN peuvent être convertis en coupures, soit par l'intervention incomplète des systèmes de réparation par excision-resynthèse, soit en utilisant des conditions d'essai alcalines pour l'expression des sites alcali labiles. Certains types de dommages pourront être détectés par des techniques spécifiques. C'est le cas notamment des sites AP, des dommages oxydatifs à l'ADN ou des adduits (Kubo *et al.*, 1992 ; Walker, 1995 ; Cadet *et al.*, 1999 ; Griffiths *et al.*, 2002 ; Evans et Cooke, 2004).

Différentes techniques de détection des cassures à l'ADN ont été développées ensuite et ont été parfois mises en œuvre en écotoxicologie, pour l'étude directe des dommages à l'ADN, suite à des expositions *in situ* ou *in vivo*. Beaucoup de protocoles pour l'étude des dommages à l'ADN, utilisaient initialement des mesures de radioactivités spécifiques nécessitant une incubation des cellules en présence [³H] thymidine préalablement, remplacées depuis par des alternatives fluorimétriques, en utilisant des colorants comme le Hoechst 33258[®] (Waldmann *et al.*, 1995 ; Bolognesi *et al.*, 1996, 1999) ou le Hoechst 33342[®] (Gagné *et al.*, 1995). Les principales techniques, dont les caractéristiques sont rapportées dans le tableau II, sont :

- l'élution alcaline (Kohn et Grimeg-Ewig, 1973) basée sur l'élution de l'ADN sur une membrane filtrante après lyse des cellules à pH alcalin. Le taux d'élution augmente avec le nombre de coupures simple-brin et de sites alcali labiles, et les molécules d'ADN double-brin sont retenues sur le filtre. Le degré de dommages est exprimé par une valeur F, facteur de scission des brins basé sur la cinétique

TECHNIQUES	Commentaires	Références
Techniques de sédimentation sur gradient de sucrose	- premières techniques d'études - mesures de radioactivité et préincubation nécessaire des cellules - temps de centrifugation importants - sensibilité limitée : alcalilabilité réduite des dommages dans les nucléoïdes	Burgi et Hershey, 1963 Cook et Brazell, 1978
Elution alcaline	- mesures de radioactivité sur les fractions d'élution (standard interne et double marquage) et préincubation nécessaire des cellules - mesures en fluorimétrie possibles - Seuil de sensibilité : 1 cassure par chromosome ou 0,1 cassures /10¹¹ Da - protocole modifié avec des endonucléases pour la détection de dommages spécifiques	Kohn et Grimeg-Ewig, 1973
Essai de précipitation alcaline	- mesures de radioactivité et préincubation nécessaire des cellules - mesures en fluorimétrie possibles - Seuil de sensibilité : similaire à l'élution alcaline	Olive, 1988
Essai de translation des coupures	- mesures de radioactivité, en fluorimétrie, ou en cytométrie de flux - sensibilité limitée : pas d'expression des sites alcali labiles - utilisation principale en biologie moléculaire pour la création de sondes radiomarquées	Snyder et Matheson, 1985
Essai de déroulement alcalin	- mesures de radioactivité (standard interne et double marquage) et préincubation nécessaire des cellules - mesures en fluorimétrie (FADU) - Limite de détection : 0,1 cassures /10¹¹ Da	Ahnström et Edwardsson, 1974 Birnbom et Jevcak, 1981
Test des comètes	- sensibilité : 0,1 à 1 cassures pour 109 Da - microscopie à fluorescence - approche cellule par cellule	Singh <i>et al.</i> , 1988
Electrophorèse en gel d'agarose d'ADN Electrophorèse en champs pulsé	- Sensibilité limitée : pas d'expression des sites alcali labiles aux conditions de pH utilisé - Ratio coupures simple-brin / double-brin en conduisant l'essai à pH 12 et à pH 7 respectivement - mauvaise séparation pour les faibles niveaux de dommages	Maniatis <i>et al.</i> , 1982 Schwartz et Cantor, 1984
FAST Micromethod ®	- technique en microplaque par fluorimétrie - traitement rapide de nombreux échantillons - pas de fluorochrome intercalant comme le BeT - rapidité de l'essai (2h) - Seuil de sensibilité : rapporté similaire au test des comètes (limité pourtant aux cassures simple-brin et aux sites alcali labiles)	Müller <i>et al.</i> , 1998 Batel <i>et al.</i> , 1999

Tableau II : Principales techniques d'étude des cassures à l'ADN

FADU : essai fluorimétrique de déroulement de l'ADN ; BeT : bromure d'éthidium

d'élution ou par le ratio ADN retenu sur le filtre / ADN total ou encore le taux d'ADN libre.

- L'essai de précipitation alcaline (Olive, 1988) utilisant la précipitation de l'ADN en conditions alcalines en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS) et de chlorure de potassium (KCl) à 4° C. Des dommages à l'ADN entraînent la présence de fragments qui ne précipiteront pas, même après centrifugation. Le niveau des dommages à l'ADN est alors exprimé par le ratio ADN culot / ADN total ou par le taux d'ADN libre.
- L'essai de translation des coupures (Snyder et Matheson, 1985) dont le principe se base sur l'incorporation de nucléotides marqués au niveau des cassures simple-brin de la molécule d'ADN par l'ADN polymérase I.
- L'essai de déroulement alcalin (Ahnström et Edwardsson, 1974 ; Birnboim et Jevcak, 1981) qui consiste en l'observation de la séparation des brins d'ADN en conditions alcalines, due à la rupture des liaisons hydrogène. La vitesse de déroulement est dépendante de la longueur des brins appariés et les niveaux de dommages à l'ADN sont exprimés par des valeurs F (facteurs de scission des brins basés sur la cinétique de déroulement).
- Le test des comètes (Singh *et al.*, 1988) dont le principe repose sur la microélectrophorèse de noyaux de cellules isolées, en conditions alcalines, en gel d'agarose sur lames de microscope.
- Les techniques d'électrophorèse basées sur la migration de fragments de molécules d'ADN tissulaires après extraction, en gel d'agarose selon leurs tailles et la comparaison à des témoins de migration (Maniatis *et al.*, 1982 ; Schwartz et Cantor, 1984).

Les techniques de l'élution alcaline, de l'essai de déroulement de l'ADN et du test des comètes ont rencontré un franc succès et ont pris le relais des techniques de sédimentation. Elles furent utilisées en premier lieu chez les mammifères. Pour le protocole du test des

comètes, il faut reconnaître que Singh *et al.* (1988) et auparavant Östling et Johanson (1984) se sont inspirés de techniques préexistantes pour l'étude de l'ADN et des dommages à cette molécule, comme la sédimentation des nucléoïdes (Cook et Brazell, 1978) et des techniques d'électrophorèse en gel d'agarose (Maniatis *et al.*, 1982 ; Schwartz et Cantor, 1984).

Une technique récente, la *FAST Micromethod*[®], technique miniaturisée en microplaque, est basée sur l'observation de la dénaturation de l'ADN, plus ou moins rapide selon la présence de dommages. L'établissement d'un complexe très stable entre l'ADN double-brin et le fluorochrome PicoGreen[®], en conditions fortement alcalines permet de suivre la cinétique de dénaturation de l'ADN double-brin et de calculer le facteur de scission des brins. Cet essai permet l'analyse simultanée de plusieurs échantillons et devrait connaître un succès grandissant dans ces applications en milieu environnemental (Müller *et al.*, 1998 ; Batel *et al.*, 1999). Bihari *et al.* (2002) ont observé une sensibilité équivalente de cet essai comparativement à celle du test des comètes lors de l'exposition de cellules HeLa aux UVC, aux rayonnements γ et à la 4-nitroquinoline-*N*-oxide (4-NQO), avec un coefficient de variation moins élevé (27 % contre 53 % pour le test des comètes) lors de l'exposition à la 4-NQO.

Les seuils de sensibilité sont un point important à développer. Ils ne sont pas exprimés de manière homogène dans la littérature (Ahnström, 1988 ; Griffiths *et al.*, 2002). Pour les différentes techniques de mesure des dommages à l'ADN, ils ne sont généralement pas exprimés en terme de nombre minimal de dommages observés, mais plutôt en terme de plus faible dose d'agent génotoxique utilisée pour laquelle un effet est détecté (Ahnström, 1988). Dans le cas des rayonnements X, le taux de cassures consécutives à une exposition donnée, peut être connu : par exemple on évalue les effets d'une dose de 400 rads à 4000 cassures et sites alcali labiles au sein de l'ADN nucléaire de lymphocytes irradiés (Singh *et al.*, 1989, 1991 b) et ceci pourrait permettre de calibrer les différentes méthodes (Ahnström, 1988).

III.1. Le Test des comètes

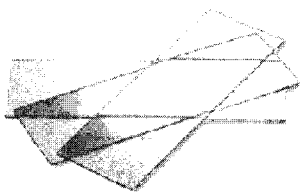
Cette technique d'électrophorèse, de noyaux de cellules isolées en gel d'agarose, sur lames de microscope, en conditions alcalines, rencontre un intérêt certain à l'heure actuelle car elle permet la mesure du degré de dommages à l'ADN au sein d'une population cellulaire et non au niveau tissulaire comme la plupart des autres techniques d'étude des dommages à l'ADN.

III.1.A. Historique et évolutions

L'idée originale de ce test revient à Rydberg et Johanson en 1978. Ce furent les premiers à quantifier les dommages à l'ADN dans des cellules isolées de mammifères incluses dans de l'agarose sur lame de microscope. Après lyse de ces cellules en conditions alcalines, permettant le déroulement partiel de la chromatine, et marquage à l'acridine orange, la mesure du rapport fluorescence verte / fluorescence rouge, traduisant le rapport entre les molécules d'ADN double-brin et simple-brin, apportait une information sur l'intégrité du génome et la mesure du degré de dommages à l'ADN. Plus tard, Östling et Johanson (1984) apportèrent quelques modifications et donnèrent à l'essai son nom de test des comètes. Ils ajoutèrent au protocole une brève étape d'électrophorèse en conditions neutres et optèrent pour une coloration au bromure d'éthidium. Mais cette technique ne permettait que la détection des cassures double-brin.

Il fallut attendre l'introduction d'une électrophorèse en conditions alcalines par Singh *et al.* (1988) pour pouvoir détecter les cassures simple-brin ainsi que les sites alcali-labiles. Cette version du test des comètes a remporté depuis un vif succès et ses applications se sont répandues à de nombreux types cellulaires. Les différentes étapes du protocole expérimental sont illustrées sur la figure 12 ci-contre. Après exposition, *in vivo* ou *in vitro*, les cellules eucaryotes sont emprisonnées dans un gel d'agarose et lysées dans un tampon contenant des détergents et une forte concentration en sels. L'ADN est dénaturé et une courte électrophorèse est réalisée. Après marquage au bromure d'éthidium, l'ADN d'une cellule intacte apparaît comme une sphère (figure 13 a). L'ADN d'une cellule lésée s'étire progressivement vers l'anode proportionnellement au nombre de cassures (figure 13 b). L'évaluation des lésions

DEPOT DES GELS SUR LES LAMES



Premier Gel : Agarose Standard à 0,8 %

Second Gel : mélange Agarose bas point de fusion 1 % + suspension cellulaire (V/V)

Troisième Gel : Agarose bas point de fusion 0,5 %

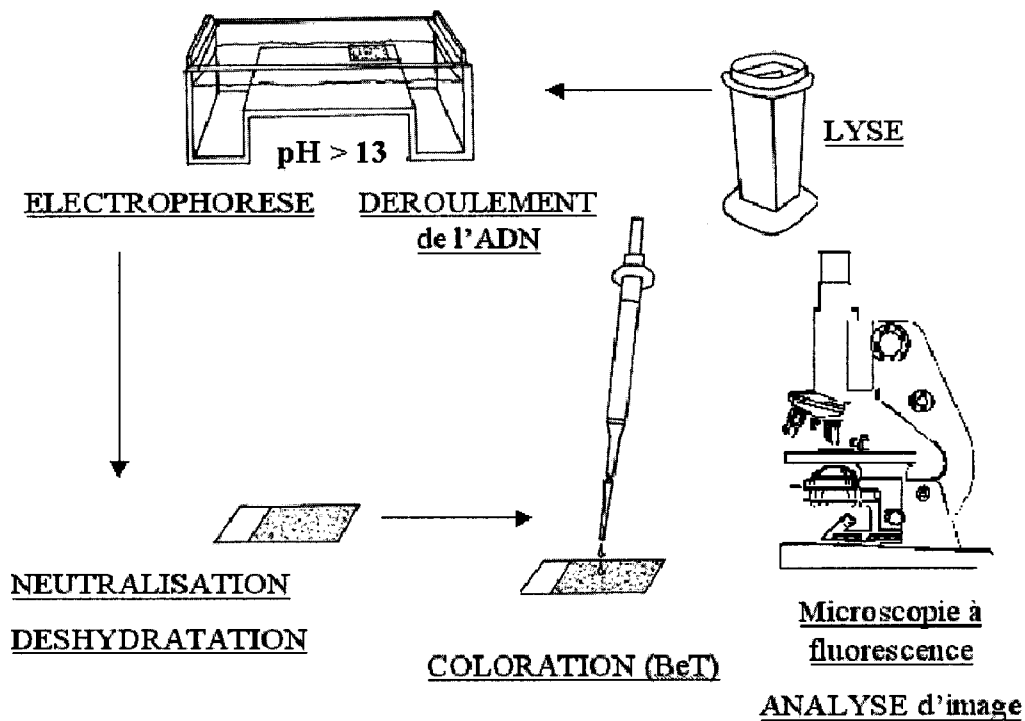


Figure 12 : Principales étapes du test des comètes (d'après Rojas *et al.*, 1999)

BeT : bromure d'éthidium

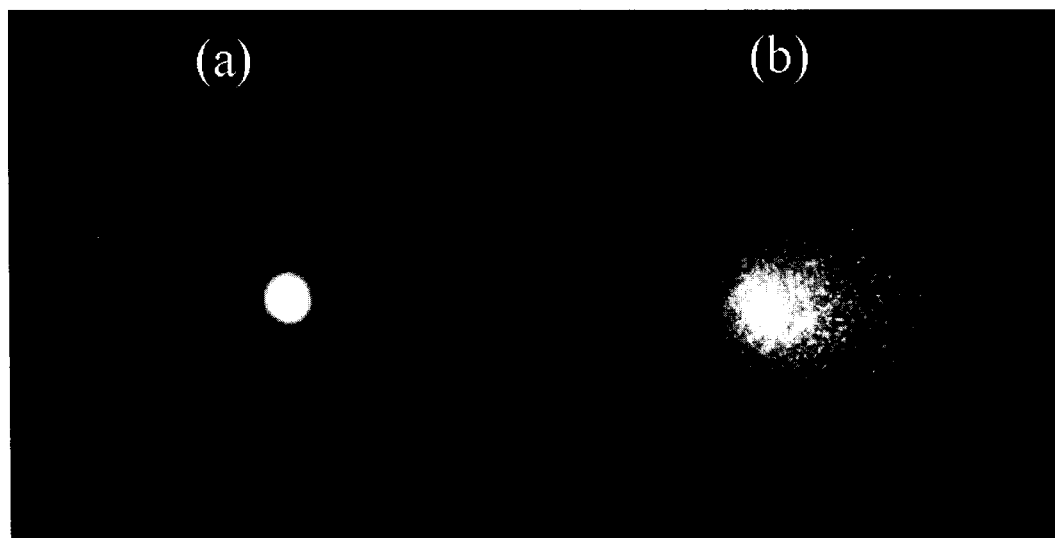


Figure 13 : Exemples d'observations de noyaux par le test des comètes :

(a) noyau intact d'hépatocyte de rat

(b) noyau d'hépatocyte de rat présentant des dommages à l'ADN

peut s'effectuer soit d'une façon semi-quantitative par le classement des comètes selon des types préalablement définis, soit de manière quantitative à l'aide d'un analyseur d'image couplé à un logiciel de traitement.

Plusieurs articles de synthèse font référence à ce test (Mc Kelvey-Martin *et al.*, 1993 ; Fairbairn *et al.*, 1995 a ; Collins *et al.*, 1997 ; Rojas *et al.*, 1999 ; Tice *et al.*, 2000 ; Hartmann *et al.*, 2003) et soulignent les étapes critiques à maîtriser, lors d'applications à différents types cellulaires.

Des versions modifiées du protocole intègrent l'utilisation d'enzymes de réparation, comme l'endonucléase III, la formamidopyrimidine glycosylase (Fpg) ou la nucléase d'excision uvrABC (Collins *et al.*, 1997). Ainsi la Fpg permet la détection des dommages oxydatifs aux purines (Collins *et al.*, 1996 ; Wozniak et Blasiak, 2003) de même que l'endonucléase III, celle des pyrimidines oxydées (Collins *et al.*, 1995 ; Wozniak et Blasiak, 2003) ou la T4 endonucléase V, les dimères de pyrimidines (Woollons *et al.*, 1997) et la nucléase uvrABC, les pontages protéine-ADN (Collins *et al.*, 1997). Certains auteurs couplent l'hybridation *in situ* (FISH) au test des comètes d'où le nom de technique Comet-FISH qui permet la détection de séquences spécifiques au sein du test des comètes (Santos *et al.*, 1997). La mesure de taux de dommages spécifiques à certaines régions du génome est alors possible (Mc Kelvey-Martin *et al.*, 1997). L'essai de diffusion (ou essai *Tear-drop*) permet d'étudier l'apoptose (Olive *et al.*, 1993). L'étape d'électrophorèse est simplement omise par rapport au test des comètes.

III.1.B. Nature des dommages mis en évidence

La conduite des étapes de déroulement de l'ADN et d'électrophorèse à certains pH, dans le test des comètes permet la détection différentielle (Horvathova *et al.*, 1998 ; Menke *et al.*, 2001 ; Wozniak et Blasiak, 2003) :

- des cassures double-brin à $\text{pH} \leq 9,0$
- des cassures simple- et double-brin, du fait de la dénaturation des liaisons hydrogène de la double hélice d'ADN à $\text{pH} \leq 12,1$
- des cassures simple- et double-brin et d'une majorité de sites alcali labiles à $\text{pH} > 13$.

Outre les cassures de brins et les sites alcali labiles, cette technique permet la détection indirecte des lésions telles que les adduits ou les ponts intra-brins, parce qu'ils ralentissent la migration de l'ADN dans le champ électrophorétique (Pföhler et Wolf, 1996 ; Horvathova *et al.*, 1998) ou via l'intervention des systèmes de réparation par excision-resynthèse (Speit et Hartmann, 1995). Théoriquement le test des comètes peut mettre en évidence l'action des radiations, des mutagènes directs, des promutagènes, des agents alkylants, des intercalants et des dommages oxydatifs. En 1998, plus de 212 produits avaient été testés sur différents types cellulaires (Anderson *et al.*, 1998). Cet essai permet également de détecter les processus apoptotiques qui se traduisent par des coupures régulières à chaque nucléosome de l'ADN nucléaire (Olive *et al.*, 1993 ; Steinert, 1996). Dans le cas de l'apoptose, les comètes formées sont alors atypiques et caractéristiques, quelquefois qualifiées de cellules « fantômes » ou cellules « hérissons » (figure 14). Des travaux récents contestent cependant que ces observations correspondent à des cellules apoptotiques (Rundell *et al.*, 2003 ; Meintières *et al.*, 2003).

III.1.C. Avantages et Limites de l'essai

Le test des comètes apparaît aujourd'hui comme une technique privilégiée d'étude des dommages à l'ADN comme l'atteste le nombre croissant de publications qui s'y réfèrent dans la littérature (plus de 150, rien que pour l'année 1998 (Marzin, 1999)), dans les nombreux domaines d'applications de l'étude des dommages à l'ADN (Collins *et al.*, 1997 ; Anderson *et al.*, 1998 ; Rojas *et al.*, 1999). Ce succès actuel, peut être expliqué par ses nombreux avantages, comme sa sensibilité et son approche cellule par cellule et le nombre limité de ses inconvénients (ce test aborde peu les aspects fondamentaux des dommages à l'ADN et nécessite de travailler sur des cellules préalablement dissociées) (tableau III).

Sa sensibilité est intéressante même si plusieurs seuils de sensibilité, pour cet essai, ont pu être avancés dans la littérature. Ces seuils restent plus bas que pour les autres techniques : de 100 cassures à 1000 cassures par noyau (Singh *et al.*, 1991 a ; Collins *et al.*, 1997) ou de 0,1 à 1 cassures pour 10^9 daltons (Gedik *et al.*, 1992 ; Collins *et al.*, 1997). Les concentrations (ou les doses) minimales d'agent génotoxique ou la modalité testée, pour lesquelles un effet est observé, pour différents essais réalisés en parallèle au test des comètes,

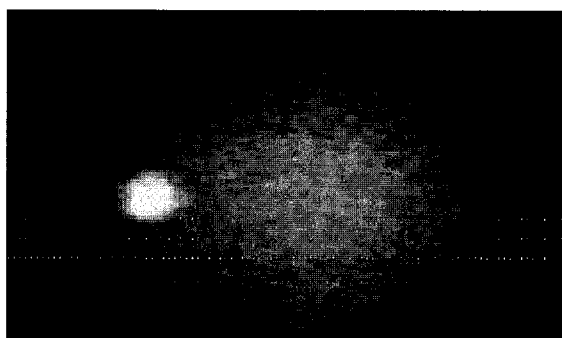


Figure 14 : Exemple d'observation qualifiée de cellule hérisson ou cellule fantôme (noyau d'hémocyte d'*Unio tumidus* exposé *in vitro* au peroxyde d'hydrogène (2500 μ M, 2 heures à 4 ° C))

Principaux avantages	Principaux inconvénients
- Approche cellule par cellule - Applicable à toute cellule nucléée - pas de mise en culture ou en incubation des cellules nécessaire au préalable - Rapide, simple, flexible, pas d'utilisation de produits marqués radioactifs - Nécessite peu de cellules (de 20000 à 50000 cellules) - Très sensible : seuils de sensibilité avancés : • 1000 cassures par noyau soit le taux de dommages induits par une dose de 50 mGrays de rayons X (Singh <i>et al.</i>, 1991 a) • 100 cassures par noyau (Collins <i>et al.</i>, 1997) • 200 cassures par noyau (Rojas <i>et al.</i>, 1999) • 0,1 cassures pour 10⁹ daltons (Gedik <i>et al.</i>, 1992) • 1 cassures pour 10⁹ daltons (Collins <i>et al.</i>, 1997) - Détection des cassures simple- et double-brin et des sites alcali labiles - Détection des effets des radiations, des mutagènes directs, des promutagènes, des agents alkylants, intercalants, des dommages oxydatifs, de l'apoptose (Olive <i>et al.</i>, 1993 ; Steinert, 1996) et des mécanismes de réparation par excision-resynthèse (Speit et Hartmann, 1995)	- Informations sur des cellules isolées - Niveau de bruit de fond généralement élevé chez les organismes exposés <i>in situ</i> - Outil qui ne recherche pas les aspects fondamentaux des dommages à l'ADN ni la réponse de la cellule à ces dommages - Nécessité de travailler sur une suspension cellulaire et la digestion enzymatique (trypsine) des tissus ou la récupération des cellules en culture par grattage (scraping) peuvent provoquer des dommages supplémentaires (Singh <i>et al.</i>, 1991 a ; Birmelin <i>et al.</i>, 1998)

Tableau III : Principaux avantages et inconvénients du test des comètes pour l'étude des dommages à l'ADN (d'après Singh *et al.*, 1988, Mc Kelvey-Martin *et al.*, 1993 ; Fairbairn *et al.*, 1995 ; Collins *et al.*, 1997 ; Horvathova *et al.*, 1998 ; Mitchelmore et Chipman, 1998 a ; Wilson *et al.*, 1998 ; Rojas *et al.*, 1999 et Tice *et al.*, 2000)

sont rapportées dans le tableau IV. Il apparaît de ces quelques études que le test des comètes apporte des résultats positifs, à des concentrations plus basses que les autres techniques, pour les composés chimiques étudiés et les conclusions des auteurs lui sont largement favorables. Slamenova *et al.* (1997) lui reprochent cependant une faible discrimination (saturation de la réponse) aux plus fortes doses.

Mikhailov *et al.* (2000) soulignent un autre avantage du test des comètes : son approche cellule par cellule, qui présente un intérêt certain, comparativement aux approches globales (ADN tissulaire) des autres techniques. Singh *et al.* (1989) avaient les premiers mis en évidence la spécificité de cette technique en la comparant à l'élution alcaline et à une technique d'électrophorèse en gel d'agarose. Ils ont montré une aptitude équivalente des différents essais à détecter les sites alcali labiles endogènes dans des spermatozoïdes humains et murins (soit entre 10^6 et 10^7 sites par génome). Mais leurs travaux soulignaient surtout l'approche cellulaire individuelle du test des comètes. La présence des sites alcali labiles au sein des noyaux est homogène dans la population des spermatozoïdes et ces sites ne correspondent pas à des dommages à l'ADN, mais plutôt à une caractéristique physiologique de l'ADN très condensé, et cette homogénéité de distribution n'a pu être mise en évidence que par le test des comètes.

C'est également cette spécificité du test des comètes, qui a permis de démontrer l'absence de réparation des dommages à l'ADN dans certaines cellules d'une population de lymphocytes humains (Singh *et al.*, 1990). Une proportion de cellules (entre 4 et 16 %) présentait encore des dommages à l'ADN, au bout de deux heures, après une irradiation aux rayons X (200 rads), et cela principalement chez les donneurs âgés (70-91 ans) ; les techniques de l'élution alcaline et de sédimentation des nucléoïdes n'avaient pas pu accéder à cette conclusion lors d'études antérieures.

Le test des comètes nécessite peu de cellules : de 2.10^4 à 5.10^4 cellules contre 10^6 par essai pour l'élution alcaline (Mitchelmore et Chipman, 1998 a) et présente peu d'artefacts (Collins *et al.*, 1997). Son approche cellule par cellule, apporte des informations sur les dommages à l'ADN certes au niveau de la cellule, mais également sur leur distribution au sein de la population cellulaire, voire même au niveau tissulaire, à la condition de pouvoir distinguer les différents types cellulaires sur les lames par des diamètres nucléaires différents. Permettant une mesure directe du degré de dommages à l'ADN, il est aussi sensible (voire

Type cellulaire	Lymphocytes humains		Cellules VH10, HepG2 et V79		MEL	Raji
	Rayonnements γ	EMS	BPDE	MNNG	Mimosine	Chocs thermiques (43 °C) (durée postincubatoire nécessaire)
Elution alcaline	2 Grays	5 mM	20 μ M	1 μ g/L	-	-
Translation des coupures	jamais mis en évidence	80 mM	10 μ M	-	-	-
Test des comètes	-	0,5 mM	1,25 μ M	0,1 μ g/L	150 μ M	0 h
Essai de déroulement alcalin	-	-	-	1-2 μ g/L	-	-
Essai de précipitation alcaline	-	-	-	-	-	1 h
Sédimentation des nucléoïdes	-	-	-	-	150 μ M	-
Référence	Leroy <i>et al.</i> , 1996		Slamenova <i>et al.</i> , 1997		Mikhailov <i>et al.</i> , 2000	Fairbairn <i>et al.</i> , 1995 b

Tableau IV : Doses, concentrations minimales d'agent génotoxique, ou modalité la plus réduite, induisant un effet significatif (dommages à l'ADN), relevées dans les travaux ayant appliqué le test des comètes en complément d'autres essais pour l'étude des dommages à l'ADN suite aux expositions

MEL : cellules érythroleucémiques de souris ; EMS : éthylméthane sulfonate ; MNNG : *N*-méthyl-*N'*-nitrosoguanidine ; BPDE : benzo(a)pyrène diol époxyde

même plus) que les techniques antérieures pour l'étude des dommages à l'ADN. La rapidité de sa mise en œuvre et sa souplesse constituent également des avantages non négligeables (Belpaeme *et al.*, 1998).

Cependant, cet outil ne permet pas de rechercher les aspects fondamentaux des dommages à l'ADN, et la réponse de la cellule à ces dommages. La contrainte de travailler sur une suspension cellulaire limite quelquefois ses applications, les auteurs préférant travailler sur des cellules déjà dissociées (échantillon sanguin, hémolymphhe...).

Le manque de standardisation de son protocole entre les différents laboratoires et l'hétérogénéité de l'expression des résultats dans la littérature, rend difficile les comparaisons des différents travaux publiés (Belpaeme *et al.*, 1998). Ainsi, les dommages à l'ADN étudiés par le test des comètes peuvent être exprimés selon différents paramètres mesurés par les analyseurs d'image, comme par exemple le pourcentage d'ADN dans la queue des comètes, la longueur de celle-ci, l'*Extent Tail Moment* (ETM, produit des deux paramètres précédent) ou comme le résultat d'un classement empirique des observations, sans quantification des dommages. Les niveaux de dommages à l'ADN sont représentés par les taux moyens du paramètre considéré, par la distribution de ce paramètre dans la population cellulaire (médiane et quartiles) ou encore par la distribution des cellules selon les valeurs individuelles du paramètre ou dans différentes classes arbitraires pour l'observation semi-quantitative. Pour un même paramètre, la définition peut varier selon les auteurs : pour le *Tail Moment* par exemple, il est généralement exprimé comme le produit de la longueur de la queue par la proportion d'ADN dans celle-ci (*Extent Tail Moment*), alors qu'Olive *et al.* (1996) définissent ce paramètre comme le produit de la proportion d'ADN dans la queue par la distance entre le centre de gravité de la queue et le centre de gravité de la tête de la comète, calculé à partir de l'intensité de fluorescence (*Olive Tail Moment*).

Schnurstein et Braunbeck (2001) se sont intéressés dans leur étude avec des échantillons d'eaux du Rhin et de l'Elbe, aux paramètres qui permettent d'exprimer ces dommages à l'ADN. Ils ont appliqué le test des comètes à des cellules de foie et de branchies de *Brachydanio rerio*, exposées à des échantillons d'eaux. Ils ont observé des différences d'interprétations selon le paramètre employé pour exprimer le degré de dommages à l'ADN. Ils ne soulignent aucune différence entre le paramètre du pourcentage d'ADN dans la queue et celui du *Tail Moment* alors que l'expression basée sur la longueur de la queue des comètes est

moins discriminante en terme de significativité des résultats : le nombre d'échantillons positifs en se basant sur les résultats de ce paramètre est plus important.

III.1.D. Domaines d'applications

Les applications du test des comètes ne se sont pas limitées à la toxicologie génétique. Des applications cliniques ont été développées rapidement. Grâce à sa sensibilité et à sa flexibilité, l'étude des dommages à l'ADN est possible par cet essai au niveau des populations autochtones et les applications en écotoxicologie sont de plus en plus fréquentes (Cotelle et Férard, 1999), particulièrement en milieu aquatique (Mitchelmore et Chipman, 1998 a ; Lee et Steinert, 2003).

Les différents domaines d'applications du test des comètes sont les suivants :

- Toxicologie génétique
- Mécanismes de réparation de l'ADN
- Cycle cellulaire et apoptose
- Effets des radicaux libres
- Nutrition : régimes, compléments, additifs, antioxydants...
- Epidémiologie : expositions professionnelles, stérilité...
- Recherche médicale et clinique : embryologie, cancérologie, essais thérapeutiques, pathologies (diabète, *Xeroderma pigmentosum*...)
- Ecotoxicologie.

Un tableau en annexe I présente une liste non exhaustive d'exemples de travaux, dans ces différents domaines d'application.

III.2. La 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine

La 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) (figure 15) et son nucléoside correspondant, la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine (8-oxodGuo), parfois appelé 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine, sont considérés comme des marqueurs des dommages oxydatifs à l'ADN (Collins *et al.*, 1996).

La molécule d'ADN est une cible importante d'attaques radicalaires. On estime le taux d'attaques oxydatives à l'ADN, à entre 10^4 et 10^5 réactions par cellule et par jour (Carr et Balz, 1999). La prise en charge des dommages oxydatifs par les mécanismes de réparation n'étant pas parfaite, ces lésions oxydatives s'accumulent avec l'âge et certaines participent à la mutagenèse, à la cancérogenèse, et aux processus de vieillissement cellulaire (Epe, 1993 ; Adams *et al.*, 2001 ; de Souza-Pinto *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2003). Leur prévalence est également associée à de nombreuses pathologies humaines comme les cancers, l'arthrite et les maladies neurodégénératives (Halliwell et Gutteridge, 1984 ; Abdi et Ali, 1999 ; Carr et Balz, 1999).

En ce qui concerne la recherche des produits d'oxydation des bases, les auteurs se sont intéressés majoritairement aux modifications de la guanine et de la thymine (Cadet *et al.*, 1999 ; Evans et Cooke, 2004) et la recherche de 8-oxodGuo est le paramètre d'étude des dommages oxydatifs à l'ADN le plus mis en œuvre dans les études de biomonitoring des populations humaines et animales exposées, par suite de la disponibilité à coût modéré de détecteurs électrochimiques permettant les mesures quantitatives. Sa mesure présente en effet un intérêt notable, du fait de sa signification biologique (dommages oxydatifs à l'ADN) et de ses conséquences cellulaires éventuelles (mutations, cytotoxicité...) (Collins *et al.*, 1996 ; Griffiths *et al.*, 2002 ; de Almeida *et al.*, 2003 a et b).

Sur la vingtaine de produits que génèrent sur l'ADN les espèces radicalaires consécutives à un stress oxydant endogène ou associé au métabolisme de xénobiotiques, la 8-oxoguanine est la plus abondante car la guanine a le potentiel d'oxydation le plus bas (Cadet *et al.*, 1999). On estime que cette base participe de 30 à 50 % à la totalité des dommages oxydatifs (Dizdaroglu *et al.*, 1991).

8-oxo-7,8-dihydroguanine

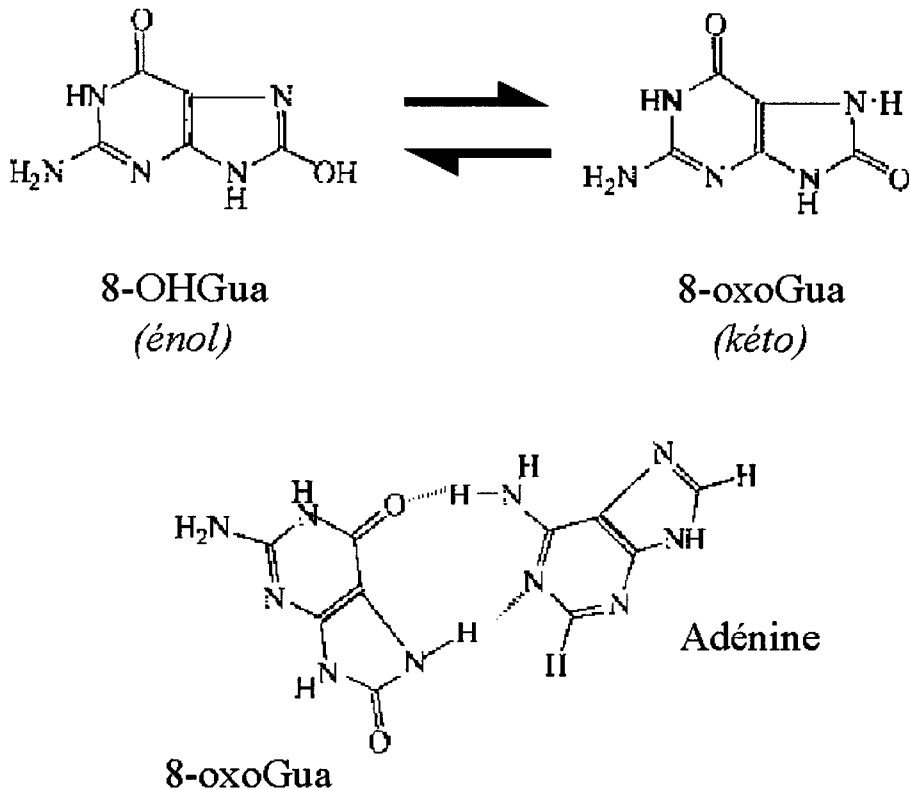


Figure 15 : Nature chimique de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-hydroxyguanine (8-OHGua) et 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua)) et représentation du mésappariement de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine avec l'adénine qui peut conduire à la transversion G:C $\Rightarrow$ A:T (Cheng *et al.*, 1992, Wood *et al.*, 1990)

Le radical hydroxyle, le radical peroxyxynitrite et l'oxygène singulet peuvent générer ce produit (von Sonntag, 1987 ; Devasagayam *et al.*, 1991). Ainsi la 8-oxoGua peut se former par dégradation d'un endoperoxyde instable (figure 16) ou par fixation du radical hydroxyle en C8 de la guanine (figure 17). L'adénine comme la guanine, peut être attaquée en C4, C5 et C8. La thymine quant à elle, formera des thymines glycols et la 5-hydroxyméthyluracile (Halliwell et Dizdaroglu, 1992).

Une variété d'expositions, d'agents et de processus physiologiques peuvent induire des augmentations des niveaux de 8-oxoGua et de 8-oxodGuo. On peut citer par exemple, chez l'homme, un effort sportif important (Palazzetti *et al.*, 2003), le tabagisme actif (Asami *et al.*, 1997), les radiations ionisantes (Ogawa *et al.*, 2003) ou UV (Cooke *et al.*, 2000) et chez les rongeurs, le nickel (Kasprzak *et al.*, 1997), l'amiante (Fung *et al.*, 1997), l'aflatoxine B1 (Shen *et al.*, 1995) et les fumées de diesel (Tsurudome *et al.*, 1999).

Son caractère promutagène est reconnu : elle peut causer des mutations par transversion après la réplication (Malyarchuk *et al.*, 2003) et induire des mésappariements et des transversions Guanine:Cytosine (G:C) $\Rightarrow$ Adénine:Thymine (A:T) (Wood *et al.*, 1990 ; Cheng *et al.*, 1992).

Les différentes techniques applicables à l'étude de la 8-oxodGuo au niveau de l'ADN sont répertoriées dans le tableau V. Les techniques de chromatographie liquide haute performance avec détection électrochimique (HPLC-EC) et de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) sont les plus utilisées par les auteurs, pour l'étude des dommages oxydatifs à l'ADN et en biologie des radicaux libres (Cadet *et al.*, 1999 ; Griffiths *et al.*, 2002).

Les niveaux de bases mesurés par ces différentes techniques peuvent varier du fait d'artefacts d'oxydations lors de l'extraction, de l'hydrolyse de l'ADN et de la dérivation (syllilation nécessaire en spectrométrie de masse). Ainsi, on estime que le facteur de surestimation des niveaux de 8-oxodGuo par la GC-MS est compris entre 10 et 50 et la représentativité des résultats par cette technique est sujette actuellement à de vives controverses (Cadet *et al.*, 1999 ; Collins *et al.*, 2004).

La technique HPLC-EC reste la moins discutée, depuis l'introduction de desferroxamine dans les différents tampons d'extraction de l'ADN et d'homogénéisation des

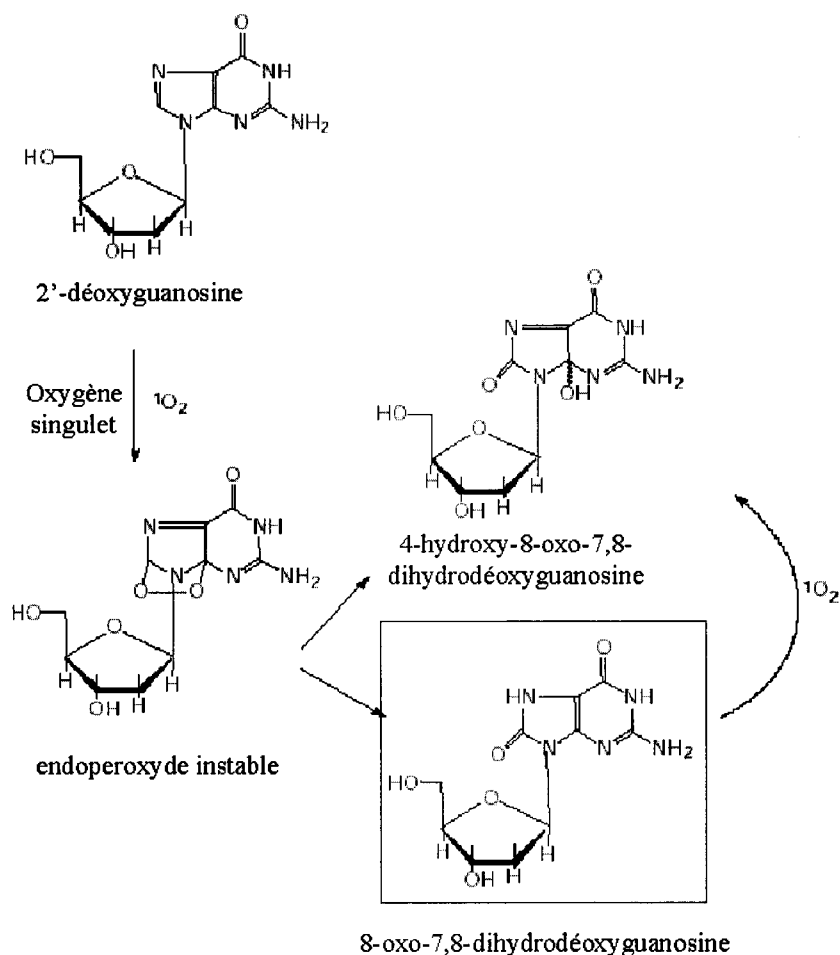


Figure 16 : Attaque de la 2'-déoxyguanosine par l'oxygène singulet (d'après Devasagayam *et al.*, 1991)

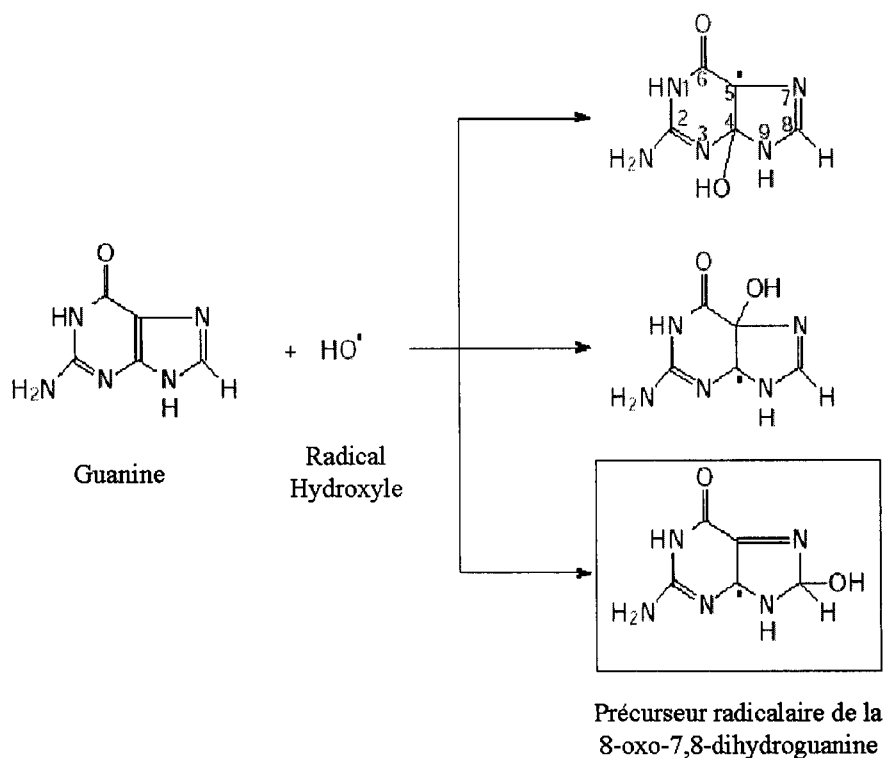


Figure 17 : Attaque de la guanine par le radical hydroxyle et formation du précurseur radicalaire de la 8-oxoGua (d'après von Sonntag, 1987)

TECHNIQUE	Seuil de sensibilité 8-oxodGuo/ 10 ⁶ dGuo (8-oxodGuo /10 ¹¹ Da) *	Quantité d'ADN minimale nécessaire (µg)	Commentaires : avantages et limites	Références
HPLC-EC	1 (0,61) 0,01 (0,0061)	10-100	<i>Artefacts d'oxydation lors de l'extraction et de l'hydrolyse de l'ADN</i> Dosage dans les fluides biologiques Oxydation de l'ADN limitée par le Tempo, la desferroxamine, le traitement à 4°C et l'extraction par la méthode chaotrope au Na I	Ames, 1988 Floyd <i>et al.</i> , 1986 Faux <i>et al.</i> , 1992 Shigenaga <i>et al.</i> , 1990, 1994 Cadet <i>et al.</i> , 1999
GC-SM (SIM)	1 (0,61)	50	Dosage simultané de plusieurs bases oxydées <i>Niveaux de base plus élevés que par HPLC-EC (artefacts d'oxydation lors de l'extraction et de l'hydrolyse de l'ADN et de la dérivation)</i> <i>Sensibilité limitée pour les faibles taux de dommages</i>	Dizdaroglu, 1994 Cadet <i>et al.</i> , 1998, 1999 Kasai, 1997 Collins <i>et al.</i> , 2004
« ELISA-like »	5 (3,05)	10-100	<i>Réactions croisées avec d'autres lésions à l'ADN, dosage semi-quantitatif</i>	Degan <i>et al.</i> , 1991 Yin <i>et al.</i> , 1995 Radak <i>et al.</i> , 2000
Immunohistochimie	5 (3,05)	10-100	Absence d'extraction ou d'hydrolyse de l'ADN (pas d'autooxydation) Méthode <i>in situ</i> par analyse d'image Ni extraction, ni hydrolyse de l'ADN <i>Réactions croisées avec d'autres lésions à l'ADN</i>	Seino <i>et al.</i> , 2002 Kato <i>et al.</i> , 2001
Versions modifiées du test des comètes, de l'essai de déroulement de l'ADN et de l'élution alcaline	10-50 (6,1-30,5)	10	Conversion des bases oxydées en coupures de brins Méthodes générales applicables à l'étude de nombreux dommages par l'utilisation d'endonucléases spécifiques de réparation : exonucléase III pour les sites AP, formamidopyrimidine glycosylase pour la 8-OxoGua et les formamidopyrimidines (cycle purique ouvert), endonucléase III pour les pyrimidines oxydées, T4 endonucléase V pour les dimères de pyrimidines...	Collins <i>et al.</i> , 1996, 1997, 2004 Cadet <i>et al.</i> , 1999 Gedik <i>et al.</i> , 1998 Griffiths <i>et al.</i> , 2002
Electrophorèse capillaire détection fluorimétrique ou électrochimique	10 (6,1)	60	Dosage dans les fluides biologiques <i>Sensibilité limitée pour les faibles taux de dommages</i> Sensibilité augmentée par la détection électrochimique	Ullrich et Grune, 1997, Mei <i>et al.</i> , 2003 Esaka <i>et al.</i> , 2003
Postmarquage au [³² P]	10 (6,1)	1	Faible quantité d'échantillons <i>Surestimation des niveaux de bases</i> <i>Long et difficilement applicable en routine</i>	Collins <i>et al.</i> , 2004 Cadet <i>et al.</i> , 1998, 1999 Griffiths <i>et al.</i> , 2002

Tableau V : Principales techniques d'étude de la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine (8-oxodGuo)

* les seuils de sensibilité exprimés en 8-oxodGuo / 10¹¹ Da sont donnés à titre indicatif car ils ont été dérivés des seuils exprimés en 8-oxodGuo / 10⁶ dGuo et des facteurs d'équivalence de Griffiths *et al.*, 2002, qui ne concernent que l'ADN des cellules humaines ; sites AP : sites abasiques ; Tempo : 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-*N*-oxyl ; HPLC-EC : Chromatographie Liquide Haute performance, détection électrochimique ; GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ; SIM : *Selected Ion Monitoring* ; ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay* ; NaI : Iodure de sodium.

tissus et de la méthode d'extraction chaotrope de l'ADN au NaI (iodure de sodium), qui permettent de limiter les artefacts d'oxydation consécutifs à la préparation des échantillons (Cadet *et al.*, 1999 ; Ravanat *et al.*, 2001 ; Collins *et al.*, 2004).

Des mécanismes de réparation spécifiques (glycosylases) de cette base oxydée existent au sein de la cellule (de Souza-Pinto *et al.*, 2001). Une conséquence indirecte de cette réparation est l'élimination de la 8-oxoGua et de la 8-oxodGuo et leurs dosages possibles dans les urines lors de l'excrétion chez l'homme (Carr et Balz, 1999 ; Mei *et al.*, 2001 ; Mei *et al.*, 2003).

III.3. Autres techniques spécifiques de recherche de dommages à l'ADN

III.3.A. La recherche de sites abasiques

Les sites abasiques (sites AP) peuvent être quantifiés spécifiquement par un protocole basé sur la réaction d'une sonde moléculaire, la *N*-(aminooxyacétyl)-*N'*-(D-biotinoyl)hydrazine ou ARP (*Aldehyde reagent probe*), avec le groupement d'aldéhyde, exposé, au niveau du site abasique (figure 18) et la quantification colorimétrique des complexes liés, par la mesure d'activité enzymatique de la peroxydase de raifort couplée à la sonde (Kubo *et al.*, 1992). La sensibilité minimale de cet essai est la détection des effets d'une irradiation aux rayons X de 10 rads (0,1 Grays) (Atamna *et al.*, 2000).

A l'heure actuelle, aucune application n'a été relevée en milieu environnemental, malgré la commercialisation des réactifs en kit et la miniaturisation de cet essai en microplaque (Kow et Dare, 2000 ; *Molecular Probes*, 2004), peut-être à cause de la spécificité de cet essai qui ne permet la détection que d'un type de dommage à l'ADN parmi d'autres, mais également parce que les sites AP sont des lésions alcali labiles qui peuvent être détectées par les techniques d'études générales des dommages à l'ADN comme l'élution alcaline ou le test des comètes.

III.3.B. La recherche d'adduits à l'ADN

L'étude des adduits à l'ADN a rencontré un plus grand intérêt de la part des auteurs, dans le domaine de l'écotoxicologie (Walker, 1995 ; Griffiths *et al.*, 2002). Différentes techniques sont applicables à la détection des adduits à l'ADN (Tableau VI). En écogénotoxicologie, c'est le postmarquage au Phosphore 32 qui a été le plus largement mis en œuvre.

Ainsi, l'application de cette méthode, chez des phoques (*Phoca vitulina richardsi*), suite à la pollution pétrolière de l'*Exxon Valdez*, a montré des adduits (ADN hépatique), résultant d'une exposition aux HAPs, sur les autoradiogrammes des individus exposés, par

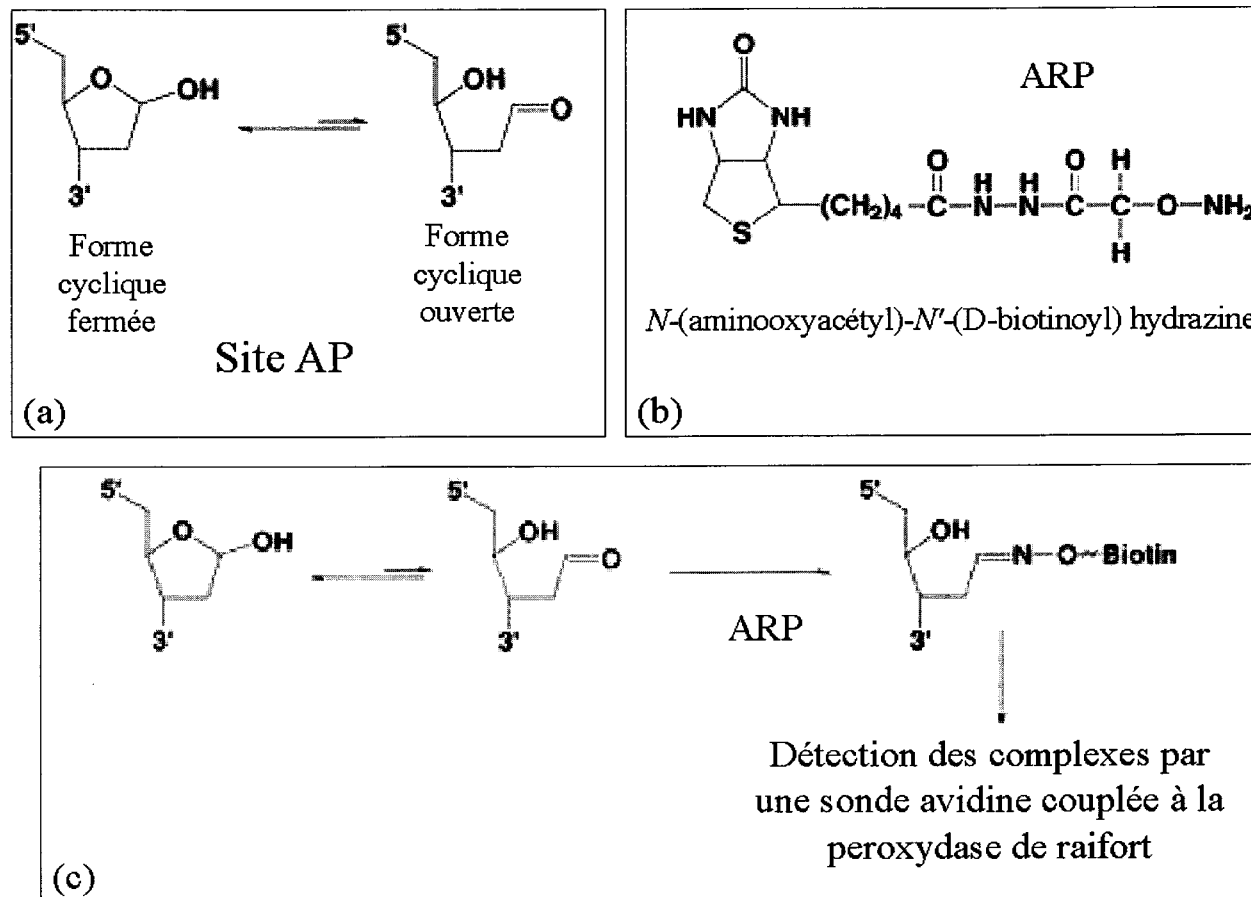


Figure 18 : Principe de la technique de détection des sites AP (d'après Kow et Dare, 2000 ; Molecular Probes, 2004) :

- (a) Equilibre aux conditions physiologiques, entre les sites AP sous forme cyclique fermée (95 %) et cyclique ouverte (aldéhyde) (5 %)
- (b) Structure de l'ARP (*Aldehyde reagent probe*) ou *N*-(aminooxyacétyl)-*N'*-(D-biotinoyl) hydrazine
- (c) Réaction de l'ARP en concentration excessive, avec le groupement aldéhyde exposé des sites AP (la réaction avec l'ARP entraîne la conversion de la majorité des sites AP sous leur forme cyclique ouverte)

rapport aux témoins. La présence de ces adduits était associée à l'augmentation des taux de métabolites biliaires aromatiques fluorescents (Reichert *et al.*, 1999).

Une étude comparative interespèces, sur les conséquences de la marée noire du *Sea Empress*, souligne des différences entre vertébrés et invertébrés, en terme de prévalence des adduits à l'ADN, et qui peuvent être imputées à des différences de métabolisme des xénobiotiques (Harvey *et al.*, 1999). Une augmentation quantitative (au maximum 50 fois plus) et qualitative des adduits à l'ADN hépatique de trois espèces de poissons (*Lypophys pholis*, *Pleuronectes platessa*, *Limanda limanda*) a été observée, alors qu'aucun adduit, consécutif à l'exposition aux hydrocarbures de la marée noire, n'a pu être mis en évidence pour l'ADN total extrait de l'éponge *Halichondra panicea* ou de la moule *Mytilus edulis*. Cette absence de réponse chez *Mytilus edulis*, en terme d'adduits à l'ADN, consécutive à l'exposition aux composés de pétrole brut relargués dans le milieu marin, avait déjà été soulignée par les travaux de Solé *et al.* (1996) après le naufrage de l'*Aegean Sea*.

TECHNIQUE	Séparation	Seuil de sensibilité Adduit / 10 ⁸ bases (Adduit / 10 ¹² Da)	Exemples d'agents	Quantité d'ADN nécessaire (µg)	Coût	Commentaires
Postmarquage au [³² P]	CCM	0,1 (3,06)	<i>Goudrons, ochratoxine, HAPs, tabagisme, stress oxydatif</i>	2-10	<i>élevé</i>	Screening des cancérogènes Applicable à l'analyse des adduits résultant de l'exposition à des mixtures complexes Sous-estimation possible (étapes critiques : séparation CCM et phosphorylation des nucléotides) Pas d'identification des adduits et préexistence de spots endogènes
	HPLC	0,2-10 (6,12-30,6)	<i>HAPs</i>	10	<i>élevé</i>	Moins sensible (à moins d'analyser une plus grande quantité d'échantillon)
	CE	0,1 (3,06)	<i>B(a)P</i>	10	<i>élevé</i>	Permet des injections multiples de l'échantillon
Immunohistochimie	ELISA	1-4 (30,6-122,4)	<i>Aflatoxines, cisplatine, stress oxydatif, UV, goudrons</i>	>100	<i>raisonnable</i>	Haute spécificité mais nécessité de disposer d'anticorps contre les adduits recherchés Problème de réaction croisée avec d'autres adduits (spécifiquement utilisé pour les cancérogènes et certaines classes de cancérogènes)
	CE	20 (612)	<i>BPDE</i>	0,5-2	<i>élevé</i>	Faible quantité d'échantillon mais moindre spécificité
Fluorescence	HPLC	0,5-7 (15,3-214,2)	<i>Aflatoxines, HAPs, B(a)P</i>	>100	<i>bas</i>	Applicable uniquement aux composés fluorescents
Spectrométrie de masse	GC/LC	0,3-10 (9,18-306)	<i>HAPs, B(a)P, malondialdéhyde, tabagisme N-nitrosamines</i>	>100	<i>élevé</i>	Identification de la structure de l'adduit Nécessité de dérivation
	CE	0,4-40 (12,24-1224)	<i>Styrène, BPDE, phényl glycidyl éthers</i>	>100	<i>élevé</i>	Détection augmentée par empilement des échantillons

Tableau VI : Principales techniques d'études des adduits à l'ADN (adapté de De Kok *et al.*, 2002)

* les seuils de sensibilité exprimés en adduit / 10¹² Da sont donnés à titre indicatif, car ils ont été dérivés des seuils exprimés en adduit / 10⁸ bases ; CCM : chromatographie sur couche mince ; HPLC : chromatographie liquide haute performance ; CE : électrophorèse capillaire ; LC : chromatographie liquide ; GC : chromatographie en phase gazeuse ; HAPs : hydrocarbures aromatiques polycycliques ; B(a)P : benzo(a)pyrène ; BPDE : benzo(a)pyrène diol époxyde.

III.4. Mise en évidence de l'activation des systèmes de réparation, mutations géniques et micronoyaux

La recherche de mutations géniques, de mutations et d'aberrations chromosomiques et nucléaires se placent dans les techniques de détection indirecte des dommages à l'ADN (Depledge, 1998), ainsi que les techniques basées sur la mise en évidence de l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN (Salles *et al.*, 1995).

La technique d'étude de la synthèse non programmée de l'ADN (*UDS, unscheduled DNA synthesis*, OCDE 486, 1997), introduite par Djordjevic et Tolmach en 1967, se base sur la mise en évidence de la synthèse *de novo* d'ADN, indépendante de la réplication, lors de l'intervention des mécanismes de réparation. Des protocoles autoradiographiques sont utilisés pour quantifier cette synthèse d'ADN par incorporation de [³H]thymidine. Des grains de radioactivité apparaissent alors au sein des noyaux des cellules sur les autoradiogrammes, lors de l'intervention des mécanismes de réparation par excision-resynthèse. Des protocoles utilisent alternativement la scintigraphie en milieu liquide ou la cytométrie de flux pour mettre en évidence la synthèse *de novo* d'ADN, mais ces derniers ne permettent pas de différencier les cellules en phase de réplication des cellules où interviennent les mécanismes de réparation du génome (Lo *et al.*, 1994 ; Selden *et al.*, 1994). Un protocole similaire à la technique autoradiographique a été appliqué chez *Mytilus edulis*, pour mettre en évidence des différences d'efficacité des mécanismes de réparation selon l'âge des individus : des baisses de 42 % et de 37 % ont pu être observées chez les individus des classes d'âges 6-8 ans et > à 10 ans respectivement, comparativement aux individus de la classe 2-4 ans (Accomando *et al.*, 1999).

Un test récent, le test 3D[®] (*DNA Damaged Detection*, Laboratoires SFRI, Bordeaux, France) se base sur un principe similaire adapté *in vitro*, en microplaque, avec un cocktail d'enzymes de réparation isolées de cellules humaines, qui insère au niveau des dommages des nucléotides marqués à la biotine, reconnus ensuite par une sonde moléculaire couplée à une peroxydase (Salles *et al.*, 1995). Les travaux de Le Pennec et Le Pennec (2001) relatent son application chez la moule *Mytilus edulis*, avec des acini de glande digestive cultivés *in vitro*. Avec ce test, dans ces systèmes cellulaires de glande digestive, la 4-nitroquinoline-*N*-oxide

(4-NQO) se révèle génotoxique à la dose de 1 mM avec une augmentation des dommages à l'ADN d'un facteur 2,6. Les réponses observées pour le méthylméthane sulfonate (MMS, 1 mM), le chlorure de cadmium (10^{-4} et 10^{-5} M), et l'atrazine (10^{-5} M) sont plus ou moins claires en terme de génotoxicité, le facteur d'augmentation des dommages à l'ADN pour ces composés étant compris entre 1 et 2.

Les mutations géniques chez des organismes exposés *in situ* peuvent également informer sur les expositions passées à un agent génotoxique. Elles correspondent à des modifications de séquence des gènes et constituent des accidents de copie des bases puriques ou pyrimidiques se produisant généralement lors de la réparation et de la réplication de l'ADN (Etienne, 1996 ; Christmann *et al.*, 2003 ; Sarasin, 2003). Elles sont détectables principalement par des techniques de biologie moléculaire (Atenziar *et al.*, 2001 ; Belfiore et Anderson, 2001, Rodius *et al.*, 2002).

Des anomalies structurales des chromosomes et du noyau peuvent enfin traduire des dommages à l'ADN et l'exposition à un agent génotoxique (Van Goethem *et al.*, 1997 ; Barliene et Lovejoy, 2000). La recherche d'aberrations chromosomiques (observation des plaques équatoriales métaphasiques en microscopie optique après coloration histochimique), la recherche de micronoyaux et d'altérations nucléaires, et le test d'échange des chromatides sœurs sont des méthodologies applicables à leur étude (Zahkarov et Egolina, 1968 ; Hose, 1994).

Les micronoyaux sont un exemple intéressant d'altérations nucléaires. L'évaluation de la fréquence des cellules présentant un ou plusieurs micronoyaux au sein d'une population cellulaire apporte une mesure simple et rapide des effets clastogènes (Hose, 1994). Ce test est d'ailleurs un des plus employés pour les essais de génotoxicité chez les mammifères depuis son introduction par Boller et Schmid en 1970. Un micronoyau est une masse intracytoplasmique de chromatine, ressemblant au noyau principal et facilement observable dans des cellules interphasiques (Countryman et Heddle, 1976). Il correspond à des fragments chromosomiques ou à des chromosomes entiers persistant au moment de l'anaphase. Ce marqueur indirect de génotoxicité traduit un dommage génomique consécutif à l'action d'une substance clastogène ou à l'altération du fuseau mitotique (figure 19) (Brunetti *et al.*, 1992 ; Dopp *et al.*, 1996). Un micronoyau se forme dès la télophase et son apparition présente

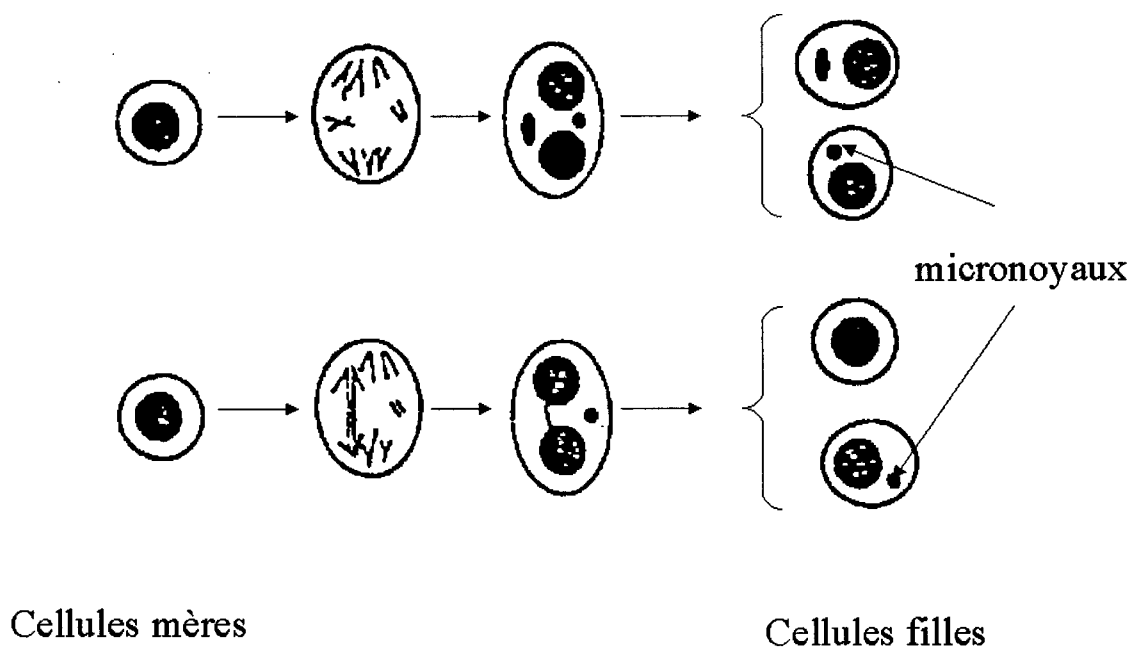


Figure 19 : Diagramme schématique illustrant la formation de micronoyaux (d'après Fenech, 1997)

l'inconvénient d'être dépendante d'une division cellulaire. Les micronoyaux sont observés en microscopie optique après coloration des cellules. En écotoxicologie, cette recherche a rencontré un franc succès, surtout en milieu aquatique. De nombreuses publications abordent par exemple des applications de ce test chez les bivalves que ce soit lors d'études au laboratoire (Venier *et al.*, 1997 ; Pavlica *et al.*, 2000 ; Carvalho Pinto-Silva *et al.*, 2003), lors d'études d'impact (Burgeot *et al.*, 1996 ; Brunetti *et al.*, 1998) ou lors d'études de transfert (Mersch et Beauvais, 1997 ; Vasseur *et al.*, 1999).

Ce test est de plus en plus régulièrement associé au test des comètes pour l'évaluation de la génotoxicité, à différents niveaux. Des exemples d'applications chez les organismes aquatiques sont présentés dans le tableau VII. Des réponses parallèles pour ces deux paramètres sont généralement observées, avec quelquefois un décalage dans le temps de réponse. Plus rarement, leurs résultats ne s'accordent pas, comme dans l'étude *in situ* de Bombail *et al.* (2001). Il faut noter que les auteurs avaient travaillé avec des individus autochtones (*Pholis gunellus*) et non des individus transférés d'un site de référence vers un site contaminé ou dont on suppose la contamination, comme cela est possible avec les bivalves. Ils avancent pour expliquer l'absence de résultats positifs par le test des comètes l'hypothèse de mécanismes de réparation plus efficaces chez les individus chroniquement exposés.

L'association de ces deux marqueurs de génotoxicité se justifie parce qu'ils traduisent des niveaux d'étude et d'intégration de la génotoxicité et des conséquences, différents. Leurs caractéristiques propres peuvent expliquer les variations de réponse, quantitativement et temporellement. Les résultats du test des comètes traduisent une réponse immédiate. Les dommages à l'ADN sont généralement transitoires (Pandrangi *et al.*, 1995 ; Russo *et al.*, 2004). Ils reflètent l'interaction entre la génération de dommages à l'ADN et leurs mécanismes de réparation (Klobucar *et al.*, 2003). Ils sont donc caractérisés par leur expression précoce et le fait qu'ils soient susceptibles d'être réparés. Un micronoyau représente un dommage génotoxique plus grave, irréversible car il n'est pas soumis à la réparation et va perdurer jusqu'à la mort de la cellule (Kirsch-Volders *et al.*, 2003). Leur fréquence est par conséquent plus rare que les dommages primaires à l'ADN. De plus, leur apparition peut-être également consécutive à l'exposition à des substances aneugènes, qui induisent des anomalies dans le nombre des chromosomes mais qui ne produisent pas dommages détectables par le test des comètes (Aoyama *et al.*, 2003).

Organismes	Types cellulaires utilisés	Description de l'étude	Observations :				Références
			effet	Fréquence des micronoyaux	effet	Dommages à l'ADN	
<i>Dreissena polymorpha</i>	hémodocytes	Etude de transfert (Drava ⇌ Sava) sur 30 jours : pollutions industrielles et urbaines. 4 sites sur la rivière Sava et 1 site de référence sur la rivière Drava (Croatie)	+	Classement des sites (rivière Sava) : Sisak (x 10,5) > Oborovo (x 6,5) > Lukavek (x 5,5) > Zagreb = Référence	+	Classement des sites : Sisak (x 5,3) > Oborovo (x 2,5) > Lukavek = Zagreb = Référence	Klobucar <i>et al.</i> , 2003
<i>Perna viridis</i>	hémodocytes	Relations doses – effets – temps. Expositions <i>in vivo</i> au B(a)P (0-0,3-3-30 µg/L) pendant 0-1-3-6-12 jours à 20°C	+	à 1 j : B(a)P = témoin à 3 j : ⚡ dès 0,3 µg/L x 1,9 x 5 et x 7,5 à 6 j : ⚡ dès 0,3 µg/L x 3,1 x 6,2 et x 12,5 à 12 j : ⚡ dès 0,3 µg/L x 7,7 x 12,5 et x 17,5	+	à 1 j : + à 30 µg/L x 1,25 à 3 j : ⚡ dès 0,3 µg/L x 1,2 x 1,5 et x 1,8 à 6 j : ⚡ dès 3 µg/L x 2 et x 2,2 à 12 j : ⚡ dès 3 µg/L x 1,2 et x 1,3	Siu <i>et al.</i> , 2004
<i>Pholis gunnellus</i>	érythrocytes	Etude du potentiel du test des comètes et des micronoyaux ¹ comme marqueurs de génotoxicité chez le poisson. Gradient de pollutions industrielles. Echantillonnage d'individus autochtones durant l'été 1994 et le printemps 1998. 2 sites non pollués en aval de l'estuaire et 2 sites pollués en amont (Firth of Forth, Ecosse, UK) (2 sites pollués et 1 de référence en 1994)	+	Eté 1994 : sites pollués (x 7 à Joppa et x 3,5 à Queensferry) > site de référence Printemps 1998 : sites pollués (x 1,6) > sites de référence	-	Sites de référence = sites pollués malgré un gradient de pollution (étudié seulement en 1998)	Bombail <i>et al.</i> , 2001
<i>Salmo trutta fario</i>	érythrocytes	Etude de la génotoxicité d'un des plus toxiques représentant des PCBs : expositions au PCB 77 (concentrations réelles de 0-343-397-429-780-918-1027 pg/mL) pendant 0-3-9-14 jours à 11°C	-	PCB 77 = témoin	-	PCB 77 = témoin	Belpaeme <i>et al.</i> , 1998
<i>Gambusia Holbrooki</i>	érythrocytes	Etude de biomonitoring. Pollutions industrielles, domestiques et agricoles. Etude de la persistance des dommages après maintien en stabulation au laboratoire (100 jours). Echantillonnage d'individus autochtones : 1 site de référence (Réserve naturelle des Astronies) et 1 site pollué sur la rivière Sarno (Italie)	+	Site pollué (x 6) > site de référence ⚡ à 100 j de stabulation au laboratoire retour au niveau basal	+	Site pollué (x 3,4) > site de référence ⚡ à 100 j de stabulation au laboratoire retour au niveau basal	Russo <i>et al.</i> , 2004

<i>Cyprinus carpio</i>	érythrocytes	Etude des effets génotoxiques de désinfectants utilisés pour la potabilisation de l'eau. Suivi des individus sur le temps (prélèvements non invasifs) sur des bassins expérimentaux dans la station de potabilisation des eaux du lac Trasimeno (Castiglione del Lago, Italie) : 3 campagnes (automne, hiver et été) prélèvements à T₀, à 3 h ou à 10 jours et à 20 jours NaClO : 1,25 mg/L ClO₂ : 0,2 mg/L acide peracétique (PAA) : 1 mg/L	+	= à 10 j pour tous les animaux ≠ entre les campagnes à 20 j dues à l'influence de la température de l'eau NaClO : x 4,1 x 6,5 et x 5 (en automne, hiver et été respectivement) ClO₂ : x 3,4 x 4,7 et x 6 (en automne, hiver et été respectivement) PAA = témoin	+	≠ entre les campagnes dues à l'influence de la température de l'eau : ↘ en été à + 20 jours pour les 3 produits (de x -1,5 à x -3,7) Autres campagnes : NaClO : + à 3 h x 1,6 en moyenne et + à 20 jours x 3,55 en hiver seulement ClO₂ : + à 3 h x 1,4 en moyenne et - à +20 jours PAA : - à 3 h et + à 20 jours x 2 en hiver seulement	Buschini <i>et al.</i> , 2003
<i>Carassius auratus</i>	cellules rénales	Evaluation de la génotoxicité de chocs thermiques (34-36 et 38 °C pendant 3 h ± 24 h de délai pour le test des comètes)	+	x 7 à 34° C x 7,3 à 36° C et x 4,1 à 38° C	+	x 1,1 à 34° C x 1,1 à 36° C et à x 1,3 à 38° C ↘ à 24 h retour au niveau basal	Anitha <i>et al.</i> , 2000
<i>Brachydanio rerio</i>	érythrocytes hépatocytes cellules branchiales	Etude de la génotoxicité du MMS : cinétique d'apparition et de réparation des dommages à l'ADN et différences intertissulaires. Expositions au MMS : 0-0,8-8-80 µM (3 j ± 3- 6-9-12 jours de délai pour les micronoyaux et 4-8-12-18-24-48-72 h ± 24-72 h de délai pour le test des comètes)	+	Uniquement étudiée chez les érythrocytes à +3 j : ↗ dès 0,8 µM x 2,2 x 3,2 et x 2,2 à +6 j : ↗ dès 8 µM x 2,1 et x 2,9 à +9 j : ↗ dès 0,8 µM x 2,5 x 2,7 et x 3,4 à +12 j = témoin	+	Uniquement étudiés pour les hépatocytes et les branchies (non testé à 8 µM) à 0,8 µM : MMS = témoin à 80 µM : hépatocytes : + dès 8h de x 2 à x 7 ↘ dès fin de l'exposition à +24 h x 6 et à +72 h x 5 cellules branchiales : + dès 8h x 4 en moyenne sur le temps ↘ dès fin de l'exposition à +24 h x 3,75 et à +72 h x 3	Deventer, 1996

Tableau VII : Travaux rapportés dans la littérature d'association pour l'étude de la génotoxicité, du test des comètes et de la recherche de micronoyaux avec des poissons et de bivalves, suite à des expositions *in vivo*, au laboratoire ou des expositions *in situ*

¹ : prise en compte d'autres anomalies nucléaires en 1998, en plus de micronoyaux ; les facteurs de variations (x) sont donnés à titre indicatif car ils ont parfois été calculés sur les figures lors de l'absence des tableaux de données ; + : effets significatifs ; - : absence d'effets significatifs ; ↗ : augmentation des effets ; ↘ : diminution des effets ; = équivalence des effets ; > niveaux d'effets supérieurs ; ≠ différence ; PAA : acide peracétique ; B(a)P : benzo(a)pyrène ; PCBs : polychlorobiphényles ; PCB 77 : 3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle ; MMS : méthylméthane sulfonate ; UK : Royaume Uni ; NaClO : hypochlorite de sodium ; ClO₂ : dioxyde de chlore.

IV. Applications du test des comètes

IV.1. Applications du test des comètes aux organismes terrestres

Les applications du test des comètes avec des organismes terrestres, concernent majoritairement des animaux de laboratoire comme le rat et la souris avec lesquels les études relevées dans la littérature sont nombreuses mais consistent pour la plupart en des expositions aiguës sur des temps courts, et il serait difficile d'en faire une synthèse exhaustive. Nous avons choisi de présenter quelques études, relatives à des expositions *in vivo* principalement, qui illustreront notre propos sur différents points : différences intertissulaires, interespèces, réversibilité des dommages à l'ADN, expositions aux HAPs, à des mélanges de polluants et expositions par voie alimentaire...

IV.1.A. Etudes avec des rongeurs

IV.1.A.a. Expositions au laboratoire

Chez le rat et la souris, les hépatocytes sont un type cellulaire très souvent étudié *in vivo*, avec les cellules de moelle osseuse et les cellules nucléées du sang périphérique. Ces dernières sont très utilisées *in vitro*. Les dommages au niveau des spermatozoïdes ou des cellules nerveuses du cerveau ont pu également être étudiés (Singh *et al.*, 1989, 1995). Par exemple, il a été observé que suite à l'ingestion d'éthanol (4 g/kg) chez des rats, des dommages à l'ADN apparaissaient dans les cellules du cerveau et atteignaient un maximum au bout de 4 heures. A 6 heures, un retour au niveau de base était observé (Singh *et al.*, 1995).

Les sensibilités, en terme de dommages à l'ADN mesurés par le test des comètes, entre différents tissus de ces deux rongeurs ont largement été étudiées (Sasaki *et al.*, 1997 a et b ; Miyamae *et al.*, 1997 ; Tsuda *et al.*, 2000 ; Sasaki *et al.*, 2002 ; Sekihashi *et al.*, 2002). Ces travaux soulignent la grande sensibilité du foie. Les dommages au niveau de cet organe de métabolisation sont plus importants que ceux observés au niveau de la moelle osseuse, de l'estomac ou du colon, notamment suite à l'exposition des souris ou des rats au

méthylméthane sulfonate (MMS), à l'aflatoxine B1 ou l'azobenzène (Sekihashi *et al.*, 2002). Des sensibilités différentes entre la souris et le rat ont pu être observées, par exemple, suite à l'exposition dans les mêmes conditions, à la pyréméthamine, un agent antiprotozoaire. L'exposition *per os* aux doses uniques de 50 et 120 mg/kg de poids corporel, chez la souris et le rat, induisait des réponses différentes, en terme de dommages à l'ADN mesurés par le test des comètes dans les différents tissus. Chez les deux espèces, la pyréméthamine produisait des dommages à l'ADN dans le foie, le rein et les poumons. Des dommages à l'ADN dans les cellules de la rate n'étaient observés que chez la souris. La génotoxicité au niveau hépatique chez le rat était transitoire : elle était maximale à 1 heure. A 24 heures, un retour aux niveaux de base a été observé. Chez la souris, des dommages persistaient encore à 24 heures dans les hépatocytes alors qu'ils n'étaient maximaux qu'à 6 heures dans les poumons et à 24 heures dans les cellules rénales (Sasaki *et al.*, 1997 b).

Les dommages à l'ADN, consécutifs à l'exposition à divers composés chimiques, à des doses fortes et dans les quelques heures qui suivent l'exposition unique, ont été étudiés au moyen du test des comètes, appliqué *in vitro* ou *in vivo* dans les cellules de rongeurs. De nombreux exemples de travaux pourront être retrouvés dans la littérature. La génotoxicité de pesticides, par exemple a pu être étudiée *in vivo* : c'est le cas du linuron (Scassellati-Sforzolini *et al.*, 1997), du fénarimol (Poli *et al.*, 2003) ou du chlorothalonil (Godard *et al.*, 1999). La propriété d'induire des dommages à l'ADN de nombreux composés mutagènes et cancérigènes a été confirmée en se basant sur des expositions à de multiples composés classifiés par des organisations comme l'IARC ou l'OCDE (Miyamae *et al.*, 1997 ; Sasaki *et al.*, 1997 a et b, 1998 a, b et c, 2002 ; Henderson *et al.*, 1998 ; Sekihashi *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2003). Les conclusions de ces travaux soulignent que les résultats du test des comètes chez les rongeurs *in vivo*, sont des indicateurs des potentialités cancérigènes des composés étudiés, malgré les différences interespèces et intertissulaires qui ont pu être observées et le fait que les auteurs utilisent des doses importantes (> à 50 mg/kg). Des dommages significatifs sont généralement mis en évidence dans ces études, mais l'évolution des dommages à l'ADN au cours du temps est rarement suivie et les auteurs s'intéressent principalement aux effets dans les quelques heures voire quelques jours post-exposition.

Quelques travaux ont étudiés la réversibilité des dommages à l'ADN observés suite aux expositions, à des sels métalliques par exemple, comme le chlorure de mercure.

L'exposition orale aux doses de 5,4 à 86,4 µg de HgCl₂ par kg de poids corporel se traduit par une augmentation dose-dépendante des dommages à l'ADN dans les leucocytes (au maximum d'un facteur 6), dans les premières 24 heures, mais la réparation de ces dommages est apparente dès 48 heures et deux semaines après l'exposition, elle s'avère complète (Grover *et al.*, 2001). Le même type d'observations existe lors d'une exposition de souris *in vivo* au chlorure de nickel (3,4-108 mg/kg, poids corporel, *per os*, dose unique) (Dana Devi *et al.*, 2004). Des dommages à l'ADN apparaissent dans les leucocytes dans les premières 24 heures, avec une augmentation maximale (x 6,25) pour la dose de 108 mg/kg (masse corporelle) à 48 heures. La diminution des dommages à l'ADN intervient dans les 72 heures. Au bout de deux semaines, le niveau de dommages à l'ADN dans les leucocytes des souris exposées, ont rejoint les valeurs observées dans les animaux témoins. La réponse est similaire suite à l'exposition au nitrate de plomb (exposition orale unique dans une gamme de concentrations entre 0,7 et 89,6 mg/kg de poids corporel) et au dichromate de potassium (0,59 à 76 mg/kg de poids corporel, dose unique *per os*) (Dana Devi *et al.*, 2000, 2001). La réversibilité des dommages à l'ADN observés, peut être moins rapide. Ainsi, l'exposition de rats par gavage à 500, 1000 et 1500 mg/kg d'éthylène glycol monométhyl éther (EGME) se traduit au bout de deux semaines par des dommages à l'ADN dans la moelle osseuse et des dommages plus importants dans les cellules testiculaires (globalement deux fois plus). Les rats ont été exposés une seule fois à chaque dose. Cinq et six semaines après l'exposition, le niveau de dommages à l'ADN dans les tissus des souris exposées, est comparable aux observations chez les témoins (Anderson *et al.*, 1996).

La génotoxicité du B(a)P a été quelque fois étudiée *in vivo*. Des effets significatifs au niveau du foie (augmentation d'un facteur 5) et des poumons (augmentation d'un facteur 6) ont pu être observés à la dose de 250 mg/kg par voie intrapéritonéale, après 3 heures d'exposition. Cependant 24 heures après l'injection, les dommages à l'ADN n'étaient plus significatifs (Sasaki *et al.*, 1997 a).

Vaghef *et al.* (1996), ont quant à eux observé des dommages dans les hépatocytes de souris mais pas au niveau de la moelle osseuse et du sang périphérique, suite à trois ingestions consécutives de B(a)P sur trois jours. Les dommages à l'ADN étaient observés 16 heures après la dernière ingestion. Les auteurs ont défini à 3 x 100 mg/kg de B(a)P (poids corporel) dans les conditions étudiées, la LOEL (*low observed effect level*) ou modalité minimale qui induit un effet toxique.

Dans les études de Garry *et al.* (2003 a et b), le benzo(a)pyrène induit des dommages importants à l'ADN chez des rats au niveau des macrophages alvéolaires, des cellules pulmonaires, des lymphocytes périphériques et des hépatocytes. L'exposition consistait en des administrations uniques intratrachéales aux doses de 3,75 à 15 mg/kg (poids corporel) de B(a)P. Les dommages les plus importants (soit environ 35 fois plus de dommages à l'ADN exprimés en terme d'*Olive Tail moment* que dans les témoins), étaient observés dans les cellules pulmonaires pour la dose de 15 mg/kg. Les effets génotoxiques de l'exposition au B(a)P (3,75 mg/kg poids corporel) étaient doublés par la coexposition à l'hématite (Fe_2O_3) à une dose de 3,75 mg/kg de poids corporel. L'hématite seule, n'induit pas de dommages dans les types cellulaires investigués (Garry *et al.*, 2003 a). Une augmentation dose-dépendante entre 3 et 48 heures n'a été observée que suite à l'exposition selon le même mode à 15 mg/kg de B(a)P (poids corporel) (Garry *et al.*, 2003 b).

Peu de travaux ont étudié la génotoxicité par voie orale des mélanges de polluants. Les études de Müller *et al.* (2004) et de Dybdahl *et al.* (2003) sur les particules de fumée de diesel (DEP) avec des rats transgéniques Big Blue ont montré des dommages à l'ADN suite à l'ingestion de nourriture contaminée pendant 21 jours. Différentes proportions de DEP dans la nourriture ont été étudiées (de 0.2 à 80 mg/kg de DEP). Les niveaux de contaminations finales (sommes des HAPs et des HAPs nitrosés recherchés) étaient très faibles soit de 71,9 ng/kg à 28,7 µg /kg (poids corporel) quotidiennement dans la nourriture. Des dommages à l'ADN ont été mis en évidence dans les cellules pulmonaires dès le premier niveau de contamination étudié (augmentation de x 5 à x 4 en moyenne pour les différents niveaux de contamination) (Müller *et al.*, 2004). Une réponse similaire était observée dans les cellules de colon. Au niveau du foie les dommages n'étaient significatifs que pour les niveaux de contamination de 8 et 80 mg/kg de DEP dans la nourriture (Dybdahl *et al.*, 2003). Ces résultats n'étaient pas associés avec une augmentation de la fréquence des mutations chez ces animaux transgéniques dans les différents organes étudiés.

Les études dans le domaine de l'alimentation ont pu montrer les propriétés protectrices de certains produits ou certains régimes alimentaires induisant des dommages à l'ADN. Le jus de pamplemousse par exemple, supprime la génotoxicité de la 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4,5-b]pyridine au niveau du colon (Miyata *et al.*, 2002). La consommation par les rats de bière durant la semaine précédant l'exposition à des amines hétérocycliques réduit

significativement (de 20 à 25 %) la génotoxicité de ces composés (Nozawa *et al.*, 2004). La consommation subaiguë d'éthanol (10 %) pendant trois mois, provoque des dommages faibles à l'ADN, mais seulement au niveau du sang (Fedeli *et al.*, 2003).

L'étude de Cortés *et al.* (2001) met en évidence des dommages à l'ADN au niveau de la rate, de la moelle osseuse et du sang périphérique de rats subissant une sévère malnutrition pendant la lactation, sur 3 semaines. Les dommages à l'ADN sont 1,7 fois supérieurs dans la rate, 3 fois dans les lymphocytes et 2,7 fois dans les cellules de moelle osseuse, comparativement aux niveaux de base de dommages à l'ADN dans les différents types cellulaires des animaux témoins qui ont reçu une nourriture normale. Les auteurs avancent les hypothèses suivantes pour expliquer leurs résultats :

- une déficience en nutriments essentiels, nécessaires à la synthèse protéique et au fonctionnement de certaines enzymes et notamment aux systèmes enzymatiques de réparation de l'ADN,
- et/ou des carences en composés antioxydants protecteurs qui ne piègeraient plus les radicaux libres endogènes qui exerceraient alors leurs effets toxiques,
- au niveau du sang, des désordres de la réponse immunitaire pourraient être liés aux effets observés.

IV.1.A.b. Expositions *in situ*

Les applications *in situ* du test des comètes sont très rares comparativement aux études au laboratoire, en conditions contrôlées. Nous en avons relevé quatre dans la littérature avec des populations naturelles de rongeurs brésiliens ou espagnols (Da Silva *et al.*, 2000 a et b ; Tanzarella *et al.*, 2001 ; Festa *et al.*, 2003). Les études de Da Silva *et al.* (2000 a et b) concernent des rongeurs autochtones échantillonnés sur des sites subissant une pollution minière (charbon). Les dommages sur ces sites étaient plus importants et atteignaient un niveau double par rapport aux niveaux observés chez les animaux provenant d'un site de référence. Les études de Tanzarella *et al.* (2001) et de Festa *et al.* (2003) s'intéressent aux conséquences d'un accident qui a entraîné la contamination de l'écosystème par des métaux lourds et de l'arsenic, et montre des dommages importants dans les leucocytes de *Mus spretus* exposés.

IV.1.B. Autres organismes terrestres

Les études avec applications du test des comètes à d'autres organismes terrestres sont plus nombreuses et concernent :

- des chiens (Shen *et al.*, 2001),
- des chauves-souris (Meehan *et al.*, 2004),
- des vers de terre (Verschaeve et Gilles, 1995 ; Salagovic *et al.*, 1996 ; Zang *et al.*, 2000 ; Bustos-Obregon et Goicochea, 2002 ; Rajaguru *et al.*, 2003),
- des oiseaux (Pastor *et al.*, 2001 a et b, 2004),
- des ruminants (vache *Aberdeen Angus*) (Picco *et al.*, 2001),
- et des plantes (Navarette *et al.*, 1997 ; Koppen et Angelis, 1998 ; Menke *et al.*, 2000, 2001 ; Poli *et al.*, 2003).

Globalement ces études soulignent l'intérêt du test des comètes pour l'étude de la génotoxicité environnementale ou la recherche médicale (Shen *et al.*, 2001) et concernent principalement des expositions au laboratoire ou *in situ*.

IV.2. Applications du test des comètes aux organismes aquatiques

Les applications du test des comètes aux organismes aquatiques intéressent principalement les bivalves et les poissons.

IV.2.A Les bivalves

IV.2.A.a. Expositions au laboratoire

Les différents travaux avec des cellules de bivalves, exposées *in vitro* ou *in vivo* au laboratoire, avaient principalement comme objectifs l'évaluation du potentiel du test des comètes pour des applications ultérieures de biomonitoring ou l'étude des mécanismes de génotoxicité de certaines substances chez les invertébrés aquatiques. Pour cela, ils mettent en

œuvre des expositions à des substances génotoxiques de référence, à des pesticides, et quelquefois à des échantillons de l'environnement.

En ce qui concerne les différentes applications du test des comètes chez les bivalves, les espèces utilisées sont principalement marines, et la moule bleue, *Mytilus edulis* est particulièrement représentée. Les applications avec des bivalves marins sont répertoriées dans le tableau VIII et celles avec des bivalves dulçaquicoles dans le tableau IX.

L'utilisation de différents inhibiteurs enzymatiques (clotrimazole, dicoumarol, α -naphtoflavone) lors d'expositions au B(a)P a permis de montrer que sa génotoxicité était principalement due, chez *Mytilus edulis*, à la formation de dérivés quinoniques et non comme chez les mammifères d'intermédiaires diol-époxyde (Mitchelmore *et al.*, 1998 b). Wilson *et al.* (1998) voyaient plutôt l'intérêt du test des comètes sur cellules de glande digestive de *Mytilus edulis*, dans le screening de composés et effluents susceptibles d'être rejetés dans le milieu marin. Dans cette optique, ils ont utilisé un antioxydant, l'acide ascorbique, pour diminuer le taux de dommages chez les témoins et ainsi augmenter la sensibilité de ce test *in vitro*. Mitchelmore *et al.* (1998 a), ont quant à eux utilisé un inhibiteur des systèmes de réparation, la cytosine- β -D-arabinofuranoside (ara-C) pour augmenter la sensibilité de la technique et la réponse des cellules en terme de dommages à l'ADN, lors d'expositions de suspensions cellulaires de glande digestive.

L'utilisation de tels antioxydants et d'inhibiteurs des systèmes de réparation n'est intéressante que dans des études des mécanismes de génotoxicité ou dans l'optique d'un test *in vitro* de diagnostic d'échantillons environnementaux et des substances chimiques mais elle n'est pas envisageable dans celle d'applications *in situ*, en tant qu'outil de diagnostic éco-épidémiologique.

Dans tous les cas, la réponse des cellules de bivalves, quel que soit le type cellulaire employé, est plus précoce et plus importante avec les composés induisant des cassures franches à l'ADN (H_2O_2 , *N*-méthyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG)...) qu'avec les composés nécessitant une activation métabolique. La réponse des cellules au peroxyde d'hydrogène, en terme de dommages à l'ADN est souvent la plus significative. Une augmentation des dommages à l'ADN consécutive à une exposition *in vitro* à 0,1 mM d' H_2O_2 d'un facteur de 105 a même été reportée dans les cellules de glande digestive d'*Unio tumidus* (Labienc *et al.*, 2003).

Organismes	Types cellulaires utilisés	Conditions expérimentales			Expression des résultats	Observations : dommages à l'ADN	Références
		Agents (substances) testés	Mode (durée) d'exposition	Gammes de concentrations (valeurs) testées			
<i>Mytilus edulis</i>	Cellules de glande digestive	H ₂ O ₂		0-10-20-50-100-200 µM		H ₂ O ₂ ➤ dès 10 µM x 2,2 x 5 x 5,7 x 6,7 et x 7,2 MX ➤ dès 1 µM x 3 x 5 x 5,25 x 5,4 et x 8 B(a)P ➤ dès 10 µM x 2 x 2,1 x 3,4 x 4,8 et x 2,4 1-NP ➤ dès 10 µM x 2 x 3,6 x 4,5 x 4,7 et x 4,8 NF ➤ dès 10 µM x 2,7, x 3,45 x 5,6 x 6,2 et x 6,4	Mitchelmore <i>et al.</i> , 1998 a
		MX + ara-C (1 mM)		0-0,1-1-10-50-100-200 µM	% d'ADN dans la queue		
		B(a)P		0-10-20-50-100-200 µM			
		1-NP		0-10-50-100-200-250 µM			
		NF		0-10-50-100-500-1000 µM			
		± ara-C	<i>in vitro</i> (1 h à 15°C)	± 1 mM	% d'ADN dans la queue	B(a)P + x 3,9	Mitchelmore <i>et al.</i> , 1998 b
		± PBN		± 50 mM		B(a)P + ara-C = B(a)P seul	
		± DC		± 25 µM		B(a)P + PBN ➤ - 75 % B(a)P seul	
		± 3AT		± 1-10 mM		B(a)P + DC ➤ + 81 % B(a)P seul	
		± ANF		± 50 µM		B(a)P + 3AT = B(a)P seul	
		± CT		± 50 µM		B(a)P + ANF = B(a)P seul	
		± ara-C		± 1 mM		B(a)P + CT ➤ -94 % B(a)P seul	
		± ANF		± 50 µM		1-NP + x 3	
		± CT		± 50 µM		1-NP + ara-C ➤ + 38 % 1-NP seul	
		± PBN		± 50 mM		1-NP+ CT = 1-NP seul	
<i>Mytilus edulis</i>	Cellules de glande digestive	± ara-C	<i>in vitro</i> (1 h à 15°C)	± 1 mM	% d'ADN dans la queue	1-NP+ ANF ➤ - 61 % 1-NP seul	Mitchelmore <i>et al.</i> , 1998 b
		± ANF		± 50 µM		1-NP+ PBN ➤ - 84 % 1-NP seul	
		± CT		± 50 µM		NF + x 4,5	
		± PBN		± 50 mM		NF + ara-C = NF seul	
		± ara-C		± 1 mM		NF + ANF = NF seul	
		± ANF		± 50 µM		NF + CT = NF seul	
		± CT		± 50 µM		NF+ PBN ➤ -88 % NF seul	
		± PBN		± 50 mM		DDC + x 6,1 (0,5 mM) et x 5,6 (5mM)	
		DDC		0,5-5 mM		DDC + PBN ➤ -21 % (0,5 mM)	
		± PBN		± 50 mM		et ➤ -26 % (5 mM) NF seul	

<i>Mytilus edulis</i>	Cellules de glande digestive	B(a)P	<i>in vitro</i> (6 h ± 12-24 h de délai)	0-0,05-0,25-0,5 µM			B(a)P à 0,05 µM = témoin + à 0,25µM x 1,4 à 6 h x 2,8 à +12 h et - à +24 h + à 0,5µM x 2,3 à 6 h x 4 à +12 h et x 8 à +24 h B(a)P (0,5µM) + CP - à 6h puis x 2,5 à +12h et x 4 à +24 h Cu à 0,5 µM = témoin - à 1,5µM à 6 h et à +12 h et x 2 à +24 h - à 3 µM pour 6 h et x 2,4 à + 12 h et x 8,4 à +24 h Cu (3 µM) + CP - à 6 h et à +12 h puis x 2 à +24 h	Steinert, 1996
		± CP			± 0,5 µM (prétraitement de 30 min)	Longueur de la queue		
		Cuivre	<i>in vitro</i> (6 h ± 12-24 h de délai)	0-0,5-1,5-3 µM				
		-	-	-		% d'ADN dans la queue	↗ des niveaux de base selon la technique de dissociation utilisée x 1,9 (0,01 % trypsine) et x 2,3 (0,1 % trypsine)	Birmelin et al., 1998
		B(a)P	<i>in vivo</i> (3-7-14 j)	nourriture quotidienne contaminée : <i>Isochrysis galbana</i> pré-exposées 12h à 0-0,5-20 µg/L		% d'ADN dans la queue	à 3 j ↗ x 1,25 et x 1,3 à 7j ↗ x 1,5 et x 1.2 à 14 j ↗ x 1,2 et - à 20 µg/L	Large et al., 2002
<i>Mytilus edulis</i>	Cellules branchiales	CdCl ₂	<i>in vivo</i> (28 j à 15°C)	0,2 mg/L			CdCl ₂ <i>in vitro</i> = témoin CdCl ₂ <i>in vivo</i> = témoin H ₂ O ₂ <i>in vitro</i> + x 1,2 CdCl ₂ <i>in vitro</i> + H ₂ O ₂ <i>in vitro</i> ↗ + 166 % H ₂ O ₂ seul CdCl ₂ <i>in vivo</i> + H ₂ O ₂ <i>in vitro</i> ↗ + 35 % H ₂ O ₂ seul à 100 µM uniquement Réparation retardée des dommages encore incomplète à + 20 h 25 % de dommages encore présents CdCl ₂ + MgCl ₂ (<i>in vivo</i>) + H ₂ O ₂ <i>in vitro</i> = CdCl ₂ <i>in vivo</i> + H ₂ O ₂ <i>in vitro</i> CdCl ₂ + ZnCl ₂ (<i>in vivo</i>) + H ₂ O ₂ <i>in vitro</i> ↘ - 55 % par rapport à CdCl ₂ <i>in vivo</i> + H ₂ O ₂ <i>in vitro</i>	
		CdCl ₂	<i>in vitro</i> (1 h ou 5 h)	0-0,7-1,5-15 mg/L				
		CdCl ₂ ± H ₂ O ₂	<i>in vitro</i> (1h) <i>in vitro</i> (1 h à 4°C)	0-0,7-1,5-15 mg/L ± 100 µM		% d'ADN dans la queue		
		CdCl ₂ ± H ₂ O ₂	<i>in vivo</i> (4 j) puis <i>in vitro</i> (1 ou 1,5 h)	0,2 mg/L ± 0-10-100 µM				Pruski et Dixon, 2002
		CdCl ₂ + (CdCl ₂ ou MgCl ₂) ± H ₂ O ₂	<i>in vivo</i> (4 j) <i>in vivo</i> (1 j) puis <i>in vitro</i> (1 h à 4°C)	0-0,2 mg/L + 0-2 mg/L ou 0-2 mg/L ± 100 µM				

	Cellules branchiales	H ₂ O ₂ NDMA	± AA ou α-T	<i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> (1 h à 15°C)	0-100-500- 1000 µM 0-5-25-100 mM	± 0,075 mg/ml ou ± 1 mg/ml (nourriture dans le cas de l' α-T)	classement empirique	H ₂ O ₂ <i>in vitro</i> ⚡ x 5 x 7 et x 7 H ₂ O ₂ <i>in vivo</i> ⚡ x 2 x 1,8 et x 1,8 NDMA <i>in vitro</i> ⚡ x 1,2 x 1,3 et x 1,8 Préexpositions des individus : acide ascorbique pas d'effet sur les dommages (H ₂ O ₂ et NDMA) α-tocopherol acétate ⚡ des dommages aux faibles doses de -10 à -50 %	Wilson <i>et al.</i> , 1998
<i>Mytilus edulis</i>		H ₂ O ₂			0-22,5-45-90 µM A : 0-0,5-1-2-5 mg/L (4,6-9,1- 18,2-45,5 µM) B : 0,01-0,05-0,1-0,5 mg/L (0,09-0,46-0,91-4,55 µM)			H ₂ O ₂ <i>in vitro</i> ⚡ x 5 x 8,75 et x 9,7 A : MMS <i>in vitro</i> ⚡ x 1,4 x 3,6 x 2,2 et x 2,3 B : MMS <i>in vitro</i> ⚡ x 6 x 5,65 x 10 et x 11 MMS <i>in vivo</i> Branchies : à + 2 j ⚡ dès 303 µM x 1,8 et à + 4 j ⚡ dès 9,1 µM x 3 x 5,3 x 3,3 et x 2 Hémocytes : à + 2 j ⚡ dès 91 µM x 2,3 et x 2,7 et à + 4 j ⚡ dès 9,1 µM x 2 x 3,7 x 2,9 - à 303 µM	Rank et Jensen, 2003
	Cellules branchiales Hémocytes	MMS		<i>in vivo</i> (2-4 j à 20°C)	0-1-3,33-10-33,3 mg/L (0-9,1- 30,3-91-303 µM)		Tail Moment		
<i>Mytilus edulis</i> <i>Bathymodiolus</i> <i>azoricus</i>	Cellules branchiales hémocytes	H ₂ O ₂		<i>in vivo</i> (1 j à 7°C) ou <i>in vitro</i> (1 h à 4°C ± 4 h de délai)	100 µM 100 µM		% d'ADN dans la queue	Branchies <i>in vivo</i> : <i>B. azoricus</i> x 1,75 (adulte) et x 1,9 (juvénile) <i>M. edulis</i> x 2 Hémocytes <i>in vivo</i> : <i>B. azoricus</i> x 3 (adulte et juvénile) <i>M. edulis</i> x 2 Réparation plus rapide chez les juvéniles, complète en 4 h contrairement aux adultes	Pruski et Dixon, 2003
<i>Mytilus edulis</i> , <i>Mya arenaria</i>	Cellules de glande digestive Hémocytes	<i>Arabian crude</i> <i>oil</i>		<i>in vivo</i> (7-12 j ou 6-11 j)	OWD 0,2 % (dispersion fioul- eau) WSF 1 % (fraction soluble)		Longueur de la queue	<i>M edulis</i> OWD + seulement à 7 j dans glande digestive (x 1,4) WSF + à 6 j dans glande digestive (x 1,3) <i>M arenaria</i> OWD = WSF = témoin	Hamoutene <i>et al.</i> , 2002

<i>Tapes japonica</i>	Cellules branchiales	B(a)P MNNG ENU MX Eaux ¹	<i>in vivo</i> (4 h à 20°C)	0-6,25-12,5-25-50 mg/L 0-6,25-12,5-25 mg/L 0-100-200-400-800 mg/L 0-0,63-1,25-2,5-5 mg/L 0-20-100% ou 0-20-40-60-100 %	% d'ADN dans la queue	<i>T. japonica</i> B(a)P ⚡ dès 25 mg/L x 1,6 et x 1,9 MNNG ⚡ dès 6,25 mg/L x 1,5 x 1,5 et x 1,6 ENU ⚡ dès 100 mg/L x 1,5 x 1,55 x 1,55 et x 1,7 MX ⚡ dès 1,25 mg/L x 1,3 x 1,4 x 1,9 Eaux 3 + sur les 5 échantillons	Sasaki <i>et al.</i> , 1997 c
<i>Patinopecten yeossensis</i>		B(a)P MNNG ENU MX	<i>in vivo</i> (4 h à 5°C)	0-12,5-25-50-100 mg/L 0-0,25-0,5-1 mg/L 0-100-200-400-800 mg/L 0-0,25-0,5-1-2 mg/L		<i>P. yeossensis</i> B(a)P ⚡ dès 12,5 mg/L x 1,7 x 1,8 et x 1,9 MNNG ⚡ dès 0,25 mg/L x 1,7 x 2,2 et x 2,3 ENU ⚡ dès 100 mg/L x 1,5 x 1,8 x 1,8 et x 1,7 MX ⚡ dès 0,5 mg/L x 2,4 x 2,2 et x 2,9	
<i>Perna viridis</i>	Hémocytes	B(a)P	<i>in vivo</i> (0-1-3-6-12 j à 20°C)	0-0,3-3-30 µg/L	% d'ADN dans la queue Longueur de la queue Olive Tail Moment	Olive tail Moment = % d'ADN dans la queue > longueur % d'ADN dans la queue : à 1 j ⚡ dès 30 µg/L x 1,25 à 3 j ⚡ dès 0,3 µg/L x 1,2 x 1,5 et x 1,8 à 6 j ⚡ dès 3 µg/L x 2 et x 2,2 à 12 j ⚡ dès 3 µg/L x 1,2 et x 1,3	Siu <i>et al.</i> , 2004
<i>Scarpharca ianequivalvis</i>	Hémocytes	CuSO ₄	<i>in vivo</i> (20 j à 12°C)	0-0,1 mg/L	% d'ADN dans la queue Longueur de la queue Tail Moment	+ seulement avec le paramètre Tail Moment (x 1,12)	Gabbianelli <i>et al.</i> , 2003
<i>Crassostrea virginica</i> , <i>Mercenaria mercenaria</i>	Hémocytes	H ₂ O ₂	<i>in vitro</i> (20 min à 4°C)	0-88 µM 0-44 µM	% d'ADN dans la queue Longueur de la queue Tail Moment	Tail Moment : <i>C. virginica</i> + x 2,5 (test comètes) et ⚡ + 70 % (test comètes + fpg) <i>M. mercenaria</i> + x 1,1 (test comètes) et ⚡ + 31 % (test comètes + fpg)	Gielazyn <i>et al.</i> , 2003

<i>Crassostrea virginica</i>	Hémocytes	AF +NDEA B(a)P + BA	<i>in vivo</i> par le sédiment (25-53 ± 25 j de délai)	6 + 6 µg/g et 12 + 12 µg/g 3 + 3 µg/g et 6 + 6 µg/g	Longueur de la queue	AF +NDEA à 25-53j et à +25 j = témoin B(a)P + BA à 25 j et à + 25j = témoin mais + à 53 j x 2 et x 2,1	Nacci <i>et al.</i> , 1996
<i>Tapes semidecussatus</i>	Cellules branchiales Cellules de glande digestive Hémocytes	2 sédiments : 1 référence estuaire Ballymacoda 1 contaminé (HAPs et métaux) estuaire Douglas (Irlande)	<i>in vivo</i> par le sédiment (7-14-20 j)	0,5 kg/L 0,5 kg/L	% d'ADN dans la queue	pas de ≠ suivant la taille et le poids des individus effets du développement des gonades : - hémocytes + x 1,4 branchies et + x 1,6 glande digestive effets de la saison : hémocytes - à 7 j au printemps et en été + en automne et en hiver x 1,2 en moyenne ; + à 14 j x 1,1 à x 1,5 et + à 20 j x 1,2 à x 2 Glande digestive : Automne toujours le plus significatif + à 7 j x 1,2 à x 1,9 ; + à 14 j x 1,3 à x 1,8 et + à 20 j x 1,1 à x 2,2 Branchies : Automne toujours le plus significatif + à 7 j x 1,1 à x 3 + à 14 j x 1,2 à x 3 et + à 20 j x 1,3 à x 2,8	Hartl <i>et al.</i> , 2004
					Tail Moment	Hémocytes + x 1,1 à x 1,2 ; Glande digestive + x 1,2 à x 1,5 ; Branchies + x 1,5 en moyenne	Coughlan <i>et al.</i> , 2002

Tableau VIII : Applications du test des comètes pour l'étude des dommages à l'ADN, avec des cellules de bivalves marins exposés au laboratoire en conditions contrôlées *in vitro* & *in vivo*

¹ eaux de 5 baies japonaises : Hachinohe, Nakatsu, Tokyo, Osaka et Kobe ; Les facteurs de variations (x) sont donnés à titre indicatif car ils ont parfois été calculés sur les figures lors de l'absence des tableaux de données ; + : dommages à l'ADN significatifs ; - : absence de dommages à l'ADN significatifs ; ↗ : augmentation des dommages à l'ADN ; ↘ : diminution des dommages à l'ADN ; = équivalence des dommages à l'ADN ; > niveaux de dommages à l'ADN supérieurs ; ≠ différence ; 1-NP : 1-nitropyrene ; 4-NQO : 4-nitroquinoline-*N*-oxide ; AA : acide ascorbique ; α-T : α-tocopherol acétate ; AAF : *N*-acétyl-2-aminofluorène ; AF : 2-aminofluorène ; B(a)P : Benzo(a)pyrène ; BA : benzo(a)anthracène ; ENU : *N*-éthyl-*N*-nitrosourée ; Fpg : Formamidopyrimidine glycosylase ; MMS : méthylméthane sulfonate ; MNNG : *N*-methyl-*N'*-nitrosoguanidine ; MX : chloro-3 dichlorométhyl-4 hydroxy-5(5*H*)-furanone-2 ; NDMA : *N*-Nitrosodiméthylamine ; NDEA : *N*-diéthylnitrosamine ; NF : nitrofurantoïne ; OWD : *oil-water dispersion* ; WSF : *water soluble fraction* ; ara-C : cytosine-β-D-arabinofuranoside ; CP : cyclophosphamide ; PBN : *N*-*N*-*t*-butyl-α-phénylnitrone ; DC dicoumarol ; 3AT : 3-aminotriazole ; ANF : α-naphtoflavone ; CT : clotrimazole ; DDC : acide diéthylthiocarbamique ; HAPs : hydrocarbures aromatiques polycycliques.

Organismes	Types cellulaires utilisés	Conditions expérimentales				Observations : dommages à l'ADN	Références
		Agents (substances) testés	Mode (durée) d'exposition	Gammes de concentrations (valeurs) testées	Expression des résultats		
<i>Dreissena polymorpha</i>	Hémocytes	T ± melphalan ± NaClO	<i>in vivo</i> ± <i>in vitro</i> (15 h ± 1h)	4-18-28-37° C (eau du lac Trasimeno (Italie)) ± 0-0,5-5 µg/mL à 28-37° C ou 0-10 µg/mL à 4-18-28-37° C	Tail Moment (TM)	T ➡ à partir de 18° C de x 1,5 à x 3,4 T+ 1 h (PBS) ➡ + 33 % et + 25 % à 18° et à 28° C par rapport à sans incubation T+ melphalan ➡ x 1,35 puis x 1,4 à 28° C x 1,05 puis x 1,2 à 37° C par rapport à T+ 1 h (PBS) T+ NaClO ➡ x 1,5 x 1,1 x 1,35 et x 1 par rapport à T+ 1 h (PBS)	Buschini <i>et al.</i> , 2003
		Pentachlorophénol	<i>in vivo</i> (7 jours)	0-10-80-100-150 µg/L	Tail Moment (TM) Longueur de la queue	➡ à partir de 80 µg/L x 2,4 x 2 et x 4,2 (TM) ou x 1,7 puis x 1,5 et x 2,5 (longueur) Pas d'effet dose	Pavlica <i>et al.</i> , 2001
<i>Unio tumidus</i>	Cellules de glande digestive	Acide tannique Acide ellagique Acide gallique ± H ₂ O ₂	<i>in vitro</i> (1 h à 5° C)	0-1-5-10-15-30-60-80-100-120-180-240 µM 0-1-5-10-15-30-60-80-100-120-180-240 µM 0-1-5-10-15-30-60-80-100-120-180-240 µM ± 0,04 ou 0,1 mM	Tail Moment (TM)	Tannins ➡ à partir de 10 µM Max à 60 µM : x 75 x105 et x110 pour chacun H ₂ O ₂ + x 105 à 0,1 mM et x38 à 0,04 mM H ₂ O ₂ + Tannins ➡ entre 1 et 10 µM de -50% à -500 % et ➡ ensuite avec maximum à 60 µM + 0,05 % + 20 % et + 30 % pour chacun par rapport à H ₂ O ₂ seul	Labienec <i>et al.</i> , 2003
		Pentachlorophénol		0-0,375-3,75-18,75-37,5-75 µM	Tail Moment (TM)	➡ à partir de 3,75 µM : x 20 x 40 x 44 et x 80	Milowska <i>et al.</i> , 2003
<i>Corbicula fluminea</i> , (ou <i>Dreissena polymorpha</i>)	Cellules branchiales	4-NQO NF B(a)P NDMA AAF Eaux (Rhin et Elbe, Allemagne)	<i>in vitro</i>	non communiqué (Synthèse de programme de recherche)	LOEC (low observed effect concentration)	+ 4-NQO (18,6 µg/L), NF (33 mg/L) et NDMA (26 mg/L) – B(a)P, AAF et échantillons d'eaux (0 positif sur 34 testés)	Reifferscheid et Grummt, 2000

Tableau IX : Applications du test des comètes pour l'étude des dommages à l'ADN, avec des cellules de bivalves dulçaquicoles exposés au laboratoire en conditions contrôlées *in vitro* & *in vivo*

Les facteurs de variations (x) sont donnés à titre indicatif car ils ont parfois été calculés sur les figures lors de l'absence des tableaux de données ; + : dommages à l'ADN significatifs ; - : absence de dommages à l'ADN significatifs ; ➡ : augmentation des dommages à l'ADN ; ➡ : diminution des dommages à l'ADN ; T : température ; 4-NQO : 4-nitroquinoline-*N*-oxide ; AAF : *N*-acétyl-2-aminofluorène ; B(a)P : benzo(a)pyrène ; NDMA : *N*-Nitrosodiméthylamine ; NF : nitrofurantoïne ; PBS : *Phosphate Buffer saline* ; NaClO : Hypochlorite de sodium

Les composés tels que le B(a)P, qui nécessitent une bioactivation métabolique, produisent des réponses plus homogènes *in vitro* qu'*in vivo*. C'est la glande digestive, organe de métabolisation par excellence qui exprime les plus forts taux de dommages suite aux expositions *in vivo* à des composés de ce type. Le taux de dommages moyen pour ces composés est généralement moins élevé que lors des expositions au peroxyde d'hydrogène. Ainsi on observe une proportion moyenne d'ADN dans la queue des comètes de $24,7 \pm 5,1$ % contre $61,4 \pm 5,1$ % pour des concentrations de 100 μM de B(a)P et d' H_2O_2 , respectivement dans des cellules de glande digestive de *Mytilus edulis* (Mitchelmore *et al.*, 1998 a). Pour le B(a)P, les augmentations des dommages à l'ADN consécutifs s'échelonnent entre des facteurs de 1,2 à 4,6 (Tableau VIII). Il est intéressant de noter que ce composé induit des dommages quelle que soit la voie d'exposition étudiée : le milieu (Sasaki *et al.*, 1997 c ; Siu *et al.*, 2004), l'alimentation (Large *et al.*, 2002) ou le sédiment (Nacci *et al.*, 1996).

En milieu dulçaquicole, les études sont moins nombreuses (tableau IX). Deux études concernent *Unio tumidus*, mais ne comprennent que des expositions *in vitro*. L'intérêt de l'étude de Milowska *et al.* (2003) réside dans l'approche multibiomarqueur utilisée : les dommages à l'ADN sont comparés aux dommages oxydatifs membranaires (fluidité et lipoperoxydation). Suite à l'exposition au pentachlorophénol, les changements de fluidité membranaire des cellules de la glande digestive apparaissent à des doses plus élevées que pour les dommages à l'ADN, soit à 18,75 μM contre 3,75 μM . Les niveaux de malondialdéhyde, marqueur de la lipoperoxydation, ne montrent aucune variation significative dans la gamme de concentrations étudiées (0-75 μM).

L'utilisation des cellules circulantes comme les hémocytes, est plus intéressante, surtout dans l'optique du développement du test pour son application lors d'études de terrain, car son prélèvement est pratique et non invasif pour les organismes ; un suivi des individus au cours du temps est de ce fait envisageable (Mitchelmore et Chipman, 1998 a). De plus, ce type cellulaire répond en terme de dommages à l'ADN mesurés par le test des comètes, à la fois aux substances chimiques (génétoxiques directs et génétoxiques nécessitant une activation métabolique) et aux échantillons de l'environnement (Nacci *et al.*, 1996). Il en est de même pour les cellules branchiales de bivalves (Sasaki *et al.*, 1997 c).

IV.2.A.b. Expositions *in situ*

Les études *in situ* sont de plus en plus nombreuses (tableau X) et concernent principalement *Mytilus edulis*. Elles correspondent essentiellement à des études de transfert avec encagement des individus sur différents sites. La majorité des auteurs s'accordent pour affirmer l'intérêt de ce test chez les bivalves lors d'études sur le terrain. Trois tissus, les branchies, la glande digestive et l'hémolymphe sont utilisés lors des études de terrain. En milieu d'eau douce, l'organisme utilisé pour la biosurveillance est la dreissène, *Dreissena polymorpha*. L'étude de Pavlica *et al.*, 2001, est plus une étude préliminaire avec cet organisme, car elle ne concerne qu'un seul site, en comparaison avec des expositions au laboratoire au pentachlorophénol. Les augmentations du niveau des dommages à l'ADN, relevées au laboratoire suite à des expositions de 7 jours à ce composé (gamme de concentration de 0 à 150 µg/L) sont supérieures à celle observée sur le terrain pour un transfert d'un mois en amont d'une station d'épuration. L'étude de Klobucar *et al.*, (2003), avec la dreissène est plus complète et s'intéresse également aux relations avec un autre marqueur de génotoxicité, les micronoyaux. Le classement des sites selon les deux paramètres de génotoxicité est proche même si la recherche de micronoyaux se révèle plus discriminante.

Steinert *et al.* (1998 a), lors d'une étude de transfert notent l'augmentation rapide, dès les onze premiers jours, du taux de dommages à l'ADN dans les hémocytes de *Mytilus edulis*. Rank (1999) observe un haut degré de dommages à l'ADN dans les branchies et les hémocytes de populations naturelles de cet organisme, sur les côtes danoises. Shaw *et al.* (2000), montrent que les taux des dommages sont plus faibles en hiver qu'en été et Steinert *et al.* (1998 b) l'influence de l'ensoleillement, en milieu naturel, sur le degré de dommages chez ce bivalve, traduisant la photoactivation de certains polluants tels les HAPs. La comparaison du niveau de dommage entre les individus transférés et les individus autochtones est un point intéressant (Steinert *et al.*, 1998 a ; Large *et al.*, 2002 ; Shaw *et al.*, 2002). Elle montre que les individus exposés de manière chronique aux polluants du milieu, peuvent être moins sensibles et exprimer peu de dommages à l'ADN, par rapport aux bivalves transférés de sites de référence « propres » vers des sites pollués. Ceci traduirait une adaptation due éventuellement à des systèmes de réparation plus efficaces, de meilleurs systèmes de défense et d'excrétion cellulaires ou des systèmes de métabolisation des promutagènes moins actifs. Des différences entre les sites sont souvent mises en évidence par rapport au site de référence dans les études

Organismes	Types cellulaires utilisés	Localisation	Suivi-Exposition	Expression des résultats	Observations : dommages à l'ADN	Références
<i>Mytilus edulis</i> (marin)	Cellules de glande digestive (et branchiales)	1 site de référence Loch Etive 1 site pollué (notamment par les HAPs) Loch Leven (Ecosse, UK)	4 prélèvements (2000)	% d'ADN dans la queue	Mars, avril, octobre : Loch Etive = Loch Leven Juillet : Loch Etive > Loch Leven (x 1,18) ↗ des niveaux de base en avril (+ 22 %) ↘ des niveaux de base en octobre (- 40 %)	Large <i>et al.</i> , 2002
	Cellules branchiales Hémocytes	4 stations dans la baie de Koge autour de points de déversement d'effluents de station d'épuration (Danemark)	Suivi sur 5 mois (été)	Tail moment	pas de ≠ entre les sites	Rank, 1999
	Hémocytes	Stations de référence sur les côtes Nord et Est de la Zélande (Danemark) et 4 stations dans la baie de Koge autour de points de déversement d'effluents de station d'épuration	Suivi sur 5 mois (été)	Tail Moment	<i>Etude préliminaire</i> + x 2,3 sur le site le plus éloigné des points de déversement Forte variabilité au cours des mois sur tous les sites	Rank et Jensen, 2003
	Cellules de glande digestive	1 site de référence Port Quin 1 site pollué (HAPs) Blackpool (Angleterre, UK)	5 prélèvements (1998)	% d'ADN dans la queue	en été Blackpool (x 1,42) > Référence en hiver Référence = Blackpool	Shaw <i>et al.</i> , 2000
		1 site de référence Port Quin 1 site pollué (PCBs) New Brighton (Angleterre, UK)	13 semaines (t0 et t13) (été 1998)	% d'ADN dans la queue	Référence t0 = autochtones = t13 encagés New Brighton autochtones (x 0,8) < t0 < t13 encagés (x 1,5)	Shaw <i>et al.</i> , 2002
	Hémocytes (spermatozoïdes)	1 station de référence et 5 stations dans la baie de San Diego (Californie, USA)	Transfert 0-11 et 33 jours	Longueur de la queue	Paleta creek = référence + à 11 j à Quaywall x 1,8 + à 33 j à Quaywall x 2,3, à End Pier 1&2 x 1,6 et x 1,8 et à Channel x 2	Steinert <i>et al.</i> , 1998 a
	Hémocytes	1 site de référence 1 site fortement contaminé par les HAPs dans la baie de San Diego (Californie, USA)	Transfert 0-5-14-32 jours à 0.3-1 et 3 m de profondeur	Longueur relative de la queue	Obscurité Référence = San Diego Ensoleillement Référence < San Diego de x 1,6 à x 1,25 mais ↘ des niveaux de dommages avec la profondeur	Steinert <i>et al.</i> , 1998 b

						Classement des sites selon les tissus :
<i>Bathymodiolus azoricus</i> (marin)	Cellules branchiales Hémocytes	3 sites au Sud-Ouest de l'archipel des Açores (Portugal) : Menez gwen, Lucky Strike et Rainbow (sources hydrothermales profondes)	Prélèvements (été 2001)	% d'ADN dans la queue	Branchies Menez gwen (x 1,1) > Lucky strike = Rainbow	Pruski et Dixon, 2003
					Hémocytes Menez gwen (x 1,4) > Lucky strike > Rainbow (x 0,8)	
					// au gradient de profondeur des sources et non au gradient de stress (Lucky strike : la + contaminée par les métaux)	
<i>Dreissena Polymorpha</i> (dulçaquicole)	Hémocytes	4 sites sur la rivière Sava 1 site de référence sur la rivière Drava (Croatie)	Transfert (30 jours)	Tail moment	<i>Pollutions industrielles et urbaines</i> Classement des sites : Sisak (x 5,3) > Oborovo (x 2,5) > Zagreb = Lukavek =Référence	Klobucar et al., 2003
		1 site sur la rivière Sava (Croatie) (11 km en amont de la station d'épuration de Zagreb) (Croatie)	Transfert (1 mois)	Tail moment	↗ x 2 par rapport aux témoins au laboratoire	Pavlica et al., 2001
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (marin)	Cellules branchiales	5 stations sur le Lagon d'Orbetello (Italie)	4 prélèvements (1998 - 1999)	Longueur de la queue	↗ des dommages // au gradient d'eutrophisation de x 1 à x 1,625 faible ↗ générale des niveaux de base à la fin de l'été	Frenzilli et al., 2001

Tableau X : Applications du test des comètes pour l'étude des dommages à l'ADN avec des cellules de bivalves marins et dulçaquicoles exposés *in situ*

Les facteurs de variations (x) sont donnés à titre indicatif car ils ont parfois été calculés sur les figures lors de l'absence des tableaux de données ; + : dommages à l'ADN significatifs ; ↗ : augmentation des dommages à l'ADN ; ↘ : diminution des dommages à l'ADN ; = équivalence des dommages à l'ADN ; > niveaux de dommages à l'ADN supérieurs ; ≠ différence ; // variations parallèles ; HAPs : hydrocarbures aromatiques polycycliques ; PCBs : polychlorobiphényles ; UK : Royaume Uni ; USA : Etats-Unis d'Amérique

de transfert, mais il faut souligner que les augmentations des niveaux de dommages à l'ADN, sur le terrain sont globalement plus faibles qu'au laboratoire.

Les concentrations de polluants rencontrées dans l'environnement sont de l'ordre du µg/L et les expositions *in situ* sont multiples avec des effets de synergies et d'antagonismes possibles. On peut alors s'interroger sur la représentativité de certains résultats au laboratoire lorsque de fortes concentrations sont utilisées. Ainsi Sasaki *et al.* (1997 c), ont exposé *Tapes japonica* au B(a)P à des concentrations de 0 à 100 mg/L. Le seuil en France, pour cette substance, qui définit la classe 4, où la qualité des eaux est considérée comme mauvaise, n'est seulement que de 5 µg/L (Système d'évaluation de la qualité de l'eau, 1997).

IV.2.B Autres organismes aquatiques

Les poissons sont avec les bivalves, les organismes aquatiques sur lesquels se sont principalement développées les applications du test des comètes. Les études avec les poissons se sont développées en premier lieu en eaux douces alors que les applications avec les bivalves concernent surtout le milieu marin. Des études avec des lignées cellulaires issues de tissus de poisson existent, notamment pour évaluer *in vitro* la génotoxicité d'échantillons aquatiques dans un souci de représentativité, comparativement aux cellules mammaliennes (Nehls et Segner, 2001 ; Avishai *et al.*, 2002 ; Kamer et Rinkevich, 2002 ; Kamman *et al.*, 2001)). *In vitro*, les études avec des cellules de poisson sont nombreuses (Annexe II) et les objectifs de développement et d'évaluation du potentiel du test des comètes comme outil de surveillance de la génotoxicité environnementale sont les principales justifications de ces études. Elles mettent en œuvre des expositions à des génotoxiques tels que H₂O₂, la MNNG et le B(a)P ou à des échantillons de l'environnement. La biosurveillance de la génotoxicité peut en effet soit se placer *in situ*, au niveau des écosystèmes aquatiques, soit indirectement se situer au laboratoire, avec des expositions à des échantillons environnementaux (Devaux *et al.*, 1997 ; Kamman *et al.*, 2000 ; Schnurstein et Braunbeck, 2001 ; Risso de Faverney *et al.*, 2001 b ; Rajaguru *et al.*, 2003). Les applications aux poissons suite à des expositions *in vivo* (Annexe III) sont aussi nombreuses que celles *in vitro* mais les types cellulaires employés sont plus diversifiés et ainsi les différences intertissulaires ont pu être étudiées (Deventer, 1996 ; Abd-Allah *et al.*, 1999 ; Sumathi *et al.*, 2001). Les études *in situ*, (Annexe IV) sont principalement conduites en rivières où l'influence de pollutions industrielles et domestiques

a notamment pu être recherchée (Devaux *et al.*, 1998 ; Bombail *et al.*, 2001 ; Larno *et al.*, 2001 ; Flammarion *et al.*, 2002 ; Roy *et al.*, 2003 b).

En milieu aquatique, les études avec les organismes animaux sont plus diversifiées qu'avec les végétaux. Des animaux les plus simples comme les amibes aux mammifères marins, les applications avec des animaux aquatiques, autres que les bivalves et les poissons, sont présentées en Annexe V. Ces études mettent en œuvre des expositions *in situ*, *in vitro* et *in vivo*. Les types cellulaires étudiés sont essentiellement des cellules circulantes (érythrocytes, coélomocytes...). Les résultats de l'application du test des comètes chez ces organismes aquatiques ne sont pas toujours probants. Ainsi De Boeck et Kirsh-Volders (1997) concluent négativement quant à l'intérêt du test des comètes avec l'annélide *Nereis virens*, à cause d'une grande hétérogénéité des résultats après des expositions au B(a)P et des dommages à l'ADN, réellement significatifs uniquement à la concentration élevée de 45 mg/L. De même, les travaux avec une lignée cellulaire de poisson (hépatome de truite) se sont révélés plus concluants que ceux sur l'ascidie, *Botryllus schlosseri* (Kamer et Rinkevich, 2002). Et même si les cellules de cet organisme pouvaient se révéler plus sensibles, des cellules présentant des dommages à l'ADN importants sont retrouvées dans les témoins dans une proportion non négligeable (34 %) et masque l'effet des expositions à H₂O₂. Les auteurs expliquent cela par les processus de différenciation cellulaire, très actifs chez cet animal au stade de blastogenèse utilisé, et faisant intervenir l'apoptose. Les applications avec les amphibiens se révèlent plus intéressantes en terme de biomonitoring de génotoxicité environnementale (Ralph et Petras, 1998 b ; Ralph et Petras, 1997), ainsi que les études avec les embryons de crevette (*Palaemonetes pugio*) au laboratoire. Avec cette dernière, l'utilisation d'endonucléases permet encore d'augmenter la sensibilité de l'essai, en autorisant la détection de dommages oxydatifs (Kim et Lee, 2004). Les applications du test des comètes sur les organismes aquatiques végétaux, se limitent pour l'instant aux algues unicellulaires (Annexe VI) et aucune étude *in situ* n'a été rapportée dans la littérature. Ces études correspondent à l'exposition des algues à des agents génotoxiques reconnus (directs comme H₂O₂ ou la MNNG) ou nécessitant une activation métabolique tel le B(a)P, le *N*-acétyl-2-aminofluorène (AAF) ou la *N*-nitrosodiméthylamine (NDMA) (Erbes *et al.*, 1997 ; Sastre *et al.*, 2001 ; Aoyama *et al.*, 2003). L'influence de la lumière est un paramètre à contrôler, lors d'étude de génotoxicité avec des algues unicellulaires (Erbes *et al.*, 1997 ; Sastre *et al.*, 2001).

V. La 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine (8-oxodGuo) chez les organismes aquatiques

La recherche des produits d'oxydation de base et de la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine (8-oxodGuo), en milieu aquatique, concerne principalement les poissons et les bivalves. Les applications de la recherche de produits d'oxydation de la guanine sont répertoriées dans les tableaux XI et XII.

On notera les études de Pagano *et al.* (2001 a et b) avec l'oursin violet (*Sphaerechinus granularis*) sur la génotoxicité du tamoxifène, du diépoxybutane et de la mitomycine C, qui ont permis de mettre en évidence l'implication du stress oxydant dans la toxicité de ces composés chez l'embryon. Les inductions de 8-oxodGuo sont associées à des anomalies de développement et à des mortalités embryonnaires. Les autres applications concernent des poissons et des bivalves marins et d'eau douce.

Les études *in vivo* en conditions contrôlées au laboratoire, avec des poissons correspondent à des expositions aiguës de quelques heures ou à des expositions de plusieurs jours. Les résultats des expositions en conditions contrôlées ne sont pas toujours concluants, même si les doses employées sont importantes.

Ainsi les expositions au *tert*-butyl hydroperoxyde, sur *Ictalurus punctatus* et *Ameiurus nebulosus*, réalisées dans le but de comparaisons interspèces, ne se sont pas traduites par une augmentation des niveaux de 8-oxodGuo, même en état de déplétion des niveaux de glutathion réduit cellulaire. Il est vrai que ces deux poissons d'eaux douces se montrent très peu sensibles à un stress oxydant (Ploch *et al.*, 1999). Cependant, Mitchelmore *et al.* (1996) notent la même absence de réponse chez trois espèces de poissons, le turbot (*Scophthalmus maximus*), la limande (*Limanda limanda*) et la sole (*Solea solea*).

On peut noter que globalement, lorsqu'une réponse est observée, les facteurs d'induction de la 8-oxodGuo sont inférieurs à ceux qui ont pu être observés par le test des comètes par exemple. On remarque également, que dans plusieurs travaux, les augmentations sont plus importantes aux plus faibles doses comparativement aux doses plus fortes. (Canova *et al.*, 1998 ; Akcha *et al.*, 2000 a ; Pagano *et al.*, 2001 a ; Rodriguez-Ariza *et al.*, 1999). Les auteurs ne discutent que très peu ce point. On peut envisager qu'à partir d'un certain niveau

Organismes	Organes	Substances testées		Gammes de concentrations testées	Durée d'exposition		Observations : niveaux de 8-oxodGuo	Références
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	branchies glande digestive	B(a)P		0-50-100 mg/kg (par la nourriture)	0-3-10-21 j (± 5-10 j de délai)		branchies - B(a)P = témoin glande digestive + x 2 à 50 mg/kg à 10 j et x 3,25 à 21j et - dès +5 j après la fin de l'exposition + x 1,8 à 100 mg/kg à 10 j et - à 21 j + 5 j et + 10 j	Akcha <i>et al.</i> , 2000 a
	branchies (glande digestive)			0-50 mg/kg (par la nourriture)	0-3-6-10-17-24-28 j		branchies - B(a)P = témoin Extraction chaotrope de -54 % par rapport à extraction phénol-chloroforme et -30 % par rapport extraction chloroforme-alcool isoamylique (- 72 % et - 76 % pour la glande digestive)	Akcha <i>et al.</i> , 2000 b
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	branchies glande digestive	B(a)P		0-0,5-5-50-100-500-1000 µg/L (par l'eau de mer)	48-72 h à 20°C		Branchies à 48 h + x 1,9 à 5 µg/L et x 1,6 à 500 et x 1,5 à 1000 µg/L à 72 h + x 2,1 à 5 µg/L x 1,6 à 50 µg/L x 3,4 à 100 µg/L et x 2 à 1000 µg/L glande digestive à 48 h + x 1,6 à 100 µg/L et x 2 à 1000 µg/L à 72 h ↗ dès 0,5 µg/L x 1,3 x 1,5 x 1,8 x 2 x 1,6 et x 1,8	Canova <i>et al.</i> , 1998
<i>Scophthalmus maximus</i> <i>Limanda limanda</i> <i>Solea solea</i>	foie	1-NP NF		0-0,5-5 mg/kg 0-5-50 mg/kg intrapéritonéale	48 h à 13°C		1-NP =NF = Témoin	Mitchelmore <i>et al.</i> , 1996
<i>Parophrys vetulus</i>	foie rein sang	NF		0-0,1-1-10 mg/kg 0-10 mg/kg (cinétique foie) intramusculaire	72 h ± 0-1-2-3-5-7 j de délai (cinétique foie)		foie ↗ dès 0,1 mg/kg (de x 8 à x 16) cinétique foie ↗ à +1j +2j et +3j x 4 en moyenne ↘ à + 5j et 7 j NF = témoin rein + x 2 à 10mg/kg sang + x 3 à 10mg/kg	Nishimoto <i>et al.</i> , 1991
<i>Sphaerechinus granularis</i>	Embryons (gastrula)	Tamoxifène		0-0,1-0,25-0,5-0,75 µM	72 h à 18°C		- à 0,5 et 0,75 µM + x 2 à 0,1 µM et x 2,9 à 0,25 µM	Pagano <i>et al.</i> , 2001 a
		DEB MMC		0-10-30-100-300 µM 0-1-3-10-30 µM			DEB ↗ dès 100 µM x 2,6 et x 4 MMC ↗ dès 1 µM x 3,5 x 6,1 x 6,7 et x 7,6	Pagano <i>et al.</i> , 2001 b
<i>Ictalurus punctatus</i> <i>Ameiurus nebulosus</i>	foie	BSO + DEM tBOOH	± tBOOH	1000 mg/kg + 0,6 mg/kg 0-40 mg/kg intrapéritonéale	24 h 6-12 et 48h	± 6-24 et 48h	tBOOH = témoin même en état de déplétion du glutathion cellulaire (prétraitement BSO + DEM)	Ploch <i>et al.</i> , 1999
<i>Sparus aurata</i>	foie branchie sang	CuCl ₂ Paraquat Malathion Diéldrine		0-0,17 mg/kg 0-42,5 mg/kg 0-6,38 mg/kg 0-0,6-0,85 mg/kg intrapéritonéale	2 j 7 j	0-8-24-48-72 h	CuCl ₂ = malathion = témoin Paraquat foie ↘ à 8 h et à 48 h (-25 et -50%) sang ↗ à 48 h (+33%) branchies ↗ à 8 h et à 48 h (+50 et + 80%) diéldrine foie + x 2,7 à 0,6 mg/kg et x 1,6 à 0,85 mg/kg	Rodriguez-Ariza <i>et al.</i> , 1999

Tableau XI : Travaux rapportés dans la littérature de l’application de la recherche de 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine (8-oxodGuo) comme marqueur des dommages oxydatifs à l’ADN, dans les tissus de poissons et d’invertébrés aquatiques exposés au laboratoire, en conditions contrôlées, *in vivo* : dosages en chromatographie liquide haute performance – détection électrochimique (HPLC-EC) pour toutes ces applications

Les facteurs de variations (x) sont donnés à titre indicatif car ils ont parfois été calculés sur les figures lors de l’absence des tableaux de données ; + : induction significative ; - : absence d’induction ; ↗ : augmentation ; ↘ : diminution ; = : équivalence des niveaux ; 1-NP : 1-nitropyrene ; B(a)P : Benzo(a)pyrene ; BSO : buthionine sulfoximine ; DEM : diethyl maléate ; DEB diépoxybutane ; MMC : mitomycine C ; NF : nitrofurantoïne ; tBOOH : *tert*-butyl hydroperoxide.

Organismes	Organes / tissus	Techniques utilisées	Localisation des sites	Suivi / Exposition	Observations : niveaux de 8-oxodGuo	Références
<i>Mytella guyanensis</i>	glande digestive	HPLC-EC	1 site de référence : rivière Ratones 1 site contaminé : rivière Itacorubi, (Ile Santa Caterina, Brésil)	<i>Individus autochtones</i>	Mangrove avec pollutions domestiques : Itacorubi (x 2,2) > Ratones	Aloisio Torres <i>et al.</i> , 2002
<i>Perna perna</i>	manteau glande digestive	HPLC-EC	1 site : Florianopolis, Ile Santa Caterina, (zone de mytiliculture, Brésil)	-	Analyse des niveaux de base : Manteau (+ 60 %) > GD	de Almeida <i>et al.</i> , 2003 a
<i>Perna perna</i>	branchies manteau glande digestive	HPLC-EC	1 site de référence : Florianopolis, 1 site pollué : North Bay Ile Santa Caterina, Brésil	12 mois : étude de transfert	Pollutions urbaines North Bay > Florianopolis mais ≠ tissulaires Glande digestive x 1,8 Branchies x 1,6 Manteau -	de Almeida <i>et al.</i> , 2003 b
<i>Saccostrea commercialis</i>	branchies	GC-MS (SIM)	1 site de référence : RedHead 1 site contaminé : Burwood (Australie)	3 mois : étude de transfert	Pollutions métalliques (Pb, Co, Ni, Hg) Burwood = RedHead	Avery <i>et al.</i> , 1996
<i>Unio tumidus</i>	branchies glande digestive	HPLC-EC	1 site de référence (C) 4 sites sur le bassin de la Moselle (1R, 2V, 3C, 4M en amont de Metz, France)	7-21 jours : étude de transfert	Etangs en voie d'abandon : Glande digestive à 7 j (C) = 1R = 3C < 2V=4M (x 3) et à 21 j (C) = 4M < 1R (x 1,7) < 3C (x 2) < 2V (x3) Branchies à 7 j : (C) = 1R = 3C = 2V= 4M à 21 j : (C) = 1R = 3C = 4M < 2V (x 1,45)	Charissou <i>et al.</i> , 2004
<i>Salvelinus namaycush</i>	foie	GC-MS (SIM) (8-oxoGua)	1 lac de référence : Shabogomo 1 lac contaminé : Wabush (Canada)	<i>Individus autochtones</i>	Pollutions métalliques (effluents de mine de fer) : Wabush = Shabogomo	Payne <i>et al.</i> , 1998
<i>Sparus aurata</i>	foie	HPLC-EC	1 site de référence : Puerto Real 1 site contaminé : San Fernando (chantier naval), Baie de Cadiz (Espagne)	<i>Individus autochtones</i>	Pollutions industrielles (HAPs, PCBs, métaux lourds...) San Fernando (x 1,5) > Puerto Real	Rodriguez-Ariza <i>et al.</i> , 1999

Tableau XII : Travaux rapportés dans la littérature de l'application de la recherche de 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine (8-oxodGuo) (8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) dans l'étude de Payne *et al.*, 1998) comme marqueur des dommages oxydatifs à l'ADN, dans les tissus de poissons et de bivalves exposés *in situ*

Les facteurs de variations (x) sont donnés à titre indicatif car ils ont parfois été calculés sur les figures lors de l'absence des tableaux de données ; + : induction significative ; - : absence d'induction ; = équivalence des niveaux ; > niveaux supérieurs ; < niveaux inférieurs ; GC-MS (SIM) : Chromatographie gazeuse - spectrométrie de masse (*selected ion monitoring*) ; HAPs : hydrocarbures aromatiques polycycliques ; HPLC-EC : chromatographie liquide haute performance - détection électrochimique ; PCBs : polychlorobiphényles.

de dommages, l'activation des systèmes de réparation des dommages oxydatifs intervienne et que consécutivement, les niveaux de 8-oxodGuo mesurés soient plus faibles car certains auraient déjà été pris en charge par la réparation.

Les travaux de Payne *et al.* (1998), ont mis en évidence des dommages oxydatifs à l'ADN, chez des poissons (*Salvelinus namaycush*) d'un lac recevant des effluents d'une mine de fer, mais ces dommages oxydatifs ne correspondaient pas à la 8-oxodGuo. Quatre produits avaient retenu leur attention : la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua), la 8-oxo-7,8-dihydroadénine (8-oxoAde), la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (Fapy-Gua) et la 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (Fapy-Ade). Aucune augmentation n'a été mise en évidence pour les niveaux de 8-oxoGua et de 8-oxoAde, alors que pour les produits résultant de l'ouverture des noyaux puriques (Fapy-Gua et Fapy-Ade), les concentrations augmentent d'un facteur de 2 à 2,7.

Quelques études concernent les bivalves. Au laboratoire, après des expositions au B(a)P, Canova *et al.* (1998), ont observé des réponses de type dose effet dans la glande digestive et les branchies de *Mytilus galloprovincialis*. Akcha *et al.* (2000 a et b), avec le même organisme, n'ont pas observé d'induction de 8-oxodGuo dans les branchies. Le mode d'exposition était différent dans ce cas, car le B(a)P était apporté par la nourriture. Dans la glande digestive, par contre une augmentation des niveaux a été reportée (Akcha *et al.*, 2000 a). Ces derniers travaux se sont intéressés en outre à l'influence de la technique d'extraction de l'ADN sur les niveaux de 8-oxo-2'-déoxyguanosine. Une réduction significative de ces niveaux par l'extraction chaotrope à l'iodure de sodium (NaI) a été observée dans les branchies et la glande digestive. Ce protocole d'extraction limite les artefacts d'oxydation lors de l'extraction de l'ADN comparativement aux techniques classiques d'extraction au phénol-chloroforme ou au chloroforme-alcool isoamylique (Akcha *et al.*, 2000 b).

In situ, on retiendra l'étude de Charissou *et al.* (2004), qui a montré l'applicabilité de la recherche de 8-oxodGuo dans les tissus d'*Unio tumidus* pour la détection de conditions de stress oxydant en milieu dulçaquicole. Les dommages oxydatifs étaient plus importants au niveau de la glande digestive des bivalves qu'au niveau des branchies. Les auteurs avaient associé ce paramètre à la mesure des taux de malondialdéhyde, marqueur de la lipoperoxydation membranaire dans une étude sur des étangs dans le bassin de la Moselle.

Les augmentations étaient parallèles au bout de 7 jours mais à 21 jours, une tendance au retour vers les niveaux de base était observée pour la 8-oxodGuo, alors que les niveaux de malondialdéhyde augmentaient.

MATERIELS ET METHODES

I. Matériels biologiques

I.1. Les bivalves

Les bivalves sont considérés comme de bons modèles reflétant la contamination des écosystèmes aquatiques (Meador *et al.*, 1995). De par leur position à l'interface eau-sédiment, les invertébrés benthiques intègrent les effets biologiques de l'exposition aux polluants de la colonne d'eau et du compartiment sédimentaire, ainsi que les flux de contaminants entre ces deux compartiments. Les bivalves bioaccumulent les contaminants organiques et minéraux (Scarpato *et al.*, 1990 ; Solé *et al.*, 1996), du fait de capacités de métabolisation des xénobiotiques réduites voire moins efficaces. Les temps de demi-vie de polluants tels les HAPs, sont nettement plus long chez les bivalves que chez les poissons (Stegeman et Lech, 1991 ; Meador *et al.*, 1995). Cela en fait de bons modèles d'étude pour évaluer le transfert des polluants dans la chaîne alimentaire.

I.1.A. *Mytilus edulis*

La moule marine *Mytilus edulis* a été utilisée comme nourriture contaminée par les polluants de la marée noire de l'Erika lors des expositions des rats par la voie alimentaire.

I.1.A.a. **Systématique**

Embranchement : *Mollusca*

Classe : *Bivalvia*

Ordre : *Mytiloida*

Famille : *Mytilidae*

Sous-famille : *Mytilinae*

Genre et espèce : *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758)

Nom commun : moule bleue, moule de bouchot.

I.1.A.b. Echantillonnage et conservation

Après le naufrage de l'Erika, les moules ont été collectées sur des sites impactés à divers degrés par la marée noire par les laboratoires de l'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, Nantes, 44) entre la fin de décembre 1999 et les premiers mois de l'année 2000. Elles ont été conservées à - 20°C et ont servi de source de contamination pour des rats exposés au laboratoire. La préparation des rations de moules a été effectuée par les laboratoires de l'IRH (Institut de Recherches Hydrobiologiques, Nancy, 54).

I.1.A.c. Préparation des rations de nourriture et analyses de contamination

Les moules congelées ont été ouvertes, les tissus mous homogénéisés par un broyeur à couteaux et conditionnés en rations de 12 à 15 g, chacune constituant un repas pour un rat. Les 16 HAPs reconnus prioritaires pour le biomonitoring environnemental par l'US-EPA (OFR, 1982) ont été analysés dans les moules par l'IRH (IRH, 2003). Nous avons choisi d'inclure la quantification des dérivés méthylés des HAPs et des thiophènes. Cette analyse a été réalisée par le Laboratoire Municipal de Rouen (76) par GC-MS après lyophilisation des échantillons. Pour l'analyse de HAPs, séparés par HPLC et détectés par un spectromètre couplé avec un détecteur UV/ barrette de diode, le protocole fourni par l'IRH est présenté en annexe VII.

I.1.B. *Unio tumidus*

Le bivalve dulçaquicole *Unio tumidus* a été utilisé lors des expositions au laboratoire.

I.1.B.a. Systématique

Embranchement : *Mollusca*

Classe : *Bivalvia*

Ordre : *Eulamellibranchiata*

Famille : *Unionidae*

Sous-famille : *Unioninae*

Genre et espèce : *Unio tumidus*
(Philipsson 1788)

Nom commun : mulette épaisse

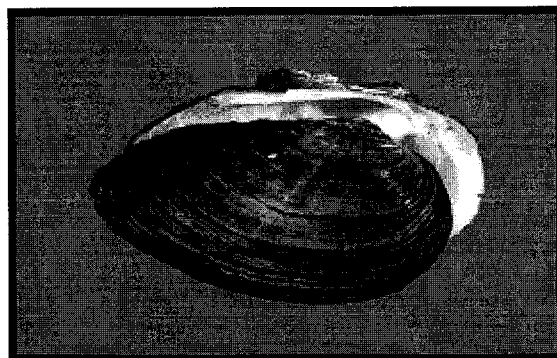


Figure 20 : photographie d'un *Unio tumidus* (échelle ½)

I.1.B.b. Morphologie et habitat

Mollusques aquatiques à symétrie bilatérale, les bivalves ont le corps plus ou moins aplati, protégé par deux valves toujours externes reliées par un ligament élastique et dont la fermeture est assurée par les muscles adducteurs. Deux larges expansions du manteau forment les lobes palléaux qui secrètent la coquille et délimitent la cavité palléale où font saillie les branchies, dont l'épithélium cilié génère un courant d'eau continu. Au cours de la période de reproduction, les larves ou *glochidii* sont protégées dans une poche incubatrice ou *marsupium* formée par une partie des branchies. Chez *Unio tumidus*, les branchies, généralement les deux plus externes, prennent alors une couleur laiteuse. La période d'incubation dure de l'automne au printemps où les larves sont libérées ; celles-ci parasitent ensuite les branchies et la peau de poissons à l'aide de crochets jusqu'à leur métamorphose en bivalve juvénile. Ce stade est responsable du « *glochidium* », pathologie fréquente chez les poissons de rivière. Microphages, les Lamellibranches se déplacent peu et se nourrissent par filtration de particules microscopiques en suspension. Les Unionidés (famille comprenant la plupart des espèces d'eau douce) sont largement répandus en Europe ; les espèces *Unio tumidus* et *Unio pictorum* sont essentiellement retrouvées dans le Nord et l'Est de la France. D'une taille de 11 cm de long et 6 cm de large en moyenne, *U. tumidus* a une coquille brun-vert extérieurement, et fortement nacré sur sa face interne. Il vit sur le fond des cours d'eau à faible courant et des étangs, à l'interface eau-sédiment, ce qui en fait un organisme de choix, puisqu'il peut être contaminé à la fois par l'eau et par les sédiments. D'autre part, sa faible mobilité autorise la mise en cage, lors d'études de transfert.

Un bioessai de toxicité aiguë sur larve d'*Unio tumidus* existe ; c'est un test de survie des *glochidii* (observation après coloration au rouge neutre) (Jacobson *et al.*, 1993). Les

travaux de Mouthon et Charvet (1999) ont montré que *Unio tumidus* se situait dans le groupe d'espèces les plus sensibles aux pollutions organiques avec *Pseudoanodonta elongata* et *Myxas glutinosa*. De nombreuses études au laboratoire permettent de le considérer comme un organisme bioindicateur de pollution fiable (Cossu, 1996, Cossu *et al.*, 1997 b, 2000 ; Charissou, 2002 ; Charissou *et al.*, 2004 ; Doyotte, 1998 ; Doyotte *et al.*, 1997 ; Vasseur *et al.*, 1999).

I.1.B.c. Echantillonnage et conservation des animaux

Les *Unio* utilisés pour les expositions au laboratoire proviennent d'un des étangs de la Maxe, situé près de Metz (57). Des analyses physico-chimiques des sédiments de ce site montrent une bonne qualité de l'étang (Annexe VIII) ; son relatif isolement et sa faible fréquentation permettent de le considérer comme site de référence. Une mise en stabulation d'un certain nombre d'individus a été nécessaire. Les bivalves prélevés sur le site, par fouille manuelle du sédiment, ont ensuite séjourné dans un bac, contenant du sable de Fontainebleau, de l'eau déchlorée, complémentée avec de l'eau du milieu (dont la proportion est progressivement diminuée), le tout thermostaté 17°C grâce à un système de refroidissement (KV400 KÜHLWASSERVERSORUNG). Ils ont été nourris par des cultures d'algues (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chlorella vulgaris* et *Scenedesmus subspicatus*) réalisées selon la norme AFNOR T90-304.

I.2. Rats Wistar

I.2.A. Systématique

Embranchement : *Chordata*

Sous-embranchement : *Vertebrata*

Classe : *Mammalia*

Ordre : *Rodentia*

Sous-ordre : *Sciurognathi*

Famille : *Muridae*

Sous-famille : *Murinae*

Genre et espèce : *Rattus norvegicus*

Souche : Wistar

I.2.B. Origine et conditions d'élevage

Les rats Wistar mâles, pesant entre 110 et 121 g, pour l'étude du transfert alimentaire ont été obtenus auprès de la société *Charles River Laboratories* (anciennement IFFACREDO, Les Oncins, Saint-Germain sur l'Arbresle, 69). Ils ont été acclimatés durant une semaine avant les expositions. Les étapes d'acclimatation, d'expositions et les sacrifices se sont déroulés à Nancy, à l'INSERM U420, selon les principes et législations en vigueur en France, pour l'expérimentation animale.

II. Protocoles expérimentaux des différents essais

II.1. Protocoles de prélèvements des tissus et obtention des suspensions cellulaires

II.1.A. Prélèvement du sang total des rats

Les échantillons de sang sont récupérés après le sacrifice des rats (par décapitation) dans des tubes héparinés et conservés (1 mL) avec 200 µL de PBS (0,01 M) supplémenté avec 10% de DMSO, à -196° C dans l'azote. La composition du tampon PBS (0,01 M) sans Ca^{++} ni Mg^{++} est donnée en Annexe IX. Après décongélation rapide des échantillons, ces derniers sont transférés dans 10 mL de sérum physiologique, additionné de 2 % de DMSO pour limiter l'agrégation des plaquettes (Currie *et al.*, 1998), et centrifugés à 150 g 7 minutes à 4° C pour enrichir les suspensions en cellules nucléées.

II.1.B. Prélèvements et obtention de suspensions cellulaires à partir des tissus solides de rat (Foie, Moelle osseuse)

Après dissection de l'animal, les foies sont conservés dans du PBS (0,01 M) supplémenté avec 10 % DMSO à -196°C dans l'azote. Cette étape de congélation est indispensable à l'obtention des suspensions cellulaires. Nous avons choisi une méthode non enzymatique pour la dissociation du foie afin d'obtenir les suspensions cellulaires. Cette méthode non enzymatique a été adaptée d'une technique développée préalablement au laboratoire sur les tissus d'*Unio tumidus* (Lemière, 2000). Après décongélation rapide, l'échantillon, conservé à -196°C dans 1 mL de tampon PBS - 10 % de DMSO, est transféré dans 15 mL de ce même tampon frais puis placé 5 minutes sous agitation légère. Le mélange est filtré pour éliminer les plus gros débris. Cette suspension subit ensuite une centrifugation différentielle à 4°C (100 g 5 minutes et 250 g 7 minutes). Cette procédure, permet la séparation des débris et l'isolation du type cellulaire sur lequel on souhaite travailler. Pour la moelle osseuse, les fémurs sont conservés à -20°C jusqu'à la préparation des suspensions cellulaires (dès le retour au laboratoire et dans les 6 h suivantes). Les fémurs sont déposés dans une boîte de pétri contenant 20 mL de Tampon PBS - 10 % DMSO. L'os est cassé en deux dans le sens de sa largeur puis ouvert à ses extrémités. Une pointe montée permet de gratter l'intérieur du fémur et le lavage s'effectue avec une micropipette (P 200). Après centrifugation (250 g 7 minutes à 4°C), les suspensions cellulaires sont conservées à -196°C après congélation progressive.

II.1.C. Prélèvement de l'hémolymphe chez *Unio tumidus*

Une seringue (1 mL) avec aiguille $\frac{3}{4}$ contenant 100 μL de PBS (0,01 M) sans Ca^{++} ni Mg^{++} , supplémenté avec 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) et contenant 0,01 M de Na_2EDTA , permet le prélèvement de 400 à 800 μL d'hémolymphe. Ce prélèvement s'effectue au travers du muscle antérieur, directement dans le sinus. La coquille du bivalve est maintenue entrouverte à l'aide d'un cône de micropipette le temps du prélèvement. Une certaine résistance à l'aiguille doit indiquer la contraction musculaire et l'entrée dans le sinus. Le prélèvement au travers du muscle postérieur est également possible mais plus délicat. L'hémolymphe prélevée est déposée soit dans un cryotube dans l'optique d'une congélation, soit dans un tube Eppendorff® si l'on souhaite travailler sur un prélèvement frais. Dans ce cas,

l'échantillon est centrifugé à 150 g pendant 5 minutes. Cette étape permet de concentrer l'échantillon de 2 à 5 fois, et d'obtenir ainsi une densité cellulaire satisfaisante. Le culot est remis en suspension dans un volume ajusté de milieu frais (PBS 0,01 M). Dans le cas de la congélation, celle-ci se fait progressivement : 10 minutes à 4° C, 4 heures à -20° C et 12 heures à -80° C, puis conservation à -196° C dans l'azote liquide. La décongélation doit être rapide ; une centrifugation, comme dans le cas d'un prélèvement frais permet d'obtenir une suspension cellulaire utilisable.

II.1.D. Prélèvement et obtention de suspensions cellulaires à partir des tissus solides (branchies et glande digestive) d'*Unio tumidus*

Le protocole pour les tissus d'*Unio tumidus* est proche de celui préalablement décrit pour le foie des rats (méthode non enzymatique). Après dissection de l'animal, les tissus sont conservés dans du PBS (0,01 M) supplémenté avec 10 % de DMSO à -196° C dans l'azote (congélation progressive comme dans le cas de l'hémolymph). Après décongélation rapide, l'échantillon tissulaire (5 cm² environ) est transféré dans 10 mL de tampon PBS (0,01 M) - 10 % DMSO, que l'on place 5 minutes sous agitation légère. Ce mélange est filtré pour éliminer les plus gros débris. Cette première suspension est ensuite soumise à des centrifugations différentielles. Les conditions (vitesses et temps) des centrifugations à 4° C sont les suivantes pour les branchies : 35 g 4 minutes 30 secondes (récupération des surnageants), 40 g 5 minutes (récupération des surnageants) et finalement 75 g 7 minutes (culot repris dans 350 µL de tampon PBS - 10 % de DMSO). Pour les glandes digestives, ces conditions sont : 30 g 7 minutes (récupération des surnageants) et finalement 80 g 7 minutes. Le culot est repris dans 250 µL de tampon PBS - 10 % de DMSO.

II.1.E. Qualité de la suspension cellulaire

Les suspensions cellulaires obtenues sont observées en microscopie optique, afin d'évaluer leur qualité en termes de pureté, de densité et de viabilité. Cette observation est réalisée à l'aide d'une coloration de viabilité au rouge neutre (solution à 1,65 g/L dans les proportions 1 : 3 ; v : v ; rouge neutre : suspension cellulaire). La coloration d'exclusion au bleu trypan (0,02 %) a également été utilisée. Les comptages sont effectués sur cellule de Mallassez en microscopie optique (objectifs x 40 et x 60).

II.2. Protocole expérimental du test des comètes

Cette technique d'électrophorèse de noyaux de cellules isolées en microgels d'agarose est applicable, en théorie à tout type de cellule eucaryote. Elle permet la détection des coupures simple et double-brin ainsi que des sites alcali-labiles à $\text{pH} > 13$. Le protocole suivi (figure 21) est adapté des travaux de Singh *et al.*, 1988. La composition des différents tampons et des solutions mères, ainsi que les références des principaux produits chimiques et du matériel utilisé sont données en Annexe X. L'utilisation d'un standard interne nous a semblé importante : il a consisté en une suspension du type cellulaire considéré, exposée au peroxyde d'hydrogène (250 μM , 1h à 4°C), aliquotée et analysée dans chaque test. Le déroulement du protocole se déroule sous lumière inactinique pour éviter d'induire des dommages artefactuels à l'ADN.

II.2.A. Dépôts des gels sur les lames

Les solutions d'agarose LMP (low melting point) sont maintenues à 37°C à l'aide d'un bain-marie. Les gels sont déposés sur les lames dans l'ordre suivant :

- 1^{ère} couche (à déposer la veille) : 90 μL d'agarose normal (0,8% dans du PBS (0,01 M)) sont étalés à l'aide d'un cône de micropipette. Polymérisation à température ambiante.
- 2^{nde} couche : 75 μL d'un mélange à volume égal, d'une suspension cellulaire (obtenue selon les protocoles décrits précédemment) et d'agarose LMP (bas point de fusion) à 1 % dans du PBS (0,01 M) sont déposés et recouverts d'une lamelle. Polymérisation à 4°C pendant 10 minutes. La lamelle est retirée délicatement.
- 3^{ème} couche : 75 μL d'un gel d'agarose LMP 0,5 % sont déposés, recouverts d'une lamelle et laissés à polymériser pendant 10 minutes à 4°C. La lamelle est retirée délicatement.

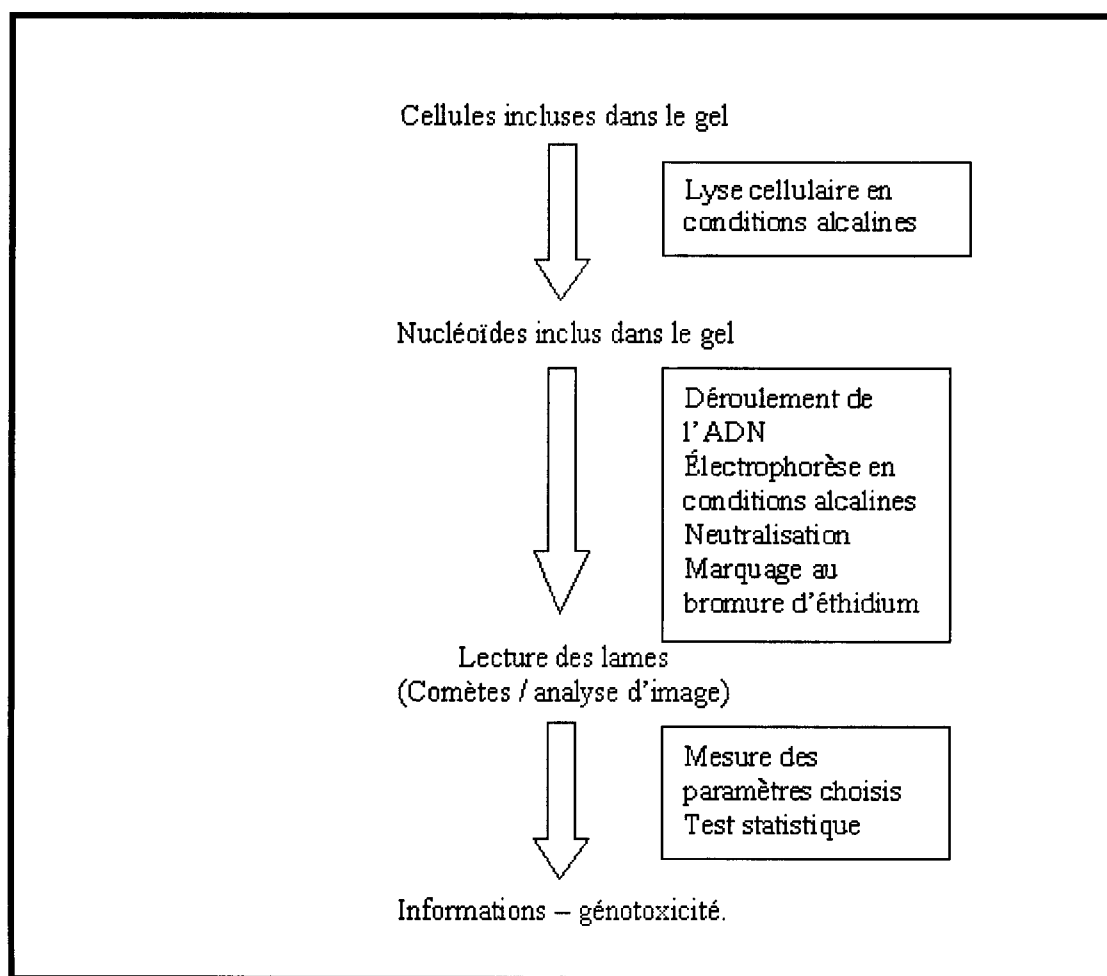


Figure 21 : Principales étapes du protocole expérimental du test des comètes

II.2.B. Lyse cellulaire

Les lames sont plongées dans une solution de lyse, maintenue à 4° C, qui permet la destruction de la matrice extracellulaire et de la membrane nucléaire. La composition de ce tampon de lyse est la suivante : 2,5 M de NaCl, 0,1 M de Na₂EDTA, 0,1 M de Tris (pH ajusté à 10 avec NaOH), 1% de *N*-laurylsarcosinate, auxquels sont ajoutés extemporanément 1% de Triton X100 et 10% de DMSO. Cette étape dure 2 h pour les cellules obtenues à partir des tissus solides et le sang périphérique, et ne dépasse pas 1 h pour les hémocytes.

Chaque composant de la solution joue un rôle particulier. NaCl participe à la dégradation des protéines, notamment des histones, ce qui permet une relaxation des molécules d'ADN. Na₂EDTA inhibe les nucléases, enzymes de dégradation de l'ADN en complexant les cofacteurs métalliques. NaOH et le Tris assurent des conditions alcalines. Le *N*-laurylsarcosinate inhibe les hexokinases et permet la solubilisation des protéines membranaires. Le DMSO est ajouté comme antioxydant. Le Triton est un détergent qui assure la destruction des membranes cellulaires et nucléaires.

II.2.C. Déroutement de l'ADN

Les lames sont rincées dans le tampon d'électrophorèse suite à l'étape de lyse, puis déposées dans la cuve électrophorétique. Le déroulement de l'ADN a lieu dans le tampon d'électrophorèse (0,3 M NaOH – 0,01 M Na₂EDTA, pH>13) durant 20 à 24 minutes selon le type cellulaire.

Cette étape est réalisée en conditions alcalines. Le pH élevé du tampon permet la visualisation des coupures simple-brin et l'expression des sites alcali-labiles, des conditions neutres ne permettant que la détection des lésions double-brin.

II.2.D. Electrophorèse

Les conditions d'électrophorèse sont les suivantes : 21 minutes, 300 mA, 20V (soit 1V/cm). Les molécules d'ADN, fragments libres ou molécules rattachées à la matrice nucléaire mais libres de migrer, chargées négativement du fait des groupements phosphates

externes, migrent alors vers l'anode, permettant d'obtenir les figures caractéristiques de comètes.

II.2.E. Neutralisation

Les lames sont plongées dans une solution de Tris (0,4 M ; pH 7,5) pendant 10 minutes. L'opération est renouvelée une fois. Cette étape est importante pour la lecture des lames. Elle permet de rétablir des appariements ponctuels des brins d'ADN et d'éliminer les alcalins et les détergents susceptibles d'interférer avec la fixation au bromure d'éthidium, l'agent intercalant utilisé.

II.2.F. Mise en attente des lames (déshydratation)

Cette étape est facultative. La déshydratation des lames se fait pendant 10 minutes dans un bain d'éthanol absolu. Les lames sont ensuite conservées à l'abri de la lumière et de la poussière jusqu'à l'étape de lecture.

II.2.G. Lecture des lames

Les noyaux sont colorés par 22 μL d'une solution à 20 $\mu\text{g/mL}$ de bromure d'éthidium, fluorochrome de type phénanthridinique dont la structure plane autorise l'intercalation entre les bases de l'ADN. Une lamelle est déposée sur la lame qui est lue à l'aide d'un microscope à épifluorescence, équipé d'un filtre dichroïque DM570 (filtre d'excitation : BP 510-550 nm ; filtre barrière : BA 590 nm), relié par une caméra CDD monochrome à l'analyseur d'image Komet 3 : 1 (Kinetic Imaging Limited, Liverpool, UK.). On réalise 3 réplicats par modalités et de vingt-cinq à cinquante cellules sur chaque lame sont analysées. Les lames sont codées, et lues aléatoirement sur la partie centrale du gel.

II.2.H. Paramètres mesurés, expression des résultats et analyse statistique

L'analyseur d'image Komet 3 : 1 propose une quarantaine de paramètres mesurés. Nous avons sélectionné :

- l'aire de la cellule (en μm^2),
- la longueur de la queue (*Tail Length*) (en μm),
- la proportion d'ADN présent dans la queue (*Tail DNA*) (en %),
- le rapport de la longueur totale de la cellule sur la largeur de la tête (L/H),
- l'*Extent Tail Moment* (μm) : produit du pourcentage d'ADN dans la queue par sa longueur
- et enfin l'*Olive Tail Moment* (pixels/ μm) : produit de la proportion d'ADN dans la queue avec la distance séparant le centre de gravité de la tête de celui de la queue.

Nous avons choisi d'exprimer le taux moyen de dommages à l'ADN par le pourcentage moyen d'ADN dans la queue. Les médianes, espaces interquartiles et les percentiles ont été calculés sur les distributions des paramètres au sein des populations cellulaires étudiées. Des classes arbitraires de pourcentage d'ADN dans la queue des comètes pour représenter les distributions cellulaires selon ce paramètre : 0-20 %, 20-40 %, 40-60 %, 60-80 % et >80 %. Nous avons utilisé des tests non-paramétriques pour l'analyse statistique des résultats (logiciels d'analyse Statistica (version 5.1) et Excel (version 9.0)), dans la séquence suivante :

- un test de Kruskal-Wallis (comparaison de moyennes sans condition de normalité des distributions),
- suivi d'un test de la médiane (comparaison des médianes)
- et de tests du χ^2 (comparaison des effectifs théoriques calculés les effectifs marginaux des tableaux de distributions avec les effectifs observés).

II.3. Protocole expérimental du dosage de la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine (8-oxodGuo)

La méthode utilisée pour le dosage des niveaux de 8-oxodGuo dans les tissus d'*Unio tumidus* est une méthode par chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à un détecteur électrochimique et à un détecteur UV, montés en série. La méthode originale correspond aux travaux de Shigenaga *et al.* (1994), modifiée par Doyotte (1998). La modification majeure apportée ici concerne l'étape d'extraction de l'ADN. Nous avons choisi une méthode chaotrope à l'iodure de sodium (NaI) qui permet de limiter les artefacts d'oxydation. Toutes les étapes d'extraction et d'hydrolyse de l'ADN sont réalisées après filtration (0,45 µm) et dégazage à l'azote de tous les tampons et des milieux réactionnels avant leur utilisation. Les échantillons destinés à la mesure de la 8-oxodGuo ont été transférés après dissection des bivalves dans des cryotubes et conservés à -196° C.

II.3.A. Extraction et hydrolyse de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été réalisée à l'aide d'un kit (*Oxytek DNA Isolation kit*, référence 0805001 de la gamme ZeptoMetrix) selon les recommandations du fournisseur. Les différentes étapes du protocole, de l'extraction à l'hydrolyse de l'ADN, effectuées à 4° C, sont listées dans le tableau XIII. On peut distinguer trois points essentiels au protocole d'extraction de l'ADN à partir des tissus (branchies, glande digestive) d'*Unio tumidus* :

- le premier point du protocole est l'isolation des fractions nucléaires. La majorité des macromolécules cellulaires (dont les ARN) est séparée des noyaux par une lyse cellulaire (surfactant non ionique). La solution de lyse a été additionnée de desferroxamine comme conseillé par la notice du fournisseur suite aux travaux de Helbock *et al.* (1998) et de Pouget *et al.* (2000) afin de limiter les dommages à l'ADN consécutifs à la préparation des échantillons.
- dans la seconde étape, la RNase A digère l'ARN des fractions nucléaires. Les échantillons sont ensuite incubés en présence de protéinase K et de dodécyl sulfate de sodium (SDS) pour libérer l'ADN des noyaux et digérer les protéines en polypeptides.

EXTRACTION DE L'ADN

- transfert de l'échantillon congelé de tissu (80 mg) dans un Potter manuel avec 1 mL de PBS (0,01 M) supplémenté de 5 mM de desferroxamine.
- broyage de l'échantillon (6 et 2 coups de Potter pour les branchies et la glande digestive respectivement), puis transfert de la suspension obtenue dans un microtube.
- centrifugation à 4° C, 1000 g, 6 minutes.
- récupération des culots dans 1 mL de PBS (0,01 M) supplémenté de 5 mM de desferroxamine.
- centrifugation à 4° C, 1000 g, 6 minutes. Cette étape de lavage est répétée.
- mise en suspension des culots dans 1 mL de solution de lyse supplémentée de 5 mM de desferroxamine.
- centrifugation à 4° C, 2000 g, 2 minutes et récupération des culots. Les deux dernières étapes sont répétées (3 fois en tout).
- ajout de 400 µL de solution de RNase A (solution fraîche à 250 µg/mL), puis incubation 1 heure à 37° C.
- ajout de 20 µL de solution de protéinase K (20 mg/mL), puis mélange par inversion 5 fois et incubation 1 heure à 55° C.
- centrifugation à 4° C, 10 000 g, 5 minutes et transfert du surnageant dans un nouveau tube.
- ajout de 600 µL de solution d'iodure de sodium.
- mélange par inversion cent fois (un précipité blanc se forme alors).
- ajout de 1 mL d'isopropanol et mélange par inversion cinquante fois (le précipité prend alors un aspect translucide).
- centrifugation à 4° C, 10 000 g, 5 minutes, puis élimination du surnageant et séchage des tubes.
- addition de 1,5 mL d'éthanol à 70 % froid (-20° C) et centrifugation à 4° C, 10 000 g, 5 minutes et élimination du surnageant. Cette étape de lavage est répétée (4 fois en tout).
- reprise du culot dans 50 µL d'acétate de sodium (20 mM ; pH 5)
- réfrigération 24 h pour dissolution complète du culot.
- calcul de la pureté et de la quantité d'ADN à partir de 5 µl de la suspension précédente (ratio des densités optiques à 260 nm et à 280 nm et densité optique à 260 nm).

HYDROLYSE DE L'ADN

- ajout de 155 µl d'acétate de sodium (20 mM ; pH 5) à la suspension d'ADN (45 µL).
- ajout de 4 µL d'une solution de nucléase P1 (3,3 mg/mL).
- incubation à 65° C pendant 10 minutes.
- ajustement du pH avec 20 µL de tampon Tris-HCl (1 M ; pH 8,5), puis hydrolyse des nucléotides en nucléosides, après 1 h de digestion par la phosphatase alcaline (1U/µL).
- arrêt de la réaction par l'ajout d'un volume de 114 µL de chloroforme.
- le mélange est vortexé puis centrifugé à 12 000 g 5 minutes à 4° C.
- dégazage de la phase aqueuse à l'azote et injection dans le circuit HPLC.

Tableau XIII : Séquence des différentes étapes du protocole d'extraction et d'hydrolyse de l'ADN à partir des tissus (branchies, glande digestive) d'*Unio tumidus* en utilisant le kit « Oxytek DNA Isolation kit », référence 0805001 de la gamme ZeptoMetrix

PBS : Phosphate buffered saline ; HPLC : chromatographie liquide haute performance.

- la dernière étape consiste en la purification de l'ADN par extraction à l'iodure de sodium (NaI). Les polypeptides et autres molécules organiques restent solubles pour des concentrations de NaI élevées alors que l'isopropanol va spécifiquement précipiter l'ADN. De brèves centrifugations successives permettent alors l'extraction et le lavage de l'ADN.

L'ADN est ensuite hydrolysé en nucléotides par la nucléase P1 et les nucléotides sont hydrolysés en nucléosides, après 1 h de digestion par la phosphatase alcaline.

II.3.B. Conditions chromatographiques, de détection et expression des résultats

Nous avons utilisé une colonne C18 Supelco LC-18 DB Supelcosil (longueur : 15 cm ; diamètre 4,6 mm ; porosité 3 μ m), équipée d'une pré-colonne LC-18 DB. La phase mobile consiste en un tampon phosphate de sodium (50 mM ; pH 5,5) supplémenté par 5 % de méthanol ultrapur (qualité Chromanorm), et filtré sur membrane de nylon (0,22 μ M). Les conditions de séparation sont les suivantes : le débit de la phase mobile est de 1 mL par minute et la colonne est maintenue à 25° C (four à effet Peltier).

La détection de la 7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine est réalisée par un détecteur UV à la longueur d'onde de 290 nm. La détection de la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine est réalisée par un détecteur électrochimique Coulochem ESA (5100), équipé d'une cellule analytique 5010 avec des potentiels d'électrode E1 et E2 de 125 mV et 350 mV, respectivement. La sensibilité du détecteur est fixée à 50 nA pour E1 et E2 et le potentiel de la cellule de conditionnement est de 110 mV avec une sensibilité de 1 μ A. Les deux détecteurs sont montés en série avec le détecteur électrochimique en premier. Des gammes d'étalonnage de 8-oxodGuo et de 7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine sont dosées en parallèle des échantillons, pour permettre l'analyse des chromatogrammes. Les niveaux de 8-oxodGuo et de 7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine sont calculés à partir des aires des pics sur les chromatogrammes et des gammes d'étalonnage. Les moyennes et les écart-types ont été calculés pour chaque individu et par modalité étudiée. Les différences sont mises en évidence par le test *t* de Student ($p \leq 0,05$) après vérification de la normalité des distributions.

II.4. Protocole expérimental de coloration et d'observation des micronoyaux

Les micronoyaux ont été observés au niveau du sang périphérique et de la moelle osseuse des rats suite à une exposition alimentaire avec des bivalves marins contaminés lors d'une marée noire.

Les lames ont été préparées à partir des suspensions cellulaires préparées comme précédemment décrit. Pour la moelle osseuse, les frottis sont fixés au méthanol pendant 12 minutes après étalement. Les lames sont plongées dans un bain de colorant May-Grünwald (solution-commerciale : eau ultrapure pH 7; 1:1; v:v) pendant 5 minutes puis colorées au Giemsa¹ (15 minutes dans une solution à 10 % de Giemsa dans un tampon Sorenson). Les lames sont au final lavées pendant 6 minutes dans de l'eau ultrapure dont le pH a été ajusté à 7. Le protocole pour les échantillons de sang périphérique est un peu différent : 500 µL d'échantillon sont mélangés à 250 µL de solution de Carnoy ; le frottis est réalisé et les lames sont colorées 3 minutes dans un bain de Giemsa, puis rincées à l'eau ultrapure (pH 7).

Les lames sont codées et lues aléatoirement en microscopie optique à immersion, à l'objectif x 1000, avec 2 ou 4 lames par animal. Seules les cellules avec un cytoplasme intact sont considérées. Pour chaque individu, 2000 cellules sont prises en compte. Les micronoyaux sont analysés selon les critères suivants (Countryman et Heddle, 1976) :

- le micronoyau ne touche pas le noyau principal,
- sa coloration est identique à celle du noyau,
- son diamètre est inférieur à $\frac{1}{3}$ de celui du noyau.

La comparaison des moyennes des fréquences de cellules micronucléées pour chaque modalité a été effectuée par le test U de Mann-Whitney.

¹ solution d'azur - éosine - bleu de méthylène.

III. Protocoles d'expositions

III.1. Expositions alimentaires de rats avec des bivalves contaminés par les polluants de marée noire

Ces expositions visaient à étudier chez les mammifères la génotoxicité associée au problème du transfert alimentaire des polluants depuis les bivalves, après une marée noire. Les expositions et les sacrifices se sont déroulés à l'animalerie et dans les laboratoires de l'INSERM à Nancy (54). L'étude des modifications de l'expression du cytochrome P450 1A et de l'induction de l'activité EROD (éthoxyrésorufine-*o*-dééthylase) a été réalisée en parallèle sur les animaux lors des différentes expositions (Chaty, 2003).

III.1.A. Etude des dommages à l'ADN suite à des expositions alimentaires

Les dommages à l'ADN ont été étudiés par le test des comètes suite à des expositions alimentaires de rats pendant 15 et 30 jours. Le protocole des deux expérimentations reste proche (Tableau XIV).

Des lots de 6 rats ont reçu comme nourriture des moules témoins ou des moules contaminées, durant 12 et 24 jours, à raison d'un repas de bivalves tous les deux jours (première expérience) et d'un repas de moules tous les jours (seconde expérience). Trois jours après le dernier repas de moules, les animaux ont été sacrifiés. Entre chaque repas de moules et durant la période des trois jours à la fin de l'exposition, les animaux ont reçu une nourriture standard (croquettes UAR, Epinay-sur-Orge). Les niveaux de contaminations des moules dans les deux expériences différaient (Tableau XIV). Les tissus ont été prélevés et conservés lors des différents sacrifices comme décrit précédemment.

	Première étude								Seconde étude									
	6 repas sur 12 jours				12 repas sur 24 jours				12 repas sur 12 jours					24 repas sur 24 jours				
	Témoin	Témoin Moules	Moules 85	Moules 480	Témoin	Témoin Moules	Moules 85	Moules 480	Témoin	Témoin Moules	Moules 310	Moules 570	Moules 870	Témoin	Témoin Moules	Moules 310	Moules 570	Moules 870
code des groupes	St 15	M ⁻ 15	M ⁺ 15	M ⁺⁺⁺ 15	St 30	M ⁻ 30	M ⁺ 30	M ⁺⁺⁺ 30	C 15	CM15	M ⁺ 15	M ⁺⁺ 15	M ⁺⁺⁺ 15	C 30	CM30	M ⁺ 30	M ⁺⁺ 30	M ⁺⁺⁺ 30
durée	15 jours				30 jours				15 jours					30 jours				
poids initial des rats									120 g									
rations de nourriture									13,5 g									

Contamination des moules par les HAPs (µg/kg matière sèche)

HAPs ¹	-	130	85	480	-	130	85	480	-	70	310	570	870	-	70	310	570	870
TEQs ²	-	15,5	2	3	-	15,5	2	3	-	6	34	82	179	-	6	34	82	179
HAPs méthylés ³	-	54	15	2097	-	54	15	2097	-	21	-	225	172	-	21	-	225	172
benzothiophènes ⁴	-	7	1	227	-	7	1	227	-	-	-	25	19	-	-	-	25	19

Tableau XIV : Récapitulatif des conditions d'expositions lors des deux premières expérimentations avec un repas de moules tous les 2 jours (première étude) et un repas de moules tous les jours (seconde étude)

¹ somme des concentrations en naphthalène, acénaphthylène, acénaphtène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, dibenzo(ah)anthracène, benzo(ghi)pérylène et indéno(1,2,3-cd)pyrène ; ² les TEQs (Toxic equivalent quantities) ont été calculées à partir des TEFs (Toxic equivalent Factors) définis par Nisbet et Lagoy, 1992 ; ³ somme des méthyl phénanthrènes et des méthyl chrysènes ; ⁴ somme des dibenzothiophènes et des benzo(b)naphthothiophènes ; HAPs : hydrocarbures aromatiques polycycliques

III.1.B. Etude de la réversibilité des dommages à l'ADN suite à des expositions alimentaires

Le schéma expérimental de cette dernière exposition est le même que dans la seconde expérience. Les dommages à l'ADN ont été étudiés par le test des comètes suite à l'exposition alimentaire de rats pendant 15 jours (Tableau XV). Des lots de 12 rats ont reçu comme nourriture des moules témoins ou des moules contaminées, durant 12 jours, à raison d'un repas quotidien de bivalves (figure 22). Trois jours après le dernier repas de moules, 4 animaux de chaque groupe ont été sacrifiés et ont constitué le point t0. Afin d'étudier une cinétique de réversibilité des effets, des rats ont été sacrifiés 7 et 14 jours plus tard, à raison de 4 animaux à chaque temps. Entre la fin de l'exposition et les sacrifices, les animaux ont reçu une nourriture standard.

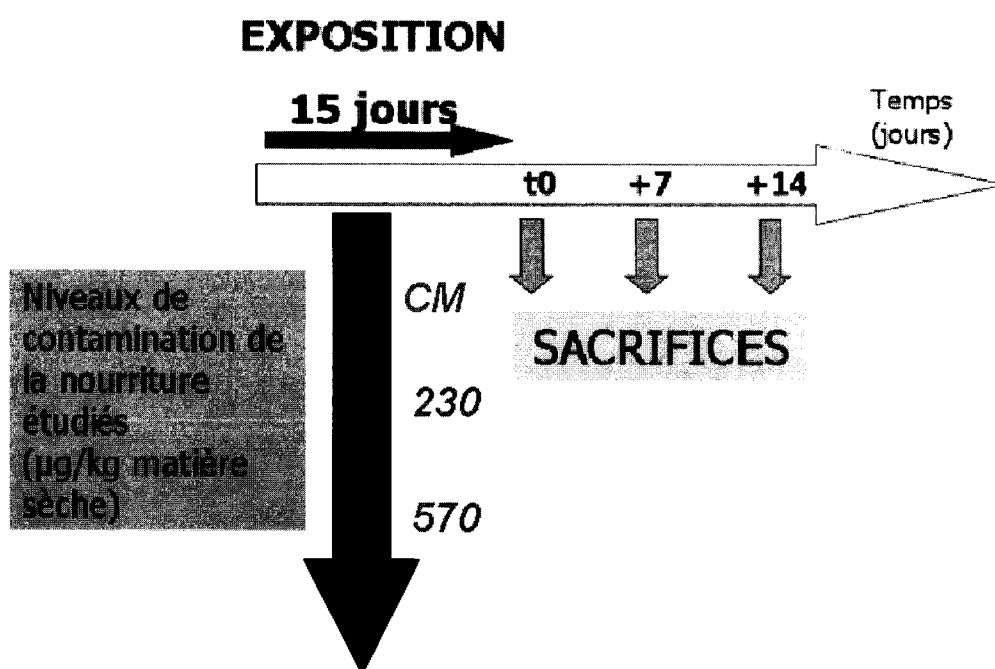


Figure 22 : Schéma expérimental de l'étude sur la réversibilité des dommages à l'ADN suite à l'exposition alimentaire (troisième étude)

Les niveaux de contaminations sont exprimés en µg de HAPs (somme des 16 de l'US-EPA) par kg de matière sèche (moules) ; CM : moules témoins.

Troisième étude (Réversibilité)			
code des groupes	12 repas sur 12 jours		
	Témoin Moules	Moules 230	Moules 570
	CM	M ⁺⁺	M ⁺⁺
durée	15 jours		
poids initial des rats	110 g		
rations de nourriture	13,5 g		
<u>contamination des moules par les HAPs (µg/kg matière sèche)</u>			
HAPs ¹	70	230	570
TEQs ²	6	31	82
HAPs méthylés ³	21	38	225
benzothiophènes ⁴	-	4	25

Tableau XV : Récapitulatif des conditions d'expositions lors de l'expérience sur la réversibilité des dommages à l'ADN suite à l'exposition alimentaire (un repas quotidien de moules sur 12 jours)

¹ somme des concentrations en naphthalène, acénaphthylène, acénaphtène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, dibenzo(ah)anthracène, benzo(ghi)pérylène et indéno(1,2,3-cd)pyrène ; ² les TEQs (Toxic equivalent quantities) ont été calculées à partir des TEFs (Toxic equivalent Factors) définis par Nisbet et Lagoy, 1992 ; ³ somme des méthyl phénanthrènes et des méthyl chrysènes ; ⁴ somme des dibenzothiophènes et des benzo(b)naphtothiophènes ; HAPs : hydrocarbures aromatiques polycycliques

III.2. Expositions *in vivo* au benzo(a)pyrène et au fer ferrique des *Unio tumidus*

Ces expositions avaient pour objectifs d'étudier les relations entre le dosage des taux de 8-oxodGuo et les niveaux de dommages à l'ADN mesurés par le test des comètes. Nous avons choisi d'inclure la mesure des taux de malondialdéhyde, marqueur de la lipoperoxydation, traduisant une cytotoxicité. Cet aldéhyde est reconnu comme génotoxique et peut produire des adduits à l'ADN (Nestmann *et al.*, 1996). Son dosage a été réalisé par le Dr Anne-Marie Charissou (2002).

Les travaux de Garçon *et al.* (2001) et de Garry *et al.* (2003 a et b), qui portaient sur des expositions intratrachéales de rongeurs à l'hématite et au B(a)P, ont montré des synergies de toxicité entre les deux composés. Ainsi, les auteurs ont montré des augmentations de MDA, des dommages à l'ADN mesurés par le test des comètes et de 8-oxodGuo dans les poumons des animaux. Nous avons souhaité étudier les possibles effets de synergies toxiques entre le B(a)P et le fer ferrique (chlorure de fer, FeCl₃) chez un invertébré, *Unio tumidus*.

Le tableau XVI résume la composition des différents milieux d'intoxication de l'exposition définitive. Cinq bivalves ont été exposés pendant 6 jours, avec un changement de milieu chaque jour. Le tiers-solvant utilisé pour le B(a)P est le diméthylsulfoxyde (DMSO). Le milieu d'intoxication correspond à de l'eau reconstituée (700 mL ; pH 7,5) et les expositions se sont déroulées à 19° C à l'obscurité dans des récipients en PVC de 1,5 mL. La composition de l'eau reconstituée est présentée en Annexe XI. Les animaux ont été nourris chaque jour, 1 heure avant le changement de milieu par 5 mL d'un mélange d'algues (cultures de *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chlorella vulgaris* et *Scenedesmus subspicatus* (3.10⁷ cellules par mL ; cultures réalisées selon la norme AFNOR T90-304). A la fin de l'intoxication, les glandes digestives et les branchies ont été disséquées et conservées à -196° C comme décrit précédemment pour les différents essais. Deux expositions ont été réalisées, du fait de problème d'analyse de certains échantillons lors de la première expérimentation.

<i>code des modalités</i>	Témoin	Témoin tiers-solvant (DMSO)	Fe ₁	Fe ₁ + DMSO	Fe ₂	Fe ₂ + DMSO	B(a)P ¹	B(a)P ²	Fe ₁ + B(a)P ¹	Fe ₂ + B(a)P ¹	Fe ₁ + B(a)P ²	Fe ₂ + B(a)P ²
Concentration finale en BaP en µg/L	0	0	0	0	0	0	50	100	50	50	100	100
Concentration finale en Fe³⁺ en mg/L	0	0	20	20	40	40	0	0	20	40	20	40
Nombre de réplicats	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Nombre d'individus	2 + 3	2 + 3	2 + 3	2 + 3	2 + 3	2 + 3	2 + 3	2 + 3	2 + 3	2 + 3	2 + 3	2 + 3
Volume final (mL)	700	700	700	700	700	700	700	700	700	700	700	700
Volume (mL) d'eau reconstituée	700	700	665	665	630	630	700	700	665	630	665	630
Volume (µl) de DMSO	0	350	0	350	0	350	175	0	175	175	0	0
Volume (µL) de la solution-mère de BaP ([BaP] = 200 mg/L)	0	0	0	0	0	0	175	350	175	175	350	350
Volume (mL) de solution de chlorure de fer ([Fe ³⁺] = 400 mg/L)	0	0	35	35	70	70	0	0	35	70	35	70

Tableau XVI : Composition des différents milieux d'intoxication de l'exposition définitive *in vivo* au Benzo(a)pyrène et au fer ferrique d'*Unio tumidus*

DMSO : diméthylsulfoxyde ; B(a)P : benzo(a)pyrène ; Fe : fer ferrique **Fe³⁺** utilisé sous sous forme de chlorure de fer (FeCl₃)

RESULTATS

La première partie de ce travail concernait l'étude des dommages à l'ADN consécutifs au transfert des polluants de marée noire –principalement des hydrocarbures aromatiques polycycliques- des moules aux mammifères par la voie alimentaire.

Le rôle des bivalves marins dans le transfert des phycotoxines est reconnu et a été largement étudié (Krys et Frémy, 2002). Mais, peu de données existent sur le rôle des invertébrés dans le transfert de contamination et de toxicité des contaminants et des agents génotoxiques par exemple, vis à vis des niveaux trophiques supérieurs et des mammifères. Des extraits organiques de moules peuvent présenter une toxicité mais ces effets toxiques n'ont été étudiés jusqu'alors que de manière indirecte. Ainsi, White *et al.* (1997) ont montré la génotoxicité d'extraits organiques de tissus de *Mya arenaria* et de *Mytilus edulis*, originaires du fjord du Saguenay (Canada) au moyen du SOS-chromotest. Des activités mutagènes d'extraits de mollusques (moules et patelles) avaient déjà été mises en évidence en 1984 par Kadhim et Parry, à l'aide de tests bactériens, non seulement dans les jours suivants un incident de pollution pétrolière mais toujours 12 mois après la contamination de l'environnement. Le problème du transfert des polluants depuis les bivalves avait été envisagé dès 1975 par Earampamoorthy et Koff qui soulignaient l'absence de connaissances scientifiques sur les risques sanitaires résultant des contaminations des moules par les pollutions industrielles, agricoles et pétrolières. Depuis, à notre connaissance, aucun travail expérimental ne s'est intéressé à ce problème.

Cette première partie visait à approcher le risque génotoxique lié à l'ingestion répétée de nourriture contaminée. Les résultats présentés correspondent à trois expérimentations. Les moules provenaient de sites plus ou moins impactés par la marée noire de l'Erika en décembre 1999. Des moules, en provenance de sites supposés non contaminés, ont été utilisées comme témoins additionnels. La génotoxicité a été étudiée au moyen du test des comètes dans les hépatocytes, les cellules de moelle osseuse et les cellules nucléées du sang périphérique.

La première étude concernait deux lots de moules contaminées (autour de 100 et de 500 µg/kg, somme des 16 HAPs dans la matière sèche), un lot témoin constitué de moules en provenance d'un site non impacté par la marée noire (La Mouclière, France) et un lot constitué par des croquettes pour animaux de laboratoire (nourriture standard, UAR, Epinay-sur-Orge, France). Les repas de moules s'effectuaient tous les deux jours.

Dans la seconde étude, trois niveaux de contamination de la nourriture ont été étudiés, avec des apports quotidiens de moules : 310, 570 et 870 µg/kg (somme des 16 HAPs dans la matière sèche). Un lot témoin constitué de moules en provenance d'un site non impacté par la marée noire (Les Saumonards, France) et un lot constitué par les croquettes UAR ont été étudiés simultanément.

Le dernier volet concernait l'étude de la réversibilité des effets observés dans les précédentes expérimentations. Elle a mis en œuvre des expositions alimentaires avec 2 lots de moules provenant de zones impactées (230 et 570 µg/kg, somme des 16 HAPs dans la matière sèche) et un lot correspondant à des moules non contaminées par la marée noire (Les Saumonards, France). Deux types de nourriture dans cette étude correspondaient à des lots précédemment étudiés (les moules témoins et les moules contaminées par 570 µg/kg, somme des 16 HAPs dans la matière sèche). L'évolution - réversibilité ou persistance - des dommages à l'ADN a été suivie sur deux semaines suite à une exposition alimentaire de quinze jours. Les différents lots de nourriture utilisés dans les trois études présentées, sont rapportées dans le tableau XVII.

	Fréquence des apports	Croquettes UAR	Moules Témoins		Moules contaminées (niveaux de contamination en µg/kg HAPs m.s.)					
			La Moulière	Les Saumonards	85	230	310	480	570	870
Première étude (Article 1)	un jour sur deux	X	X		X			X		
Seconde étude (Article 2)	quotidienne	X		X			X		X	X
Troisième étude (Article 3, Réversibilité)	quotidienne	X		X		X			X	

Tableau XVII : Récapitulatif des différents lots de nourriture utilisés dans les expositions alimentaires de rats avec des bivalves contaminés par les polluants de marée noire

Les niveaux de contaminations sont donnés en µg de HAPs (somme des 16 de l'US-EPA) par kg de matière sèche (moules).

Première étude (ARTICLE 1)

Génotoxicité consécutive au transfert des polluants de marée noire des moules aux mammifères par l'alimentation

(Genotoxicity related to oil spill pollutant transfer from mussels to mammals via the food)

Suite à la marée noire de l'Erika sur les côtes atlantiques françaises, des fiouls lourds contenant une proportion élevée d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) ont été relargués dans le milieu marin. Comme ces polluants sont susceptibles d'être bioaccumulés par les invertébrés, leur transfert dans la chaîne alimentaire est préoccupant. Cette étude visait à évaluer les effets génotoxiques éventuels, chez des rats nourris avec des moules marines (*Mytilus edulis*) contaminées lors du naufrage. Deux niveaux de contamination des moules par les HAPs ont été étudiés : autour de 100 et de 500 µg/kg de HAPs (somme des 16 HAPs de l'US-EPA dans la matière sèche). Des lots de 6 rats ont reçu comme nourriture des moules témoins ou les moules contaminées, durant 12 et 24 jours à raison d'un repas de bivalves tous les deux jours. Trois jours après le dernier repas de moules, les animaux ont été sacrifiés. Entre chaque repas de moules et durant la période des trois jours à la fin de l'exposition, les animaux ont reçu une nourriture standard (croquettes UAR, Epinay-sur-Orge), identique à celle utilisée pour les témoins. L'analyse chimique de la nourriture a été réalisée en parallèle aux essais biologiques. Les dommages à l'ADN ont été étudiés par le test des comètes, dans les hépatocytes, les cellules de moelle osseuse et les cellules nucléées du sang périphérique. Les micronoyaux ont été recherchés au niveau de la moelle osseuse dans les cellules polychromatiques érythrocytaires et au niveau des leucocytes circulants.

Les résultats des analyses physico-chimiques montrent des profils de contamination différents dans les moules échantillonnées sur les sites impactés par la marée noire, comparativement aux moules témoins. Ces dernières présentent des concentrations tissulaires en HAPs (133 µg/kg dans la matière sèche) correspondantes au niveau de contamination chronique des bivalves sur les côtes françaises (RNO, 2002). Ce niveau est supérieur au premier niveau de contamination de la nourriture étudié (85 µg/kg, somme des 16 HAPs dans la matière sèche).

Des dommages à l'ADN ont été observés dans le foie des rats recevant les moules les plus contaminées (480 µg/kg de HAPs dans la matière sèche (m.s.)). Dans la moelle osseuse, des dommages à l'ADN ont également été observés, mais à un degré plus faible et une légère augmentation de la fréquence des micronoyaux a été enregistrée. Aucune augmentation en terme de niveaux de dommages à l'ADN n'est observée entre les deux durées d'exposition dans ces deux tissus, alors que l'apport de nourriture contaminée était doublé sur la période d'un mois. Au niveau des cellules nucléées du sang périphérique, aucune différence n'est jamais observée entre les différents individus pour les deux paramètres de génotoxicité, comparativement au rats témoins qui ont reçu une nourriture standard non contaminée. Chez ces témoins, aucun effet génotoxique n'est jamais enregistré.

Cette étude montre l'apparition de dommages à l'ADN, principalement dans le foie, chez des rats nourris par des moules fortement contaminées suite à une marée noire. Ce travail souligne la biodisponibilité des polluants de marée noire dans les moules pour les consommateurs et l'utilité du test des comètes, en tant qu'outil de surveillance de la réponse biologique consécutive au transfert alimentaire des HAPs. La présence de congénères substitués des HAPs, comme les méthyl chrysènes et de dérivés comme les benzothiophènes, à des niveaux élevés, en plus des HAPs non substitués dans les fiouls lourds libérés et les bivalves, pose la question de leur implication dans les effets génotoxiques observés. Des compléments d'études sont nécessaires pour définir les niveaux de contamination sans effet pour les mammifères et l'étude de la réversibilité ou la persistance des effets génotoxiques observés, après les expositions apparaît indispensable.

GENOTOXICITY RELATED TO OIL SPILL POLLUTANT TRANSFER FROM MUSSELS TO MAMMALS VIA THE FOOD.²

LEMIERE Sébastien¹, COSSU-LEGUILLE Carole¹, BISPO Antonio², JOURDAIN Marie-José², LANHERS Marie-Claire³, BURNEL Daniel³ and VASSEUR Paule¹

¹ESE, CNRS FRE 2635, Université de Metz, UFR SciFA, Av. Delestraint, F-57070 Metz ;

²IRH Environnement, 11 bis rue G. Peri, BP 286, F-54515 Vandoeuvre-les-Nancy ;

³INSERM U420, Faculté de Médecine, 9 Av. Forêt de Haye, F-54505 Vandoeuvre-les-Nancy

Abstract : Heavy fuel oils containing high levels of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were released in the marine environment after the Erika oil spill on the Atlantic coast. As highly condensed PAH pollutants could bioaccumulate in invertebrates, their transfer through the food chain to vertebrates was of concern. This study aimed at estimating potential genotoxic effects in rats fed during 2 and 4 weeks with the marine mussels, *Mytilus edulis*, contaminated by oil pollutants. Two levels of PAH contamination were studied, around 100 and 500 µg total PAHs /kg dry weight (d.w.) in mussels. Genotoxic damage were investigated in rats by means of the single-cell gel electrophoresis (Comet) and micronucleus assays carried out in liver, bone marrow and peripheral blood.

DNA damage was observed in the liver of rats fed with the most contaminated mussels (500 µg PAHs /kg d.w.). In the bone marrow, DNA damage were observed too, but at a lower intensity than in the liver and a small increase in micronuclei frequencies was registered.

This work underlined the bioavailability of pollutants in fuel-oil contaminated mussels to consumers and the usefulness of the comet assay as a sensitive tool in biomonitoring to analyze responses to food PAH transfer. The occurrence of substituted PAHs and related compounds such as benzothiophenes in addition to non-substituted PAHs in fuel-oils and mussels raised the question of their implication in the genotoxic effects registered in rats.

Keywords : Polycyclic aromatic hydrocarbons, Erika wreck, Comet assay, micronuclei, DNA damage.

² *ARTICLE ACCEPTE dans ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY (WILEY)
Parution dans le volume 19 issue 4 (Juillet 2004)*

INTRODUCTION

The massive contamination of marine invertebrates after the wreck of the Erika in December 1999 along the French Atlantic coast raised the question of the transfer of fuel oil contaminants *via* the food and their subsequent toxicity to consumers. Indeed, the release of heavy fuel oils containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) of high molecular weight in the marine environment was of great concern. These pollutants, especially the congeners with five and six aromatic rings, are known for their mutagenic and/or carcinogenic properties (IARC, 1973, 1987). Therefore long-term effects could be suspected due to their transfer through the food chain up to mammals and/or humans (Nunn *et al.*, 1996). Seafood, especially invertebrates, could be a vector of contamination for consumers. Bivalves bioaccumulate xenobiotics, particularly PAHs (Scarpato *et al.*, 1990; Meador *et al.*, 1995; Solé *et al.*, 1996; Law *et al.*, 2002), which are metabolized and eliminated more slowly than in fishes (Stegeman and Lech, 1991). Whereas diolepoxides are formed in mammals, PAH metabolism in marine invertebrates, such as *Mytilus edulis*, has been described to follow the quinone pathway (Mitchelmore *et al.*, 1998). These metabolites are genotoxic in mammals and mussels (Jagetia and Aruna, 1997; Mitchelmore *et al.*, 1998).

It appeared that few data are available on the role of invertebrates in the transfer of PAHs towards higher trophic levels and mammals. The few studies related to secondary poisoning were mostly retrospective, and consisted in the comparison of food contamination levels and threshold limit values established for consumers or predators (Eason *et al.*, 1994; Gooneratne *et al.*, 1995; Loonen *et al.*, 1996; Spurgeon and Hopkin, 1996; Nendza *et al.*, 1997; Eason, 2002; Parzefall, 2002).

The aim of the present study was to estimate the potential genotoxicity for mammals due to ingestion of fuel oil contaminated mussels. After the Erika wreck, mussels (*Mytilus sp.*) were collected from sites of the Atlantic coast more or less impacted by the oil slick. Rats fed with these mussels during 2 and 4 weeks were investigated for genotoxic damage. Batches of mussels with different levels of PAH contamination were constituted in order to study dose-effects relationships in rodents receiving the contaminated seafood. Genotoxic injuries were measured in rats by means of the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay carried out in cells from the liver, the bone marrow and whole blood. In addition, the micronucleus assay was performed on blood and bone marrow samples.

The Comet assay is a microelectrophoretic technique of isolated nuclei in agarose gel, first described by Singh *et al.*, (1988). The DNA damage studied by this technique expresses not only direct single and double strand breaks but also alkali-labile sites and secondary damage consecutive to repair enzyme activity (Speit and Hartmann, 1995; Mitchelmore and Chipman, 1998). This assay is now commonly used in genetic toxicology on rats and mice. It is quite appropriate to study the differences in the tissue sensitivities of rodents exposed to genotoxic agents (Sasaki *et al.*, 1997a,b; Sasaki *et al.*, 2002; Sekihashi *et al.*, 2002; Tsuda *et al.*, 2000). The Comet assay had been used in parallel to the micronucleus test to study the consequences of unrepaired DNA breaks in dividing cells (da Silva *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2002).

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

N-laurylsarcosinate and Triton X100 were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). All other reagents were of analytical or molecular biology grade.

Preparation of mussels

Mussels were obtained from the IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'exploitation de la Mer) Centre in Nantes. They were collected in contaminated areas after the wreck of Erika and kept at -20°C . Two batches of mussels were constituted in order to study the effects of two levels of PAH contamination, around 100 and 500 μg total PAHs /kg dry weight in mussels, considering the 16 PAHs congeners listed by US-EPA (Environmental Protection Agency) for environmental biomonitoring.

For the preparation of food rations, frozen mussels were opened, soft tissues were mixed, homogenized in a grinder and conditioned in pools of 12 to 15 g (each constituting one meal).

PAH analyses in mussels

The 16 PAH congeners listed as priority pollutants by the US- EPA for environmental biomonitoring (OFR, 1982) were analyzed in mussels.

The quantification of PAHs was performed as follows. Samples were dried at 40°C until constant mass. Extraction of PAHs was conducted by ASE extractor (Accelerated Solvent

Extractor 200, from DIONEX, Sunnyvale, USA), allowing a solid/liquid extraction at 100°C and under a pressure of 136 bars, with dichloromethane and hexane as extraction solvents (ratio 50:50; v:v). After solvent evaporation in a nitrogen atmosphere, extracts were dissolved in acetonitrile. PAHs were separated and detected by reversed high performance liquid chromatography (HPLC), coupled with a spectrofluorimeter and a UV diode array detector. Concentrations were expressed by the mean values and standard deviation of independent measurements. Total PAH concentrations corresponded to the sum of the concentrations of the 16 analyzed PAHs. TEQs (Toxic Equivalent Quantities) to benzo(a)pyrene (B(a)P) were calculated using the TEFs (Toxic Equivalent Factors) as defined by Nisbet and Lagoy (1992). In addition, the identification of the methylated and related PAHs was performed by gas-chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) after lyophilisation of samples and extraction under warmth and pressure. Quantification limits (Q.L.) were 1 µg/kg d.w. for non-substituted PAHs excepted acenaphthylene (10 µg/kg d.w.), and dibenz(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perylene, indeno(1-2-3-cd)pyrene (5 µg/kg d.w.). Q.L. were 1 µg/kg d.w. for dibenzothiophenes, methyl phenantrenes and methyl chrysene, and 2 µg/kg d.w. for benzonaphthothiophenes.

Animal treatment

Wistar rats weighting 120 g were supplied by IFFACREDO (L'Arbresle, France). They had been acclimatized for one week before treatment. Four lots of twelve rats were randomly constituted. One lot of control rats (St) received only standard food (croquettes from UAR, Epinay-sur-Orge, France). The three other lots were fed with mussels (contaminated or not) every two days and were fed with standard food otherwise. One of the three lots received mussels (M⁻) which were supposed not to be contaminated by PAHs, sampled in the IFREMER station of La Moucliere (France), away from contaminated areas. The other two lots were fed with mussels containing about 100 µg total PAHs/kg dry weight (d.w.) mussels (M⁺) or 500 µg total PAHs/kg d. w. (M⁺⁺⁺). Six animals of each lot of rats were sacrificed after 15 days and the six other rats after 30 days. Animals were killed 48 h after their last meal of mussels. All collected tissues (liver, peripheral blood) were kept at -196°C in liquid nitrogen except for intact femurs which were kept at -20°C before bone marrow extraction. Cellular suspensions of bone marrow were prepared after the sacrifice of the animals by scraping and washing the inside of the femur with phosphate-buffered saline solution (Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ free, pH 7.4) (PBS), complemented with 10 % dimethylsulfoxide (DMSO) as a

cryoprotector. For this tissue, suspensions were kept at - 196°C after progressive freezing (4 hours at -20°C; one night at -80°C and -196°C in liquid nitrogen).

Alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay

DNA damage were quantified by means of the Comet assay as described by Singh *et al.* (1988) with minor modifications. Assays were performed under inactinic light at 4°C. Cellular suspensions from the liver were obtained by mechanical shaking of 150 mg tissue in 10 mL PBS with 10 % DMSO added as antioxidant before treatment. Differential centrifugation was used to isolate cells from other scraps. Suspensions of bone marrow cells, kept in liquid nitrogen, were thawed just before the assay. Circulating blood was diluted with physiological saline with 2 % DMSO added in order to limit platelet aggregation (Currie *et al.*, 1998) and the cell suspension was enriched by a single centrifugation.

Slides were prepared in triplicate for each sample. 300 µL of cell suspension were added to 300 µL of 1 % low-melting point (LMP) agarose. 75 µL were transferred onto slides, covered with a coverslip and left on ice 10 min to allow agarose to solidify. The coverslip was gently removed and a second layer (75 µL of 0.5 % LMP agarose) was spread, covered and left on ice for 10 min. After the removal of the coverslips, the slides were immersed in freshly prepared cold lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris – pH 10 – 1 % N-laurylsarcosinate, 1 % Triton X100 and 10 % DMSO) for 2 h in order to isolate the nuclei and eliminate the cytoplasm and membranes. Thereafter, slides were placed in an electrophoresis box, covered with electrophoresis buffer (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA) to allow DNA unwinding for 24 min, and then electrophoresed (300 mA, 21 min, 20 V). Slides were washed twice for 10 min in neutralizing buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) before dehydration in a batch of absolute ethanol for 10 min. Nuclear DNA was stained with 25 µL ethidium bromide (20 µg/mL) and observed under a UV light using an epifluorescence microscope (BX60 Olympus) equipped with a dichroic filter and connected to an image analysis system (Komet 3:1 Kinetic Imaging Ltd). Twenty-five cells were analyzed per slide, with 3 slides per animal, so that 450 cells were observed for each modality studied (25 x 3 x 6 animals). Cells were scored randomly on the central part of the gel. The percentage of DNA in the tail was chosen to express DNA damage because of the small interexperimental and interelectrophoresis variation registered using this parameter (De Boeck *et al.*, 2000).

Mean values and interindividual variability were calculated. Arbitrary classes of DNA damage were defined to present the distribution of cells according to the percentage of DNA

in the tail : 0-20 %, 20-40 %, 40-60 %, 60-80 % and >80 %. As Comet data were not normally distributed, non-parametric statistical tests were used. The Kruskal-Wallis and the median tests, applied on raw data, were used to compare the different modalities. Data distributions were analyzed by means of the Chi-square test. Differences in cells of treated rats as compared to controls (St) were considered as significant when $p \leq 0.01$.

Micronuclei assays

Micronuclei (MN) were analyzed in bone marrow and nucleated blood cells. Slides of bone marrow suspensions were prepared according to the May-Grünwald-Giemsa technique. Briefly, smears were fixed in methanol for 12 min after spreading. Then, they were stained in May-Grünwald (stock solution: water pH 7; 1:1; v:v) for 5 min, followed by 15 min in 10 % Giemsa (stock solution diluted with Sorenson buffer) and washed in water (pH 7) for 6 min. Slides of blood were prepared with 500 μ L samples mixed with 250 μ L of Carnoy fixing reagent. Slides were stained in Giemsa for 3 min and then, rinsed in water (pH 7).

Micronuclei were scored blindly under a 1000X magnification with two and four slides per animal, for bone marrow and circulating blood, respectively. For each individual and each tissue, 2000 cells were counted. Only intact cells with well-preserved cytoplasm were scored. Micronucleated cells were taken into account when the following criteria were fulfilled : MN not touching the main nucleus, similar staining to the nucleus, and a diameter smaller than one-third of the nucleus (Countryman and Heddle, 1976). A comparison of means of micronucleated cells for each treatment was carried out using Mann-Whitney U-test.

RESULTS

PAHs analyses of mussels

Standard food (St) was exempt from PAH contamination. Surprisingly, mussels sampled in a non-impacted area (M⁻) were not devoid of PAH contamination in the station of “La Mouclière”. Their tissue content of the 16 PAHs was 1.5 fold higher than in mussels (M⁺) sampled in an impacted site. The PAH contamination profiles of mussels were different in the impacted areas and the non-impacted areas (table 1). Benzo(b)fluoranthene and benzo(a)pyrene were present in the station of La Mouclière, while substituted and related PAHs were negligible compared to the heavily impacted area (M⁺⁺⁺). In the impacted sites,

the total of 16 PAHs was 5 fold in mussels (M^{+++}) (480 $\mu\text{g/kg d.w.}$) than in mussels (M^+) (85 $\mu\text{g/kg d.w.}$). Methylated PAHs and benzothiophenes were present at very high concentrations in mussels (M^{+++}), four times higher than the non-substituted PAHs. Therefore, TEQs based only on the 16 non-substituted PAHs were not sufficient to reflect PAH contamination in mussels after the Erika oil-spill.

DNA damage (Comet assay)

In hepatocytes, a higher level of DNA damage ($p \leq 0.01$) was observed in rats fed with the most contaminated food (M^{+++}) compared to control rats (St) (figure 1). The percentage of DNA in the tail of these cell populations averaged $17.3 \pm 3.6 \%$ and $14.5 \pm 1.3 \%$ after 15 and 30 days respectively (table 2). The intensity of the damage did not differ between animals which had been fed 6 mussel meals, and animals which had been fed 12 mussel meals.

No significant difference was found in hepatocytes of rats fed with standard food (St), (M^-) and (M^+) mussels. Basal level of DNA damage in controls was low with mean values of $4.7 \pm 1.6 \%$ and $3.8 \pm 1.1 \%$ DNA in the tail after 15 and 30 days, respectively. Damage levels ranged between 5.8-7.2 % in rats fed with mussels (M^-) and (M^+). In these three groups of animals, the majority of cells (between 93 and 96 %) presented little or no damage with less than 20 % of total DNA in the tail (figure 1).

In bone marrow cells, the basal level of damage in controls averaged 8 %. The level of DNA damage was globally higher in rats fed with mussels than in rats fed with standard food (figure 2). A significant increase of damage was observed in rats fed with mussels (M^{+++}) after 15 days ($p \leq 0.01$), with an average value of $12.5 \pm 5.3 \%$ DNA in the tail compared to control rats ($8.1 \pm 1.5 \%$). The percentage of cell populations with a level of damage in the range 40 %- 60 % was higher in rats (M^{+++}) than in the other groups (table 2). After 30 days, the level of damage was of the same order of magnitude than after 15 days of experiment. Once again, rats fed with mussels (M^{+++}) presented the highest percentage of cells with 40 %- 60 % damage compared to controls and to rats fed with (M^-) and (M^+) mussels (figure 2).

In blood cells, no difference was observed between the animal groups, whatever the type of food – standard or mussels-, and the number of mussel meals given (figure 3). Baseline level

was $7.7 \pm 1.4 \%$ and $8.8 \pm 2.4 \%$ in control rats after 15 and 30 days of experiments, respectively (table 2), and of the same order of magnitude than in the bone marrow.

Micronuclei

A slight increase in the number of micronucleated cells was observed in the bone marrow of rats fed with mussels (M^{+++}) after 15 days ($p \leq 0.01$), but no significant increase was found after 30 days (figure 4a). The frequency of micronucleated cells was $2.2 \pm 0.8 \text{ }^0_{/000}$ after 6 meals and $2 \pm 0.3 \text{ }^0_{/000}$ after 12 meals delivered during 15 and 30 days respectively. Basal frequencies in the bone marrow were $0.7 \pm 0.6 \text{ }^0_{/000}$ after 15 days and $1.1 \pm 0.5 \text{ }^0_{/000}$ after 30 days.

In circulating blood, micronucleated cell frequencies were equivalent in each animal group (figure 4b). No incidence due to contaminated food ingestion was observed. Globally, the mean frequency of micronucleated cells was $1.2 \pm 0.6 \text{ }^0_{/000}$.

DISCUSSION

This study demonstrated the occurrence of genotoxic damage due to the consumption of the Erika's pollutant-contaminated mussels. DNA injury was observed mainly in rats fed with the most contaminated bivalves which contained non-substituted PAHs in addition to methylated PAHs and benzothiophenes. Genomic damage was registered in the liver and to a lesser extent in the bone marrow of these animals, but not in circulating blood cells. The examination of micronuclei confirmed the results of the Comet assay in the bone marrow at 15 days. It would have been interesting to analyze micronuclei in the liver as well, but this could not be done for practical reasons and tissue preparation. Vodicka *et al.*, (2001) also observed a strong correlation between the DNA damage measured by the comet assay and micronuclei in the bone marrow of rats exposed to styrene atmospheres (750 and 1500 mg/m³ during 1 to 21 days).

In the present study, the DNA damage remained moderate, with an average level of DNA in the tail not exceeding 20-40 %. The percentage of DNA altered cells was higher in the hepatocyte population than in bone marrow cells. The greater sensitivity of the liver compared to tissues such as the bone marrow, stomach or colon, was also registered in mice and rats

exposed to genotoxic compounds such as methylmethane sulfonate (MMS), aflatoxin B1, or azobenzene (Sekihashi *et al.*, 2002) and in mice exposed to azo-compounds (Tsuda *et al.*, 2000). The absence of genomic alterations in blood cells could be explained by the fact that the spleen of rats, by contrast to the spleen of mice, may eliminate micronucleated cells (Wakata *et al.*, 1998).

The responses registered after 15 and 30 days of experiment were similar, despite the fact that rats received twice the amount of contaminated food after 30 days. Moreover, a tendency to a decrease of genotoxic effects at 30 days, although not significant, was noted in the liver. It seems that a balance between DNA damage and repair had settled.

Our experimental design, characterized by a regular consumption of contaminated food, was close to the one followed by Fouchecourt *et al.*, (1999), in case of rat exposure to PAHs-contaminated litters (between 100 and 700 mg PAHs per kg of soil d.w.). The authors found DNA adducts in the lungs and the liver of the animals in contact with PAH contaminated soils. Further comparisons with our results are difficult, because the composition of the PAH fraction differed from the present study.

Even if the profiles of contamination of mussels sampled in a non-impacted area (M^-) and mussels (M^+) were different, the effects observed in rat tissues were equivalent. Chemical analyses revealed a level of 133 μg total PAHs /kg d.w in these mussels (M^-) which were supposed to be exempt of PAH contamination. In fact, this PAHs level is close to the range 100-125 $\mu\text{g/kg}$ d.w. which appeared to be the chronic contamination threshold of seafood along the French coasts (RNO, 2002). This contamination threshold is not negligible, as demonstrated by the genotoxic effects registered here in mammals.

Although the DNA damage measured in mammals can be attributed to the non-substituted PAHs known for their genotoxicity, other compounds can be involved. Other PAH derivatives, such as methyl chrysene and thiophenes found in mussels, could contribute to the observed damage. PAHs represented 3.3 % (in weight) of the Erika fuel oil, while the fraction of the 16 PAHs classically analyzed corresponded to 0.3 %. Furthermore, approximately 190 PAH relatives were identified in the fuel oil (Tronczynski *et al.*, 2002). Consequently, TEQs based on the 16 US-EPA PAHs are not sufficient to reflect food contamination and, at least, should include related and substituted PAHs. Unfortunately, TEFs had not yet been established for these categories of compounds.

Recently, Binet *et al.*, (2002) who reviewed bitumen fumes, insisted on the necessity to take thiophenes into account in chemical analyses because of their suspected carcinogenic potential. The thiophene compounds present in our samples possess mutagen properties similar to benzo(a)pyrene (Sinsheimer, 1992). Histological abnormalities (peribiliary fibrosis and hyperplasia), were observed in rats receiving a diet contaminated with benzothiophene in the range 0.5 - 500 ppm during thirteen weeks (Poon *et al.*, 1998).

Methylated PAHs, with a total reaching 1900 µg/kg d.w. in mussels sampled in the most contaminated areas (M^{+++}), should be considered for their genotoxic effects. Borosky (1999) underlined that a methyl substitution could lead to an increase in carcinogenicity. Methylchrysene found in mussels could also explain in part the genotoxicity registered in rats. In addition, it would be worth to take into consideration not only the parent PAHs, but also their metabolites generated in bivalves. For instance, quinones - the major metabolites of PAHs in mussels - should be considered (Mitchelmore *et al.*, 1998).

After the wreck of the Erika, a guide-value for PAHs in marine products contaminated by the oil spill had been established by AFSSA (2000). A total of 500 µg PAHs/kg d.w. was a threshold above which the selling of seafood to consumers was forbidden. From the present results, it cannot be said that this threshold is relevant. First, because only the 16 PAHs selected in biomonitoring by US-EPA were taken into account in the recommended level : it is clear that other genotoxic derivatives should be measured. Secondly, the genotoxicity was registered in rat tissues at this level of mussel contamination. Thirdly, as DNA damage was liable to be repaired, a survey of the kinetics of repair over time is necessary to analyze the toxic risks to consumers. Further experiments are necessary to answer that question. We have undertaken the study of DNA recovery in rats after mussel ingestion, and this work is in progress.

CONCLUSION

The present study showed that genotoxic damage was found in rats fed with heavily contaminated mussels, and mainly in the liver. Although it can be postulated that non-substituted PAHs are involved in DNA damage, other pollutants such as methyl chrysene and thiophenes found in mussels at high concentrations could contribute to the genotoxicity observed in rats. Our experimental design was based on a regular consumption of contaminated food during 15 and 30 days. No increase in DNA damage was registered when the number of meals was doubled over the 30-day period.

DNA damage measured by means of the Comet assay appeared a sensitive criteria for assessing bioavailability and genotoxicity of food pollutants in consumers. Absence of risks inherent to the consumption of contaminated seafood could not be asserted through this experiment. Complementary studies are being conducted to define thresholds of mussel contamination which could be safe for mammals and to study reversibility or persistence of genotoxic effects after the contaminated food ingestion.

Acknowledgements : *This research was supported by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development. We thank IFREMER teams for their collaboration in providing us with contaminated mussels and especially Dr Hélène Jeanneret for her efficient scientific contribution. The authors acknowledge Dr Laurence Flucha for her help in correcting the English form of the paper.*

REFERENCES

- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA). 5 février 2000. Avis du groupe d'experts réunis par l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur les critères de toxicité alimentaire présentés par la pollution engendrée par le naufrage de l'ERIKA. Maison-Alfort, France. 7 p.
- Binet S, Pfohl-Leszkowicz A, Brandt H, Lafontaine M, Castegnaro M. 2002. Bitumen fumes: review of work on the potential risk to workers and the present knowledge on its origin. *Sci Total Environ* 300(1-3):37-49.
- Borosky GL. 1999. Theoretical study related to the carcinogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives. *J Org Chem* 64:7738-7744
- Countryman PI, Heddle JA. 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* 41(2-3):321-331.
- Currie LM, Livesey SA, Harper JR, Connor J. 1998. Cryopreservation of single-donor platelets with a reduced dimethyl sulfoxide concentration by the addition of second-messenger effectors: enhanced retention of in vitro functional activity. *Transfusion* 38(2):160-167.
- De Boeck M, Touil N, De Visscher G, Aka Vande P, Kirsch-Volders M. 2000. Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis. *Mutat Res* 469(2):181-197.
- Eason C. 2002. Sodium monofluoroacetate (1080) risk assessment and risk communication. *Toxicology* 181-182:523-530.
- Eason CT, Gooneratne R, Fitzgerald H, Wright G, Frampton C. 1994. Persistence of sodium monofluoroacetate in livestock animals and risk to humans. *Hum Exp Toxicol* 13(2):119-122.
- Fouchécourt MO, Arnold M, Berny P, Videmann B, Rether B, Rivière JL. 1999. Assessment of the bioavailability of PAHs in rats exposed to a polluted soil by natural routes: induction of EROD activity and DNA adducts and PAH burden in both liver and lung. *Environ Res* 80(4):330-339.
- Gooneratne SR, Eason CT, Dickson CJ, Fitzgerald H, Wright G. 1995. Persistence of sodium monofluoroacetate in rabbits and risk to non-target species. *Hum Exp Toxicol* 14(2):212-216.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 1973. Monograph on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Overall evaluations of carcinogenicity : Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds. 3:127 p. Lyon, France.

International Agency for Research on Cancer (IARC). 1987. Monograph on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Overall evaluations of carcinogenicity : An updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. 440 p. Lyon, France.

Jagetia GC, Aruna R. 1997. Hydroquinone increases the frequency of micronuclei in a dose-dependent manner in mouse bone marrow. *Toxicol Lett* 93(2-3):205-213.

Law RJ, Kelly CA, Baker KL, Langford KH, Bartlett T. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments, mussels and crustacea around a former gasworks site in Shoreham-by-Sea, UK. *Mar Pollut Bull* 44(9):903-911.

Loonen H, van de Guchte C, Parsons JR, de Voogt P, Govers HAJ. 1996. Ecological hazard assessment of dioxins: hazards to organisms at different levels of aquatic food webs (fish-eating birds and mammals, fish and invertebrates). *Sci Total Environ* 182(1-3):93-103.

Meador JP, Stein JE, Reichert WL, Varanasi U. 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Rev Environ Contam Toxicol* 143:79-165.

Mitchelmore CL, Birmelin C, Chipman JK, Livingstone DR. 1998. Evidence for cytochrome P-450 catalysis and free radical involvement in the production of DNA strand breaks by benzo[a]pyrene and nitroaromatics in mussel (*Mytilus edulis* L) digestive gland cell. *Aquat Toxicol* 41(3):193-212.

Mitchelmore CL, Chipman JK. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat Res* 399(2):135-147.

Müller P, Stock T, Bauer S, Wolff I. 2002. Genotoxicological characterisation of complex mixtures: Genotoxic effects of a complex mixture of perhalogenated hydrocarbons. *Mutat Res* 515(1-2):99-109.

Nendza M, Herbst T, Kussatz C, Gies A. 1997. Potential for Secondary Poisoning and Biomagnification in Marine Organisms. *Chemosphere* 35(9):1875-1885.

Nisbet IC, LaGoy PK. 1992. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regul Toxicol Pharmacol* 16(3):290-300.

Nunn JW, Livingstone DR, Chipman JK. 1996. Effect of genetic toxicants in aquatic organisms. In: Taylor EW, editor. *Toxicology and Aquatic Pollution : Physiological Molecular and Cellular Approaches*. Cambridge Univ Press, Cambridge. pp 225-251.

Office of the Federal Register (OFR). 1982. Appendix A: Priority Pollutants. *Fed Reg* 47:52309.

Parzefall W. 2002. Risk assessment of dioxin contamination in human food. *Food Chem Toxicol* 40(8):1185-1189.

Poon R, Davis H, Park G, Lecavalier P, Yagminas A, Elwin J, Chu I, Valli VE. 1998. Subchronic toxicity of Benzothiophene on rats following dietary exposure. *J Toxicol Environ Health A* 55(2):133-150.

Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO). 2002. Surveillance du milieu marin, travaux du RNO. IFREMER, Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, France. 48p.

Sasaki YF, Izumiyama F, Nishidate E, Ohta T, Ono T, Matsusaka N, Tsuda S. 1997(a). Simple detection of in vivo genotoxicity of pyrimethamine in rodents by the modified alkaline single-cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 392(3):251-259.

Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, Taniguchi K, Tsuda S. 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res* 519(1-2):103-119.

Sasaki YF, Tsuda S, Izumiyama F, Nishidate E. 1997(b). Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Mutat Res* 388(1):33-44.

- Scarpato R, Migliore L, Alfinito-Cogneti G, Barale R. 1990. Induction of micronuclei in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. *Mar Poll Bull* 21(2):74-80.
- Sekihashi K, Yamamoto A, Matsumura Y, Ueno S, Watanabe-Akanuma M, Kassie F, Knasmüller S, Tsuda S, Sasaki YF. 2002. Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. *Mutat Res* 517(1-2):53-75.
- da Silva J, Herrmann SM, Heuser V, Peres W, Possa Marroni N, González-Gallego J, Erdtmann B; 2002. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol* 40(7):941-947.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175(1):184-191.
- Sinsheimer JE, Hooberman BH, Das SK, Savla PM, Ashe AJ. 1992. Genotoxicity of chryseno[4,5-bcd]thiophene and its sulfone derivative. *Environ Mol Mutagen* 19(3):259-264.
- Solé M, Porte C, Biosca X, Mitchelmore CL, Chipman JK, Livingstone DR, 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 C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 113(2):257-265.
- Speit G, Hartmann A. 1995. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* 10(6):555-559.
- Spurgeon DJ, Hopkin SP. 1996. Risk assessment of the threat of secondary poisoning by metals to predators of earthworms in the vicinity of a primary smelting works. *Sci Total Environ* 187(3):167-183.
- Stegeman JJ, Lech JJ., 1991. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environ Health Perspect* 90:101-109.
- Tronczynski J, Moisan K, Munshy C, Truquet I, Dugrais L, Guiot N. 2002. Etude des empreintes chimiques du fuel de l'Erika et caractérisation de la contamination par les HAPs dans le Golfe de Gascogne. Actes du colloque SAFERSEAS : les leçons techniques de l'Erika et des autres accidents, Brest, 13-16 march 2002. CEDRE, Brest. 15 p.
- Tsuda S, Matsusaka N, Madarame H, Miyamae Y, Ishida K, Satoh M, Sekihashi K, Sasaki YF. 2000. The alkaline single cell electrophoresis assay with eight mouse organs: results with 22 mono-functional alkylating agents (including 9 dialkyl N-nitrosoamines) and 10 DNA crosslinkers. *Mutat Res* 467(1):83-98.
- Vodicka P, Koskinen M, Vodicková L, Stetina R, Smerák P, Bárta I, Hemminki K. 2001. DNA adducts, strand breaks and micronuclei in mice exposed to styrene by inhalation. *Chem Biol Interact* 137(3):213-227.
- Wakata A, Miyamae Y, Sato S, Suzuki T, Morita T, Asano N, Awogi T, Kondo K, Hayashi M. 1998. Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS. *Environ Mol Mutagen* 32(1):84-100.

Concentrations (in µg/kg dry weight mussels)					
	TEFs *	St	M ⁻	M ⁺	M ⁺⁺⁺
Polycyclic Aromatic Hydrocarbons					
Naphtalene	0.001	< 10 #	< 10 #	<20 #	<20 #
Acenaphthylene	0.001	< 50 #	< 50 #	< 100 #	< 100 #
Acenaphthene	0.001	< 2.5 #	< 2.5 #	9 ± 4	< 5 #
Fluorene	0.001	< 4 #	< 4 #	< 8 #	23 ± 1
Phenanthrene	0.001	< 4 #	28 ± 4	13 ± 0.1	39 ± 1
Anthracene	0.01	< 4 #	< 4 #	< 8 #	< 8 #
Fluoranthene	0.001	< 2.5 #	30 ± 9	13 ± 1	27 ± 4.5
Pyrene	0.001	< 4 #	16 ± 3	12 ± 1	74 ± 6
Benzo(a)anthracene	0.1	< 2.5 #	21 ± 1	20 ± 1	< 5
Chrysene	0.01	< 4 #	14 ± 1	18 ± 6.4	315 ± 1.4
Benzo(b)fluoranthene	0.1	< 2.5 #	12 ± 7	< 5 #	< 5 #
Benzo(k)fluoranthene	0.1	< 2.5 #	< 2.5 #	< 5 #	< 5 #
Benzo(a)pyrene	1	< 2.5 #	12 ± 1	< 5 #	< 5 #
Di-benzo(ah)anthracene	5	< 10 #	< 10 #	< 20 #	< 20 #
Benzo(ghi)perylene	0.01	< 10 #	< 10 #	< 20 #	< 20 #
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	0.1	< 10 #	< 10 #	< 20 #	< 20 #
Sum (µg/kg)	-	-	133 ± 26	85 ± 13.5	478 ± 13.9
TEQs **	-	-	15.51 ± 1.83	2.23 ± 0.17	3.31 ± 0.03
Substituted and related PAHs					
Methyl Phenanthrenes	-	-	52	8	131
Methyl Chrysenes	-	-	2	7	1766
Dibenzothiophenes	-	-	1	1	2
Benzo(b)naphtothiophenes	-	-	6	< 1 #	226

Table 1 : PAHs and related contaminants in the food constituted with either standard croquettes (St), or mussels sampled in a non-impacted site (M⁻) and in poorly (M⁺) and heavily (M⁺⁺⁺) contaminated areas (Chemical analysis of the 16 PAHs on the priority list of US-EPA, in µg/kg dry weight with standard deviation by HPLC and analysis of substituted and related PAHs by GC-MS in µg/kg dry weight) (# inferior to detection limit ; * toxic equivalent factor in B(a)P and ** toxic equivalent quantities (in µg of B(a)P per kg of food dry weight) according to Nisbet et Lagoy, 1992).

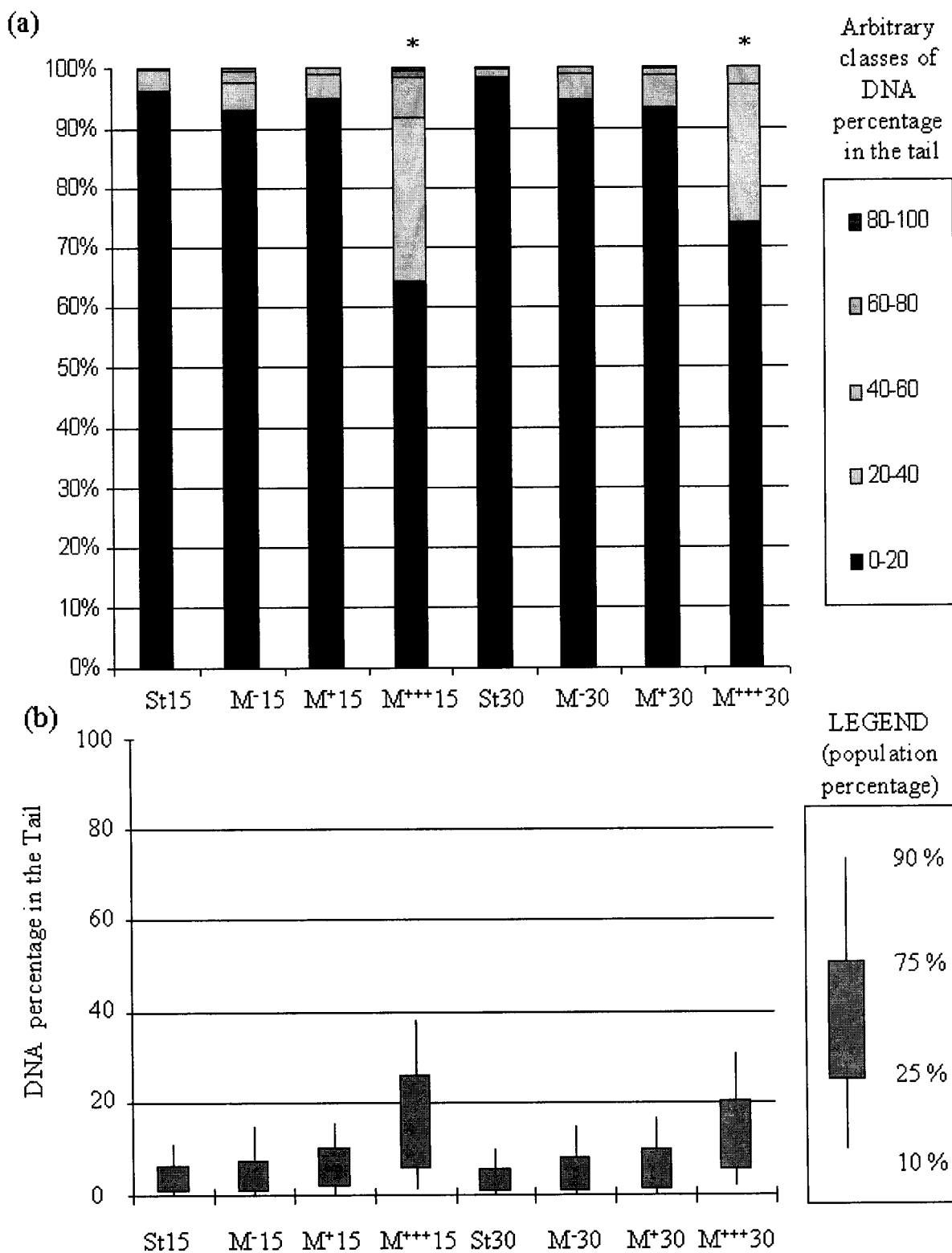


Figure 1 : DNA damage in **hepatocytes** of rats fed during 15 or 30 days with either standard food (St), mussels sampled in a non-impacted site (M⁻) and mussels sampled in poorly (M⁺) and heavily (M⁺⁺⁺) contaminated areas. (6 animals per treatment) :

- (a): Proportions of cells in 5 arbitrary classes of DNA percentage in the tail (* significant difference with control ($p \leq 0.01$))
- (b): Distribution of cells according to their DNA damage expressed by percentage of DNA in the tail.

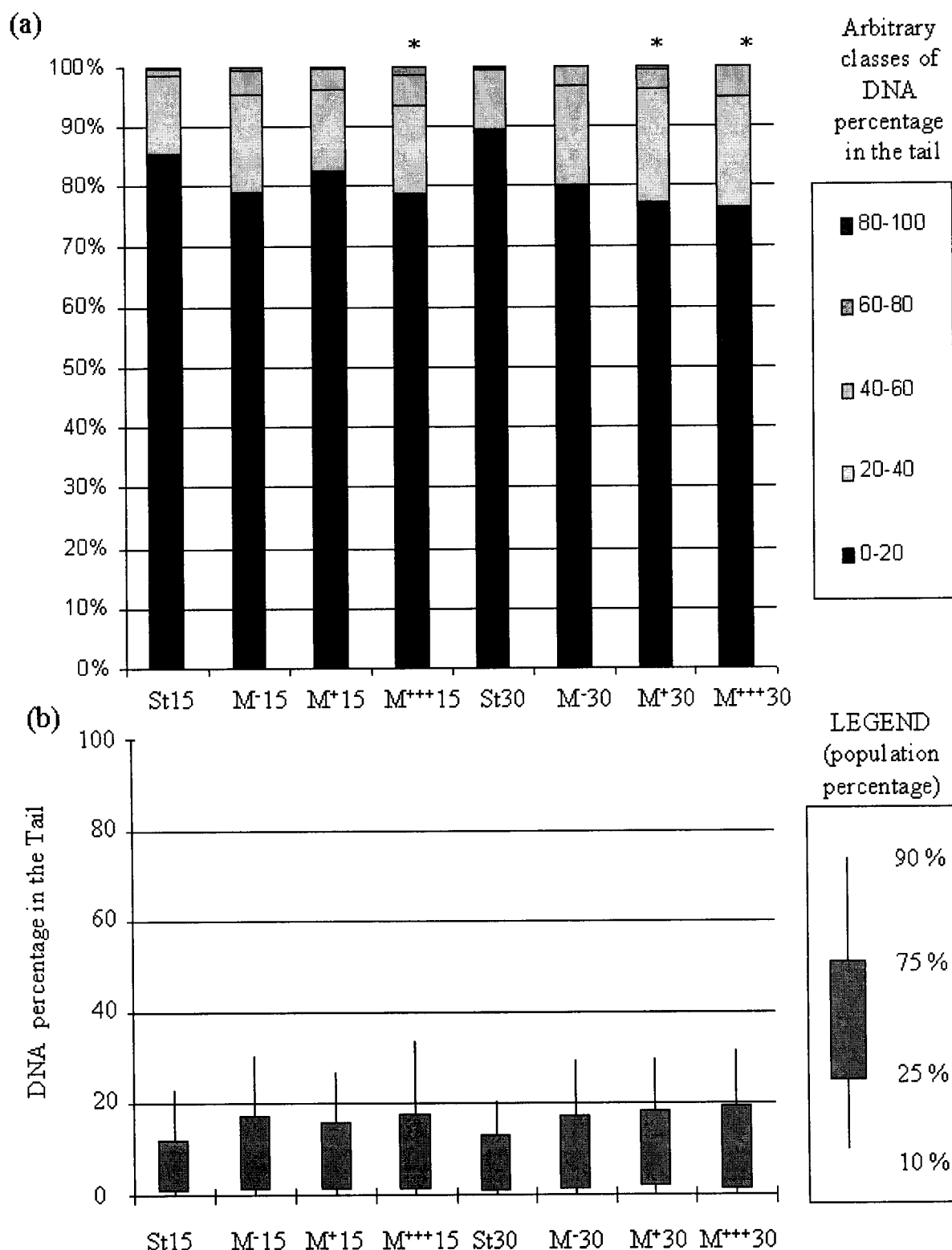


Figure 2 : DNA damage in **bone marrow cells** of rats fed during 15 or 30 days with either standard food (St), mussels sampled in a non-impacted site (M) and mussels sampled in poorly (M⁺) and heavily (M⁺⁺⁺) contaminated areas. (6 animals per treatment) :

(a): Proportions of cells in 5 arbitrary classes of DNA percentage in the tail (* significant difference with control ($p \leq 0.01$))

(b): Distribution of cells according to their DNA damage expressed by percentage of DNA in the tail.

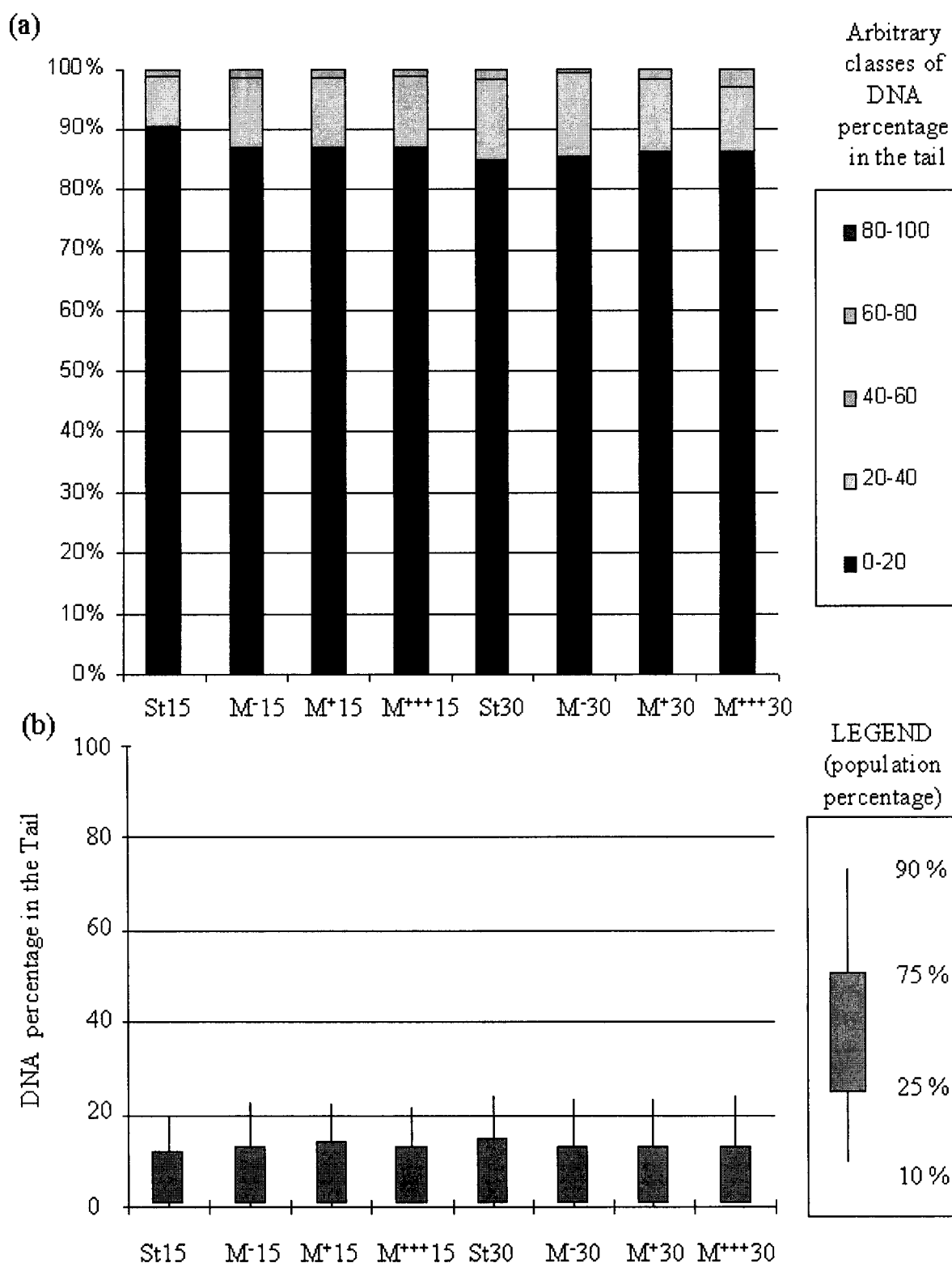


Figure 3 : DNA damage in **nucleated cells of peripheral blood** of rats fed during 15 or 30 days with either standard food (St), mussels sampled in a non-impacted site (M⁻) and mussels sampled in poorly (M⁺) and heavily (M⁺⁺⁺) contaminated areas. (6 animals per treatment) :

- (a): Proportions of cells in 5 arbitrary classes of DNA percentage in the tail (* significant difference with control ($p \leq 0.01$))
- (b): Distribution of cells according to their DNA damage expressed by percentage of DNA in the tail.

		St 15	M ⁻ 15	M ⁺ 15	M ⁺⁺⁺ 15	St 30	M ⁻ 30	M ⁺ 30	M ⁺⁺⁺ 30
Hepatocytes									
	first quartile	0.5	0.546	1.5	5.9	0.4	0.6	1.0	5.2
	median	2.4	2.3	5.1	13.5	2.3	3.6	3.9	12.4
	third quartile	6.5	7.3	10.5	25.9	5.7	7.9	9.7	20.3
	mean	4.7	6.0	7.2	17.3 *	3.8	5.8	6.8	14.5 *
	interindividual variability	1.6	3.4	1.3	3.6	1.1	2.5	1.9	1.3
Bone marrow cells									
	first quartile	0.4	1.1	1.4	4.6	0.5	1.2	3.9	3.7
	median	4.3	6.4	7.0	12.2	4.6	7.1	9.6	10.8
	third quartile	12.2	17.3	16.1	20.8	13.4	17.4	17.5	20.3
	mean	8.1	11.2	10.9	12.5 *	8.2	11.2	12.2 *	12.2 *
	interindividual variability	1.5	2.9	2.7	5.3	1.6	4.2	2.6	3.0
Peripheral blood nucleated cells									
	first quartile	0.7	0.6	0.6	0.8	0.4	0.4	0.5	0.8
	median	4.1	5.0	4.8	5.2	4.7	4.4	3.9	6.0
	third quartile	11.9	12.8	14.2	12.9	14.6	13.2	12.8	13.2
	mean	7.7	8.5	8.8	8.5	8.8	8.3	8.4	9.4
	interindividual variability	1.4	1.4	1.2	1.0	2.4	1.4	1.9	1.8

Table 2 : Distribution parameters of DNA damage in the three cell populations by Comet assay (expressed in terms of DNA percentage in the tail) in rats fed during 15 or 30 days (15 or 30) with food constituted with either standard croquettes (St), or mussels sampled in a non-impacted site (M⁻) and in poorly (M⁺) and heavily (M⁺⁺⁺) contaminated areas (450 cells per treatment were analyzed) (* significative difference with controls noted St (p ≤ 0.01))

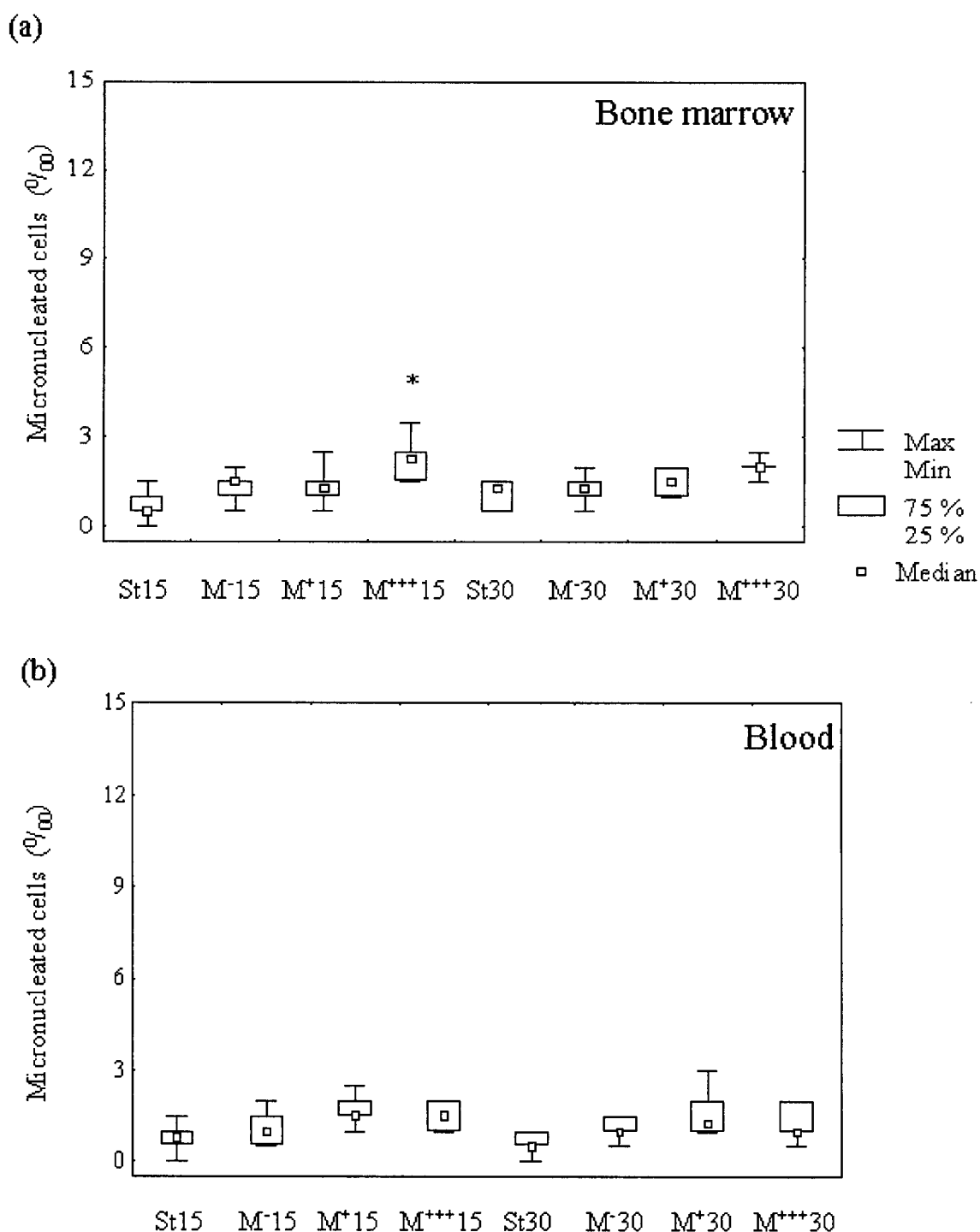


Figure 4 : Frequencies of micronucleated cells in bone marrow cells (a) and in nucleated cells of peripheral blood (b) for rats fed during 15 or 30 days with either standard food (St), mussels sampled in a non-impacted site (M) and mussels sampled in poorly (M⁺) and heavily (M⁺⁺⁺) contaminated areas. (6 animals per treatment) (* significative difference with control ($p \leq 0.01$)).

Seconde étude (ARTICLE 2)

Dommmages à l'ADN étudiés par le test des comètes chez des mammifères nourris avec des moules contaminées par la marée noire de l'Erika

(DNA damage measured by the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in mammals fed with Erika oil spill-contaminated mussels)

L'objectif de cette seconde étude est identique à la première et concerne l'évaluation des effets génotoxiques suite à l'ingestion de moules marines contaminées par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), libérés dans le milieu marin lors du naufrage de l'Erika. Le schéma expérimental est proche : les niveaux de contamination sont différents et encadrent les niveaux étudiés dans la première étude et les repas de nourriture contaminée sont quotidiens. Le reste des conditions d'expositions est identique à la première étude, à part le lot de moules témoins qui proviennent d'un site différent (Les Saumonards, France). Des lots de 6 rats, ont reçu comme nourriture des moules témoins ou les moules contaminées durant 12 et 24 jours à raison d'un repas quotidien de bivalves. Six rats recevant une nourriture standard non contaminée (croquettes UAR, Epinay-sur-Orge), ont servi de témoins. Trois jours après le dernier repas de moules, les animaux ont été sacrifiés. Durant ce délai de trois jours, à la fin de l'exposition, les animaux ont reçu une nourriture non contaminée, identique à celle utilisée pour les témoins. L'analyse chimique de la nourriture a été réalisée en parallèle aux essais biologiques. Les dommages à l'ADN ont été étudiés par le test des comètes dans les cellules du foie, de la moelle osseuse et du sang circulant.

Les niveaux de contamination des moules originaires des zones impactées par la marée noire, exprimés par la somme des 16 HAPs dans la matière sèche et par les quantités d'équivalents toxiques en benzo(a)pyrène (TEQs), calculées en utilisant les facteurs d'équivalents toxiques (TEFs) définis par Nisbet et LaGoy (1992), sont les suivants :

- 310 µg/kg m.s. soit 34 µg/kg TEQs
- 570 µg/kg m.s. soit 82 µg/kg TEQs
- et 870 µg/kg m.s. soit 179 µg/kg TEQs.

La contamination de ces moules par les HAPs méthylés et les dérivés thiophènes est plus faible que celle observée pour les moules utilisées dans la première étude. Les moules témoins présente un profil global de contamination différent, comparativement aux moules contaminées suite à la marée noire de l'Erika. La somme des 16 HAPs (69 µg/kg m.s.) dans les moules témoins est inférieure aux valeurs mesurées dans les bivalves, dans les études de surveillance du littoral français (RNO, 2002).

Globalement sur les trois populations cellulaires étudiées, aucune différence n'est mise en évidence entre les rats ayant reçu une nourriture standard et ceux ayant reçu des moules témoins. Une relation dose effet temps a été observée pour les dommages à l'ADN mesurés dans le foie et la moelle osseuse. Dans les hépatocytes, les effets observés sont plus importants que dans la moelle osseuse. Les niveaux des dommages à l'ADN dans les deux tissus, sont plus élevés à trente jours, comparativement à quinze jours, pour les deux niveaux de contamination de la nourriture les plus élevés (570 et 870 µg/kg m.s.), alors que pour le premier niveau de contamination (310 µg/kg m.s.), aucune différence entre les deux dates de sacrifice n'a été mise en évidence, ce qui semble indiquer une réparation efficace des dommages à l'ADN dans ces conditions d'exposition. Au niveau des cellules nucléées du sang périphérique, quelle que soit la nourriture ingérée, les niveaux de dommages à l'ADN observés chez les différents individus sont identiques à ceux observés chez les témoins.

Dans cette étude, des dommages à l'ADN dans les cellules de rats nourris régulièrement par des moules contaminées sont observés, confirmant un transfert de polluants génotoxiques. La sensibilité du foie, en terme de dommages à l'ADN, mesurés suite aux expositions alimentaires sur quinze et trente jours, est plus grande que celle de la moelle osseuse. Au niveau des leucocytes du sang périphérique, aucun dommage à l'ADN n'est mis en évidence. Le test des comètes apparaît comme un outil privilégié pour étudier la biodisponibilité de composés génotoxiques dans la nourriture et dans des échantillons environnementaux. Sa prédictivité, en terme de cancérogénicité semble limitée dans le cas d'expositions chroniques. Une étude de la réversibilité des dommages à l'ADN, suite à l'arrêt de l'exposition par la voie alimentaire aux polluants de marée noire présents dans les moules, est nécessaire.

DNA DAMAGE MEASURED BY THE SINGLE-CELL GEL ELECTROPHORESIS (COMET) ASSAY IN MAMMALS FED WITH ERIKA OIL-SPILL CONTAMINATED MUSSELS³

LEMIERE Sébastien¹, COSSU-LEGUILLE Carole¹, BISPO Antonio², JOURDAIN Marie-José², LANHERS Marie-Claire³, BURNEL Daniel³ and VASSEUR Paule¹

¹ESE, CNRS FRE 2635, University of Metz, UFR SciFA, rue Delestraint, F-57070 Metz ;

²IRH Environnement, 11 bis rue Gabriel Peri, BP 286, F-54515 Vandoeuvre-lès-Nancy ;

³INSERM U420, Faculté de médecine, 9 Av. Forêt de Haye, F-54505 Vandoeuvre-lès-Nancy

Abstract : This research aimed to estimate potential genotoxicity for consumers resulting from the ingestion of seafood contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) released into the marine environment after the Erika wreck. Mussels (*Mytilus sp.*) collected from sites on the Atlantic coast which were affected by the oil slick in varying degress, were used to feed rats daily for 2 and 4 weeks. DNA damage was measured using the Comet assay in the liver, bone marrow and blood of rats receiving food contaminated with 310 µg of 16 PAHs /kg dry weight (d.w.) equivalent to 34 µg TEQs (toxic equivalent quantities to benzo(a)pyrene) / kg d.w. mussels, 570 µg/kg d.w. (82 µg TEQs /kg) and 870 µg/kg d.w. (179 µg TEQs/kg). A dose-effect-time relationship was observed between the intensity of DNA damage in the liver and bone marrow of rats and the PAH contamination level of mussels. Genotoxicity increased from 15 to 30 days in rats receiving food at the two highest PAH levels. In rats fed with mussels containing 34 µg TEQs/kg d.w., no significant change in liver and bone marrow was recorded at 30 days compared to 15 days, indicating efficient DNA repair capacity at a low level of exposure. No genotoxicity was found in peripheral blood. Globally, the observed effects were rather moderate. These results underlined the bioavailability of pollutants in fuel-oil contaminated mussels to consumers and confirmed the usefulness of the Comet assay as a sensitive tool in biomonitoring when analyzing responses to PAH transfer through food webs.

Keywords : Polycyclic aromatic hydrocarbons, oil spill pollutants, Erika wreck, Comet assay, DNA damage, food transfer.

³ ARTICLE soumis à *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*

INTRODUCTION

Twenty thousand tons of heavy fuel oils containing high levels of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were released into the marine environment after the wreck of the Erika tanker on the Atlantic coast in December 1999. The spill was a disaster for aquatic life, birds, marine fauna and flora. Besides the direct lethal effects of this massive pollution, indirect effects might result from the contamination of food webs. PAHs of high molecular weight were the most threatening hazardous pollutants of the fuel oil due to their persistence, as well as their mutagenic and carcinogenic properties. As Invertebrates could bioaccumulate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Scarpato *et al.*, 1990 ; Meador *et al.*, 1995 ; Solé *et al.*, 1996 ; Law *et al.*, 2002), the transfer of these pollutants through the food chain to vertebrates was a concern (Earampamoorthy and Koff, 1975 ; Nunn *et al.*, 1996). Indeed, the PAH contamination levels in mussels could have reached 3000 µg PAHs /kg dry weight (d.w.). The French Agency for Food Safety (AFSSA) rapidly regulated the consumption of seafood, which was forbidden above a contamination level of 500 µg total PAHs /kg tissue (d.w.). This threshold did not take into consideration whether the type of PAH congeners was of low or high molecular weight.

Our research aimed to estimate the potential genotoxicity of repeated ingestion of PAH contaminated seafood in mammals. We chose to study mussels contaminated with levels of PAHs roughly equivalent to the threshold established by AFSSA in order to confirm the relevance of their recommendation, and to assess the level of mussel consumption which would not have toxic effects for mammals. Genotoxicity was studied in rats (*Rattus norvegicus*) fed daily with mussels over 15 and 30 days. The contamination levels of mussels (*Mytilus sp.*) were expressed as the sum of PAH derivatives measured in soft tissues and the values of TEQ (toxic equivalent quantity) corresponding to the 16 PAHs recommended for analysis (AFSSA, 2000). TEQs -toxic equivalent quantities to benzo(a)pyrene (BaP) in µg /kg mussels - were calculated using the TEFs (Toxic Equivalent Factors) as defined by Nisbet and Lagoy (1992).

Contaminated mussels had been sampled in sites more or less affected by the oil slick. The 16 PAH congeners listed as priority pollutants by the US-EPA for environmental biomonitoring (OFR, 1982) were analyzed in mussels immediately after sampling by IFREMER. Several batches of mussels with levels ranging between 250 and 850 µg/kg d.w. expressed as total of 16 PAHs in soft tissues were used to constitute three homogenous batches of contaminated food. PAHs were measured again with their alkylated and thiophene derivatives in the batches

of food composed by grinded mussel tissues, in order to evaluate the PAH daily intake of rats. Mussels from a reference site were used as control food.

DNA damage was measured in the liver, the bone marrow and the blood of rats by means of single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. Indeed, this assay appears appropriate for the study of low levels of DNA damage and tissue sensitivities of rodents exposed to genotoxic agents (Singh *et al.*, 1988 ; Sasaki *et al.*, 1997 a,b ; Sasaki *et al.*, 2000 ; Sasaki *et al.*, 2002 ; Sekihashi *et al.*, 2002 ; Tsuda *et al.*, 2000).

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

All reagents were of analytical or molecular biology grade.

Chemical analysis of food

Mussels were collected by IFREMER teams from areas impacted to various degrees by the oil slick of the Erika tanker. The batches of contaminated food were prepared as follows : frozen mussels were opened, soft tissues were mixed, homogenized in a grinder and distributed into pools of 12 to 15 g (each pool constituting one meal).

Chemical analyses were performed on samples dried at 40°C until constant mass. Extraction of PAHs was conducted by ASE extractor (Accelerated Solvent Extractor 200, from DIONEX, Sunnyvale, USA), allowing a solid/liquid extraction at 100°C and under pressure (136 bars). Dichloromethane and hexane were used as extraction solvents (ratio 50:50 ; v:v). After solvent evaporation, extracts were dissolved in acetonitrile. PAHs were separated and detected by reversed high performance liquid chromatography (HPLC), coupled with a spectrofluorimeter and a UV/diode array detector. Concentrations were expressed by the mean values and standard deviation of the measurements. Total PAH concentrations corresponded to the sum of the concentrations of the 16 PAHs analyzed. In addition, the identification of the methylated and related PAHs was performed by gas-chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) after lyophilisation of the samples and extraction under warmth and pressure. Quantification limits are indicated in table 1.

Animals and treatment

Five groups of twelve male Wistar rats weighing 110-130 g (Charles River Laboratories (in the past IFFACREDO), Les Oncins, Saint-Germain sur l'Arbresle, France) and acclimatized one week before treatment, were composed randomly. The first group, defined as controls (C), received standard food (croquettes from UAR, Epinay-sur-Orge, France) ; the second one received mussels sampled from the reference site named "Les Saumonards" in the North of Brittany (France). These were used as control mussels (CM). The three other groups were fed with mussels contaminated with a total of the 16 PAHs around 300 µg/kg d.w. (M^+), 550 µg/kg d.w. (M^{++}) and 850 µg/kg d.w. (M^{+++}). A food portion of 13 g (on average, fresh weight) was administered daily to each rat. Six animals from each group were sacrificed after 15 days and the six others after 30 days. In all cases, the animals were killed three days after the last meal of mussels. Tissues from the rats (liver, peripheral blood) were sampled and stored at -196°C in liquid nitrogen except for intact femurs, which were kept at -20°C before bone marrow extraction. Blood samples were collected in heparinized tubes. Cellular suspensions of bone marrow were prepared after animal sacrifice by scraping and washing the inside of the femurs. For this tissue, suspensions were kept at -196°C after progressive freezing (4 hrs at -20°C ; one night at -80°C and -196°C in liquid nitrogen). Every tissue sample from each animal was analyzed separately and not pooled.

Alkaline Single-cell gel electrophoresis (Comet) assay

DNA damages were quantified by means of the Comet assay as described by Singh *et al.* (1988) with minor modifications. Assays were performed under inactinic light at 4°C . Cellular suspensions from livers were obtained by mechanical shaking of 150 mg tissue in 10 mL PBS with 10 % DMSO added as antioxidant before treatment. Differential centrifugations were used to isolate cells from other scraps. Suspensions of bone marrow cells, stored in liquid nitrogen, were thawed just before the assay. Circulating blood was diluted in physiological saline with 2 % DMSO added in order to limit coagulation and cell suspensions were enriched by single centrifugations.

Slides were prepared in triplicate for each sample. 300 µL of cell suspension were added to 300 µL of 1 % low-melting point (LMP) agarose. 75 µL were transferred onto slides, covered with a coverslip and left on ice 10 min to allow agarose to solidify. The coverslip was gently removed and a second layer (75 µL of 0.5 % LMP agarose) was spread, covered and left on

ice for 10 min. After the removal of the coverslips, the slides were immersed in freshly prepared cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris – pH 10 – 1 % N-laurylsarcosinate, 1 % Triton X100 and 10 % DMSO) for 2 h in order to isolate the nuclei and eliminate the cytoplasm and membranes. Thereafter, slides were placed in an electrophoresis box, covered with the electrophoresis buffer (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA) to allow DNA unwinding during 21 min, and then electrophoresed (300 mA, 21 min, 20 V). Slides were washed twice during 10 min in neutralizing buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) before dehydration in a batch of absolute ethanol for 10 min. Nuclear DNA was stained with 25 µL ethidium bromide (20 µg/mL) and observed using an epifluorescence microscope (BX60 Olympus) connected to an image analysis system (Komet 3:1 Kinetic Imaging Ltd). Fifty cells were analyzed per slide, with 3 slides per animal, so that 900 cells were observed for each modality studied in the first experiment (50 x 3 x 6 animals). Cells were scored randomly on the central part of the gel. Slides were coded independently and scored without knowledge of the code. The percentage of DNA in the tail was chosen to express DNA damage because the interexperimental and interelectrophoresis variations registered using this parameter were very low (De Boeck *et al.*, 2000).

Mean values and S.E.M. were calculated. Arbitrary classes of DNA damage in cell populations were defined according to the percentage of DNA in the tail : 0-20 % (class 0), 20-40 % (class 1), 40-60 % (class 2), 60-80 % (class 3) and >80 % (class 4).

As Comet data were not normally distributed, non-parametric statistical tests were used. The Kruskal-Wallis and the median tests, applied on raw data, were used to compare the different treatments. Cell distributions based on the degree of damage were analyzed by means of the Chi-square tests. Differences in cells of treated rats as compared to controls (C) and (CM) were considered as significant when $p \leq 0.05$.

RESULTS

Chemical analysis of food

PAH contamination profiles of mussels differed in the impacted areas from the reference site (table 1). Chrysene, pyrene and fluorene were present in mussels originating only from the impacted zone. Phenanthrene, fluoranthene and benzo(a)pyrene were found in all the batches of mussels, although at a much higher level at the impacted sites than in the reference area. In the impacted areas, benzo(a)pyrene concentrations in mussels increased in proportion with the

total contamination level. The correlation was not so clear for phenanthrene and fluoranthene although the highest concentrations were found in the two most contaminated batches of mussels. At the impacted sites, the total of 16 PAHs in batches of contaminated mussels averaged 310 $\mu\text{g/kg d.w.}$ in batch (M^+), 570 $\mu\text{g/kg d.w.}$ in (M^{++}) and 870 $\mu\text{g/kg d.w.}$ in (M^{+++}), corresponding to 34, 82 and 179 $\mu\text{g TEQs/kg d.w.}$, respectively.

Methylated PAHs and benzothiophenes were also present in the most contaminated mussels (M^{++} and M^{+++}), but at similar concentrations. These levels did not increase with the total contamination by the 16 PAHs. No TEQs were established for these derivatives.

PAH contamination was absent from standard food (C). Food of control mussels from the reference site (CM) contained a total of 69 $\mu\text{g/kg PAHs}$ represented mainly by phenanthrene and fluoranthene and equivalent to 6 TEQs. Therefore, TEQs in contaminated mussels were 5, 14 and 30 fold higher in M^+ , M^{++} and M^{+++} , respectively, than in control mussels CM.

Alkaline Single-cell gel electrophoresis (Comet) assay

In hepatocytes, a higher level of DNA damage ($p < 0.001$) was observed in rats fed with the contaminated food (M^+ , M^{++} and M^{+++}) compared to controls (figure 1). No significant difference was found in hepatocytes of rats fed with standard food (C) and rats fed with control mussels (CM). Whether the experiment lasted 15 or 30 days, the majority of cells (97-98 %) presented little or no damage (class 0), while 2-3 % of cells ranked in class 1 (percentage of DNA in the tail between 20-40%) (figure 1).

In rats fed over 15 days with mussels from impacted areas, the degree of DNA damage increased with the PAH contamination level of food. In rats M^+ and M^{++} , the percentage of hepatocytes with damaged DNA was around 12 % in class 1 and 1.4-1.7 % in class 2 (40-60% DNA in the tail). In rats fed with M^{+++} , the number of cells with DNA breaks was significantly higher than in the two previous groups ($p < 0.001$), with 21 %, 5.2 %, and 1.2 % hepatocytes in class 1, 2 and 3 respectively.

After 30 days of experiment, no difference was noted in rats M^+ , but the intensity of damaged nuclei increased significantly in rats fed with M^{++} and M^{+++} in comparison with 15 days. In the hepatocytes of rats M^{++} , the percentage of highly-damaged cells (class 2) was 3.3 % versus 1.7 % after 15 days ($p = 0.025$) and the increase was greater in rats M^{+++} with 8.2 % hepatocytes in class 2 versus 6.2 % after 15 days ($p = 0.014$).

In bone marrow cells, the basal level of damage in controls was low with less than 3 % cells in class 1. A significant increase in DNA damage was observed in rats fed with contaminated mussels (figure 2). The distribution of cells with altered nuclei was similar in rats M^+ , M^{++} and M^{+++} after 15 days, with 8-10 %, 1-2 % and 0.2 % of cells in class 1, 2 and 3, respectively.

After 30 days, the number of DNA damaged cells in M^+ rats did not differ significantly compared to 15 days.. On the other hand, it was higher in rats M^{++} and M^{+++} , with 15 % cells in class 1, 2.5-3 % in class 2, and 0.2 % in class 3 ($p < 0.001$) . No significant difference was noted in the distribution of DNA-altered cells between rats M^{++} and M^{+++} ($p = 0.87$) (figure 2).

In blood cells, no difference was registered between animal groups, whatever the type of food – standard or mussels - or the duration of the experiment (figure 3). Less than 1.5% cells in control rats fed with standard food presented DNA breaks (class 1), and no significant increase was noted in rats fed with contaminated mussels after 15 and 30 days of experiments.

Some examples of nuclei observations by means of the comet assay were presented in the figure 4.

DISCUSSION

This work demonstrated the occurrence of genotoxic damage due to the consumption of mussels contaminated by the Erika oil slick pollutants. Genotoxic effects were registered in the liver and the bone marrow. No effect of this PAH-contaminated food was observed in circulating blood. The intensity of DNA damage in liver and bone marrow increased with the PAH contamination level of the mussels. The proportion of cells which presented damaged DNA and the degree of DNA injuries were greater in the liver than in the bone marrow. Indeed, the liver is clearly efficient in the metabolism of PAHs known to be activated into genotoxic metabolites, in their conjugation and elimination via the bile. The relative rate of xenobiotic metabolism is much lower in bone marrow than in the liver (Schreck and Latt, 1980). The greater sensitivity of the liver to genotoxic compounds was also registered by Sekihashi *et al.* (2002) in mice and rats exposed to aflatoxin B1, or azobenzene but also to a direct alkylating agent methylmethane sulfonate (MMS).

When experiments did not exceed 15 days, DNA damage in bone marrow was of the same order of magnitude at the three levels of exposure (34, 82 and 179 $\mu\text{g TEQs/kg d.w. mussels}$). Several explanations can be given. Either PAH bioavailability in bone marrow was limited, or biotransformation systems activating PAHs into genotoxic metabolites were saturated. It can also be argued that elimination systems were sufficient to prevent increased damage at high exposure dose. Yet, these adaptive capacities are limited as it appeared from increased genotoxicity after 30 days at the two higher exposure doses which were equivalent to an intake of 82 and 179 $\mu\text{g TEQs / kg mussel}$.

At the lowest exposure dose (34 $\mu\text{g TEQs/kg d.w. mussels}$), genotoxicity in rats did not increase over time beyond 15 days in the liver and in bone marrow. This indicates that detoxification systems remained efficient over time in neutralizing and eliminating PAH metabolites, and/or repairing DNA damage. This is in accordance with the fast elimination of PAHs in mammals at a low level of exposure, and the capacities of vertebrates to repair DNA. A balance between DNA damage, elimination and repair occurred in these tissues.

It appeared from the results that the threshold of PAH daily intake deemed to have genotoxic effects in rats was below 34 $\mu\text{g TEQs/kg d.w. mussels}$. The fact that no genotoxic effect over time was registered in mussels from the reference site, which contained 6 TEQs, allowed us to set the genotoxicity threshold within the wide range 6-34 $\mu\text{g TEQs/kg d.w. mussels}$ which corresponds to the range 0.04-0.225 $\mu\text{g TEQs/kg body weight (b.w.)}$ in rats. Additional studies would be necessary to fix this threshold more precisely.

The interest of the present work was to use samples representative of an environmental pollution by PAHs and not to study artificially-polluted samples. In the case of oil slicks, mussels had especially been studied to follow the impact of the pollution as regards contamination using biomarkers or tissue burden analyses (Solé *et al.*, 1996 ; Glegg *et al.*, 1999 ; Harvey *et al.*, 1999 ; Thomas *et al.*, 1999 a,b ; Fernley *et al.*, 2000 ; Yim *et al.*, 2002). However, these organisms had never been studied as a vector of pollution to mammals, even though the hypothesis of a transfer of contaminants from seafood to consumer has been put forward since 1975 by Earampamoorthy and Koff.

The mutagenicity of some bivalve organic extracts had already been highlighted by means of indirect bacterial tests, in particular in the days following an oil spill and twelve months later for certain samples (Kadhim and Parry, 1984). Similar results had been observed in the case of industrial pollution, such as that arising from aluminum refineries and the forestry product industries (White *et al.*, 1997).

The genotoxic and carcinogenic properties of PAHs, and especially of congeners with five or six aromatic rings, are well known in vertebrates (IARC, 1973, 1987), and this explains why these compounds are taken into consideration in environmental samples contaminated with PAHs mixtures. Yet, the fraction of the 16 PAHs classically analyzed corresponded to 0.3 % in weight of the Erika oil (Tronczynski *et al.*, 2002). Therefore a contribution of other hydrocarbon derivatives and contaminants to toxicity was possible. In our work, methyl-substituted PAHs and benzothiophenes were also found in mussels. The search for these compounds and PAH metabolites in bivalves has not been recommended in chemical analyses so far and no TEF has been established for these compounds. Nevertheless, they might possess toxic properties similar to non-substituted PAHs (Sinsheimer, 1992 ; Poon *et al.*, 1997, 1998 ; Borosky, 1999 ; Binet *et al.*, 2002). So, the use of TEQs based only on the 16 PAHs minimizes the global toxicity that can be deduced from chemical analyses and does not adequately reflect contamination in mussels after the Erika oil spill and the consecutive observed adverse effects (Lemière *et al.*, in press).

The comparison of our results with other studies on rats exposed to PAH-complex mixtures is difficult due to the difference in conditions of exposure and endpoints. Studies on PAH-contaminated soils (Fouchécourt *et al.*, 1999) have measured effects due to PAH exposure by inhalation and ingestion without quantifying animal intake. In addition, genotoxicity was evaluated by quantifying DNA adducts, and not DNA breaks as with the Comet assay. In other studies on PAH-contaminated soils, CYP 1A induction was measured in several tissues, but genotoxicity was not considered (Roos, 2002 ; Roos *et al.*, 2002). Müller *et al.* (2004) and Dybdahl *et al.* (2003) measured DNA damage using the Comet assay after orally exposing Big Blue rats to diesel exhaust particules during a period of 21 days. They found DNA damage at a relatively low level of PAH in particules, corresponding to 0.01 µg total PAHs/kg b.w. . Although the PAH contamination profiles differed, the level of DNA strand breaks and the order of food contamination were similar to our conditions.

The comparison of our results with experimental studies carried out on mammals exposed orally to a single PAH such as BaP could seem easier. Yet, very high doses of benzo(a)pyrene in the diet or given by gavage had generally been used, which limits extrapolations and comparisons. To our knowledge, no assessment of the genotoxic effect of BaP in orally-treated rats in the long term had been done using the Comet assay. Garry *et al.* (2003) used endotracheally treated rats with a single dose of 0.75, 1.5, 3 mg BaP per animal, i.e. 3.5, 7.5 and 15 mg BaP/kg b.w. rat. Kliesch *et al.* (1982) analysed chromosomal damage

in mouse bone marrow and found a significant effect at the lowest effective dose of 6.25 mg/kg BaP after a single treatment. This dose was more than three orders of magnitude higher than the highest daily intake we tested (1.6 µg TEQ/kg b.w. rat (table 3)). Indeed, the PAH-contaminated food tested here ranged between 6 and 179 µg TEQ/ kg d.w. mussels, corresponding to the range of 0.8-24 ppb TEQs (µg/kg fresh weight mussels). These PAH contamination levels were similar to the limit values for consumer exposure to BaP fixed by the WHO (1996) in drinking water (0.7 µg/l) and by the EEC (1988) in meat products (1 µg/kg). Rigdon and Neal (1966) conducted a long-term experiment on rats fed for several weeks with a diet containing 50-250 ppm BaP, and found gastric tumours in 70% animals after 4-6 months. More recently, Culp *et al.* (1998) fed mice a BaP-contaminated diet (between 5 and 100 ppm) and also founds tumours after a 2-year experiment. This corresponded to a daily intake between 2500 and 10000 times higher than the highest mussel concentration (M+++) used by us. Brune *et al.* (1981) conducted a carcinogenicity study on Sprague Dawley rats given 0.15 mg/kg b.w. 5 days per week and observed forestomach, oesophagus and larynx tumours : although this treatment dose is the lowest which can be found in literature in long term studies, the doses used are 100 to 3000 times higher than the ones we used.

Therefore, the genotoxicity results found in rats fed with contaminated mussels cannot be interpreted in terms of carcinogenic potential, nor of mutagenicity. In their study in rats fed a diet containing diesel particles, Muller *et al.* (2004) pointed out that DNA damage was not associated with an increased mutation rate in tissues of Big Blue rats. In addition, as DNA repair is possible, it would be necessary to study the capacity of rats to recover undamaged DNA after repeated ingestion of PAH contaminated food..

CONCLUSION

The present study demonstrated the occurrence of genotoxic damage in rats fed with contaminated mussels, thus underlining the bioavailability of genotoxic pollutants in oil-contaminated mussels to consumers. Rather moderate genotoxic injuries were observed mainly in the liver and to a lesser extent in the bone marrow after a daily consumption of contaminated food for 15 and 30 days. No genotoxicity was found in peripheral blood. The study of DNA damage by means of the Comet assay was confirmed as a sensitive criterion for assessing bioavailability and genotoxicity of food pollutants for consumers. The threshold of

contamination of mussels below which no genotoxicity could be expected, is in the range of 6-34 µg TEQs/kg d.w. (69-310 µg of the 16 PAHs /kg of food d.w.). Complementary studies would be necessary to define thresholds of food contamination which would be devoid of toxic effects for consumers and to study the reversibility of genotoxic effects after the consumption of contaminated food. Finally, only the 16 PAHs selected by US-EPA for biomonitoring were taken into account in the actual recommended level and more knowledge of the other PAH derivatives found in ERIKA polluted samples is needed.

Acknowledgements : This research was supported by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development. We thank IFREMER teams for their collaboration. The authors are grateful to Tracy Carmona for her help in correcting the English form of this paper.

REFERENCES

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), 5 février 2000, Avis du groupe d'experts réunis par l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur les critères de toxicité alimentaire présentés par la pollution engendrée par le naufrage de l'ERIKA, Maisons-Alfort, France, 7 p.

Binet S., Pfohl-Leszkowicz A., Brandt H., Lafontaine M. and Castegnaro M., 2002, Bitumen fumes: review of work on the potential risk to workers and the present knowledge on its origin, *Science of the Total Environment*, **300**(1-3), 37-49.

Borosky G.L., 1999, Theoretical study related to the carcinogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives, *Journal of Organic Chemistry*, **64**, 7738-7744.

Brune H., Deutsch-Wenzel R.P., Habs M., Ivankovic S. and Schmahl D., 1981, Investigation of the tumorigenic response to benzo(a)pyrene in aqueous caffeine solution applied orally to Sprague-Dawley rats, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **102**(2), 153-157.

Culp S.J., Gaylor D.W., Sheldon W.G., Goldstein L.S. and Beland F.A., 1998, A comparison of the tumours induced by coal tar and benzo[a]pyrene in a 2-year bioassay, *Carcinogenesis*, **19**, 117-124.

De Boeck M., Touil N., De Visscher G., Aka Vande P. and Kirsch-Volders M., 2000, Validation and implementation of an internal standard in Comet assay analysis, *Mutation Research*, **469**(2), 181-197.

Dybdahl M., Rison L., Moller P., Autrup H., Wallin H., Vogel U., Bornholdt J., Daneshvar B., Dragsted L.O., Weimann A., Poulsen H.E. and Loft S., 2003, DNA adduct formation and oxidative stress in colon and liver of Big Blue rats after dietary exposure to diesel particles, *Carcinogenesis*, **24**(11), 1759-1766.

Earampamoorthy S. and Koff R.S., 1975, Health hazards of bivalve-mollusk ingestion, *Annals of Internal Medicine*, **83**(1), 107-110.

European Economic Community, 1988, Council Directive, of 22 June 1988, on the approximation of the laws of member states relating to flavourings for use in foodstuffs and to source materials for their production (88/388/EEC), *Off. J. Communities*, L184: 61-65.

Fernley P.W., Moore M.N., Lowe D.M., Donkin P. and Evans S., 2000, Impact of the Sea Empress oil spill on lysosomal stability in mussel blood cells, *Marine Environmental Research*, **50**(1-5), 451-455.

Fouchécourt M.O., Arnold M., Berny P., Videmann B., Rether B. and Rivière J.L., 1999, Assessment of the bioavailability of PAHs in rats exposed to a polluted soil by natural routes: induction of EROD activity and DNA adducts and PAH burden in both liver and lung, *Environmental Research*, **80**(4), 330-339.

- Garry S., Nesslany F., Aliouat E.M., Haguenoer J.M. and Marzin D., 2003 a, Assessment of genotoxic effect of benzo[a]pyrene in endotracheally treated rat using the comet assay, *Mutation Research*, **534**, 33-43.
- Glegg G.A., Hickman L. and Rowland S.J., 1999, Contamination of Limpets (*Patella vulgata*) Following the Sea Empress Oil Spill, *Marine Pollution Bulletin*, **38**(2), 119-125.
- Harvey J.S., Lyons B.P., Page T.S., Stewart C. and Parry J.M., 1999, An assessment of the genotoxic impact of the Sea Empress oil spill by the measurement of DNA adduct levels in selected invertebrate and vertebrate species, *Mutation Research*, **441**(1), 103-114.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1973, Monograph on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Overall evaluations of carcinogenicity : Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds, 3, Lyon, France, 127 p.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1987, Monograph on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Overall evaluations of carcinogenicity : An updating of IARC Monographs volumes 1 to 42, Lyon, France, 440 p.
- Kadhim M. and Parry J.M., 1984, The detection of mutagenic chemicals in the tissues of shellfish exposed to oil pollution, *Mutation Research*, **136**(2), 93-105.
- Kliesch U., Roupova I. and Adler I.D., 1982, Induction of chromosome damage in mouse bone marrow by benzo[a]pyrene, *Mutation Research*, **102**(3), 265-273.
- Law R.J., Kelly C.A., Baker K.L., Langford K.H. and Bartlett T., 2002, Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments, mussels and crustacea around a former gasworks site in Shoreham-by-Sea, UK, *Marine Pollution Bulletin*, **44**(9), 903-911.
- Lemière S., Cossu-Leguille C., Bispo A., Jourdain M.J., Lanhers M.C., Burnel D. and Vasseur P., in press, Genotoxicity related to oil spill pollutant transfer from mussels to mammals via the food, *Environmental Toxicology*.
- Meador J.P., Stein J.E., Reichert W.L. and Varanasi U., 1995, Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms, *Reviews in Environmental Contamination and Toxicology*, **143**, 79-165.
- Müller AK., Farombi E.O., Moller P., Autrup H.N., Vogel U., Wallin H., Dragsted L.O., Loft S. and Binderup M.L., 2004, DNA damage in lung after oral exposure to diesel exhaust particles in Big Blue rats, *Mutation Research*, **550**, 123-132.
- Nisbet I.C. and LaGoy P.K., 1992, Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Regulatory toxicology and pharmacology* : RTP, **16**(3), 290-300.
- Nunn J.W., Livingstone D.R. and Chipman J.K., 1996, Effect of genetic toxicants in aquatic organisms, 225-251, In *Toxicology and Aquatic Pollution : Physiological Molecular and Cellular Approaches*, Society for Experimental Biology Seminar Series, **57**, Taylor E.W. (Ed), Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Office of the Federal Register (OFR), 1982, Appendix A : Priority Pollutants, Fed Reg 47:52309.
- Poon R., Davis H., Lecavalier P., Liteplo R., Yagminas A., Chu I. and Bihun C.J., 1997, Effects of benzothiophene on male rats following short-term oral exposure, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **50**(1), 53-65.
- Poon R., Davis H., Park G., Lecavalier P., Yagminas A., Elwin J., Chu I. and Valli V.E., 1998, Subchronic toxicity of Benzothiophene on rats following dietary exposure, *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, **55**(2), 133-150.
- Rigdon R.H. and Neal J., 1966, Effect of feeding benzo(a)pyrene on growth of young mice, *Texas Reports on Biology and Medicine*, **24**(3), 473-478.

- Roos P.H., 2002, Differential induction of CYP1A1 in duodenum, liver and kidney of rats after oral intake of soil containing polycyclic aromatic hydrocarbons, *Archives of Toxicology*, **76**, 75-82.
- Roos P.H., Tschirbs S., Welge P., Hack A., Theegarten D., Mogilevski G. and Wilhelm M., 2002, Induction of cytochrome P450 1A1 in multiple organs of minipigs after oral exposure to soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), *Archives of Toxicology*, **76**, 326-334.
- Sasaki Y.F., Izumiyama F., Nishidate E., Ohta T., Ono T., Matsusaka N. and Tsuda S., 1997 (a), Simple detection of *in vivo* genotoxicity of pyrimethamine in rodents by the modified alkaline single-cell gel electrophoresis assay, *Mutation Research*, **392**(3), 251-259.
- Sasaki Y.F., Kawaguchi S., Kamaya A., Ohshita M., Kabasawa K., Iwama K., Taniguchi K. and Tsuda S., 2002, The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives, *Mutation Research*, **519**(1-2), 103-119.
- Sasaki Y.F., Sekihasi K., Izumiyama F., Nishidate E., Saga A., Ishida K. and Tsuda S., 2000, The Comet Assay with Multiple Mouse Organs: Comparison of Comet Assay Results and Carcinogenicity with 208 Chemicals Selected from the IARC Monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, **30**(6), 629-799.
- Sasaki Y.F., Tsuda S., Izumiyama F. and Nishidate E., 1997 (b), Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay, *Mutation Research*, **388**(1), 33-44.
- Scarpato R., Migliore L., Alfinito-Cogneti G. and Barale R., 1990, Induction of micronuclei in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters, *Marine Pollution Bulletin*, **21**(2), 74-80.
- Schreck R.R. and Latt S.A., 1980, Comparison of benzo(a)pyrene metabolism and sister chromatid exchange induction in mice, *Nature*, **288**, 407-408.
- Sekihasi K., Yamamoto A., Matsumura Y., Ueno S., Watanabe-Akanuma M., Kassie F., Knasmüller S., Tsuda S., Sasaki Y.F., 2002, Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay, *Mutation Research*, **517**(1-2), 53-75.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. and Schneider E.L., 1988, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, **175**, 184-191.
- Sinsheimer J.E., Hooberman B.H., Das S.K., Savla P.M. and Ashe A.J., 1992, Genotoxicity of chryseno[4,5-bcd]thiophene and its sulfone derivative, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **19**(3), 259-264.
- Solé M., Porte C., Biosca X., Mitchelmore C.L., Chipman J.K., Livingstone D.R. and Albaiges J., 1996, Effects of the "Aegean Sea" Oil Spill on biotransformation enzymes, oxydative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.), *Comparative Biochemistry and Physiology*, **113C**(2), 257-265.
- Thomas R.E., Brodersen C., Carls M.G., Babcock M. and Rice S.D., 1999 (a), Lack of physiological responses to hydrocarbon accumulation by *Mytilus trossulus* after 3-4 years chronic exposure to spilled Exxon Valdez crude oil in Prince William Sound, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **122**(1), 153-163.
- Thomas R.E., Harris P.M. and Rice, S.D., 1999 (b), Survival in air of *Mytilus trossulus* following long-term exposure to spilled Exxon Valdez crude oil in Prince William sound. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **122**(1), 147-152.
- Tronczynski J., Moisan K., Munshy C., Truquet I., Dugrais L. and Guiot N., 2002, Etude des empreintes chimiques du fuel de l'Erika et caractérisation de la contamination par les HAPs dans le Golfe de Gascogne, Actes du colloque SAFERSEAS : les leçons techniques de l'Erika et des autres accidents, Brest, 13-16 march 2002, CEDRE, Brest, 15 p.
- Tsuda S., Matsusaka N., Madarame H., Miyamae Y., Ishida K., Satoh M., Sekihasi K. and Sasaki Y.F., 2000, The alkaline single cell electrophoresis assay with eight mouse organs: results with 22 mono-functional

alkylating agents (including 9 dialkyl N-nitrosoamines) and 10 DNA crosslinkers, *Mutation Research*, **467**(1), 83-98.

White P.A., Blaise C. and Rasmussen J.B., 1997, Detection of genotoxic substances in bivalve molluscs from the Saguenay Fjord (Canada), using the SOS chromotest, *Mutation Research*, **392**(3), 277-300.

WHO, 1996, Guidelines for drinking water quality, Volume 2. Health criteria and other supporting information, Geneva, pp 495-505.

Yim U.H., Oh J.R., Hong S.H., Lee S.H., Shim W.J. and Shim J.H., 2002. Identification of PAHs Sources in Bivalves and Sediments 5 Years After the Sea Prince Oil Spill in Korea. *Environmental Forensics*, **3**(3-4), 357-366.

Seconde étude (ARTICLE 2)

Dommmages à l'ADN étudiés par le test des comètes chez des mammifères nourris avec des moules contaminées par la marée noire de l'Erika

(DNA damage measured by the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in mammals fed with Erika oil spill-contaminated mussels)

L'objectif de cette seconde étude est identique à la première et concerne l'évaluation des effets génotoxiques suite à l'ingestion de moules marines contaminées par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), libérés dans le milieu marin lors du naufrage de l'Erika. Le schéma expérimental est proche : les niveaux de contamination sont différents et encadrent les niveaux étudiés dans la première étude et les repas de nourriture contaminée sont quotidiens. Le reste des conditions d'expositions est identique à la première étude, à part le lot de moules témoins qui proviennent d'un site différent (Les Saumonards, France). Des lots de 6 rats, ont reçu comme nourriture des moules témoins ou les moules contaminées durant 12 et 24 jours à raison d'un repas quotidien de bivalves. Six rats recevant une nourriture standard non contaminée (croquettes UAR, Epinay-sur-Orge), ont servi de témoins. Trois jours après le dernier repas de moules, les animaux ont été sacrifiés. Durant ce délai de trois jours, à la fin de l'exposition, les animaux ont reçu une nourriture non contaminée, identique à celle utilisée pour les témoins. L'analyse chimique de la nourriture a été réalisée en parallèle aux essais biologiques. Les dommages à l'ADN ont été étudiés par le test des comètes dans les cellules du foie, de la moelle osseuse et du sang circulant.

Les niveaux de contamination des moules originaires des zones impactées par la marée noire, exprimés par la somme des 16 HAPs dans la matière sèche et par les quantités d'équivalents toxiques en benzo(a)pyrène (TEQs), calculées en utilisant les facteurs d'équivalents toxiques (TEFs) définis par Nisbet et LaGoy (1992), sont les suivants :

- 310 µg/kg m.s. soit 34 µg/kg TEQs
- 570 µg/kg m.s. soit 82 µg/kg TEQs
- et 870 µg/kg m.s. soit 179 µg/kg TEQs.

La contamination de ces moules par les HAPs méthylés et les dérivés thiophènes est plus faible que celle observée pour les moules utilisées dans la première étude. Les moules témoins présente un profil global de contamination différent, comparativement aux moules contaminées suite à la marée noire de l'Erika. La somme des 16 HAPs ($69 \mu\text{g/kg m.s.}$) dans les moules témoins est inférieure aux valeurs mesurées dans les bivalves, dans les études de surveillance du littoral français (RNO, 2002).

Globalement sur les trois populations cellulaires étudiées, aucune différence n'est mise en évidence entre les rats ayant reçu une nourriture standard et ceux ayant reçu des moules témoins. Une relation dose effet temps a été observée pour les dommages à l'ADN mesurés dans le foie et la moelle osseuse. Dans les hépatocytes, les effets observés sont plus importants que dans la moelle osseuse. Les niveaux des dommages à l'ADN dans les deux tissus, sont plus élevés à trente jours, comparativement à quinze jours, pour les deux niveaux de contamination de la nourriture les plus élevés (570 et $870 \mu\text{g/kg m.s.}$), alors que pour le premier niveau de contamination ($310 \mu\text{g/kg m.s.}$), aucune différence entre les deux dates de sacrifice n'a été mise en évidence, ce qui semble indiquer une réparation efficace des dommages à l'ADN dans ces conditions d'exposition. Au niveau des cellules nucléées du sang périphérique, quelle que soit la nourriture ingérée, les niveaux de dommages à l'ADN observés chez les différents individus sont identiques à ceux observés chez les témoins.

Dans cette étude, des dommages à l'ADN dans les cellules de rats nourris régulièrement par des moules contaminées sont observés, confirmant un transfert de polluants génotoxiques. La sensibilité du foie, en terme de dommages à l'ADN, mesurés suite aux expositions alimentaires sur quinze et trente jours, est plus grande que celle de la moelle osseuse. Au niveau des leucocytes du sang périphérique, aucun dommage à l'ADN n'est mis en évidence. Le test des comètes apparaît comme un outil privilégié pour étudier la biodisponibilité de composés génotoxiques dans la nourriture et dans des échantillons environnementaux. Sa prédictivité, en terme de cancérogénicité semble limitée dans le cas d'expositions chroniques. Une étude de la réversibilité des dommages à l'ADN, suite à l'arrêt de l'exposition par la voie alimentaire aux polluants de marée noire présents dans les moules, est nécessaire.

DNA DAMAGE MEASURED BY THE SINGLE-CELL GEL ELECTROPHORESIS (COMET) ASSAY IN MAMMALS FED WITH ERIKA OIL-SPILL CONTAMINATED MUSSELS³

LEMIERE Sébastien¹, COSSU-LEGUILLE Carole¹, BISPO Antonio², JOURDAIN Marie-José², LANHERS Marie-Claire³, BURNEL Daniel³ and VASSEUR Paule¹

¹ESE, CNRS FRE 2635, University of Metz, UFR SciFA, rue Delestraint, F-57070 Metz ;

²IRH Environnement, 11 bis rue Gabriel Peri, BP 286, F-54515 Vandoeuvre-lès-Nancy ;

³INSERM U420, Faculté de médecine, 9 Av. Forêt de Haye, F-54505 Vandoeuvre-lès-Nancy

Abstract : This research aimed to estimate potential genotoxicity for consumers resulting from the ingestion of seafood contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) released into the marine environment after the Erika wreck. Mussels (*Mytilus sp.*) collected from sites on the Atlantic coast which were affected by the oil slick in varying degrees, were used to feed rats daily for 2 and 4 weeks. DNA damage was measured using the Comet assay in the liver, bone marrow and blood of rats receiving food contaminated with 310 µg of 16 PAHs /kg dry weight (d.w.) equivalent to 34 µg TEQs (toxic equivalent quantities to benzo(a)pyrene) / kg d.w. mussels, 570 µg/kg d.w. (82 µg TEQs /kg) and 870 µg/kg d.w. (179 µg TEQs/kg). A dose-effect-time relationship was observed between the intensity of DNA damage in the liver and bone marrow of rats and the PAH contamination level of mussels. Genotoxicity increased from 15 to 30 days in rats receiving food at the two highest PAH levels. In rats fed with mussels containing 34 µg TEQs/kg d.w., no significant change in liver and bone marrow was recorded at 30 days compared to 15 days, indicating efficient DNA repair capacity at a low level of exposure. No genotoxicity was found in peripheral blood. Globally, the observed effects were rather moderate. These results underlined the bioavailability of pollutants in fuel-oil contaminated mussels to consumers and confirmed the usefulness of the Comet assay as a sensitive tool in biomonitoring when analyzing responses to PAH transfer through food webs.

Keywords : Polycyclic aromatic hydrocarbons, oil spill pollutants, Erika wreck, Comet assay, DNA damage, food transfer.

³ ARTICLE soumis à *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*

INTRODUCTION

Twenty thousand tons of heavy fuel oils containing high levels of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were released into the marine environment after the wreck of the Erika tanker on the Atlantic coast in December 1999. The spill was a disaster for aquatic life, birds, marine fauna and flora. Besides the direct lethal effects of this massive pollution, indirect effects might result from the contamination of food webs. PAHs of high molecular weight were the most threatening hazardous pollutants of the fuel oil due to their persistence, as well as their mutagenic and carcinogenic properties. As Invertebrates could bioaccumulate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Scarpato *et al.*, 1990 ; Meador *et al.*, 1995 ; Solé *et al.*, 1996 ; Law *et al.*, 2002), the transfer of these pollutants through the food chain to vertebrates was a concern (Earampamoorthy and Koff, 1975 ; Nunn *et al.*, 1996). Indeed, the PAH contamination levels in mussels could have reached 3000 µg PAHs /kg dry weight (d.w.). The French Agency for Food Safety (AFSSA) rapidly regulated the consumption of seafood, which was forbidden above a contamination level of 500 µg total PAHs /kg tissue (d.w.). This threshold did not take into consideration whether the type of PAH congeners was of low or high molecular weight.

Our research aimed to estimate the potential genotoxicity of repeated ingestion of PAH contaminated seafood in mammals. We chose to study mussels contaminated with levels of PAHs roughly equivalent to the threshold established by AFSSA in order to confirm the relevance of their recommendation, and to assess the level of mussel consumption which would not have toxic effects for mammals. Genotoxicity was studied in rats (*Rattus norvegicus*) fed daily with mussels over 15 and 30 days. The contamination levels of mussels (*Mytilus sp.*) were expressed as the sum of PAH derivatives measured in soft tissues and the values of TEQ (toxic equivalent quantity) corresponding to the 16 PAHs recommended for analysis (AFSSA, 2000). TEQs -toxic equivalent quantities to benzo(a)pyrene (BaP) in µg /kg mussels - were calculated using the TEFs (Toxic Equivalent Factors) as defined by Nisbet and Lagoy (1992).

Contaminated mussels had been sampled in sites more or less affected by the oil slick. The 16 PAH congeners listed as priority pollutants by the US-EPA for environmental biomonitoring (OFR, 1982) were analyzed in mussels immediately after sampling by IFREMER. Several batches of mussels with levels ranging between 250 and 850 µg/kg d.w. expressed as total of 16 PAHs in soft tissues were used to constitute three homogenous batches of contaminated food. PAHs were measured again with their alkylated and thiophene derivatives in the batches

of food composed by grinded mussel tissues, in order to evaluate the PAH daily intake of rats. Mussels from a reference site were used as control food.

DNA damage was measured in the liver, the bone marrow and the blood of rats by means of single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. Indeed, this assay appears appropriate for the study of low levels of DNA damage and tissue sensitivities of rodents exposed to genotoxic agents (Singh *et al.*, 1988 ; Sasaki *et al.*, 1997 a,b ; Sasaki *et al.*, 2000 ; Sasaki *et al.*, 2002 ; Sekihashi *et al.*, 2002 ; Tsuda *et al.*, 2000).

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

All reagents were of analytical or molecular biology grade.

Chemical analysis of food

Mussels were collected by IFREMER teams from areas impacted to various degrees by the oil slick of the Erika tanker. The batches of contaminated food were prepared as follows : frozen mussels were opened, soft tissues were mixed, homogenized in a grinder and distributed into pools of 12 to 15 g (each pool constituting one meal).

Chemical analyses were performed on samples dried at 40°C until constant mass. Extraction of PAHs was conducted by ASE extractor (Accelerated Solvent Extractor 200, from DIONEX, Sunnyvale, USA), allowing a solid/liquid extraction at 100°C and under pressure (136 bars). Dichloromethane and hexane were used as extraction solvents (ratio 50:50 ; v:v). After solvent evaporation, extracts were dissolved in acetonitrile. PAHs were separated and detected by reversed high performance liquid chromatography (HPLC), coupled with a spectrofluorimeter and a UV/diode array detector. Concentrations were expressed by the mean values and standard deviation of the measurements. Total PAH concentrations corresponded to the sum of the concentrations of the 16 PAHs analyzed. In addition, the identification of the methylated and related PAHs was performed by gas-chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) after lyophylisation of the samples and extraction under warmth and pressure. Quantification limits are indicated in table 1.

Animals and treatment

Five groups of twelve male Wistar rats weighing 110-130 g (Charles River Laboratories (in the past IFFACREDO), Les Oncins, Saint-Germain sur l'Arbresle, France) and acclimatized one week before treatment, were composed randomly. The first group, defined as controls (C), received standard food (croquettes from UAR, Epinay-sur-Orge, France) ; the second one received mussels sampled from the reference site named "Les Saumonards" in the North of Brittany (France). These were used as control mussels (CM). The three other groups were fed with mussels contaminated with a total of the 16 PAHs around 300 µg/kg d.w. (M^+), 550 µg/kg d.w. (M^{++}) and 850 µg/kg d.w. (M^{+++}). A food portion of 13 g (on average, fresh weight) was administered daily to each rat. Six animals from each group were sacrificed after 15 days and the six others after 30 days. In all cases, the animals were killed three days after the last meal of mussels. Tissues from the rats (liver, peripheral blood) were sampled and stored at -196°C in liquid nitrogen except for intact femurs, which were kept at -20°C before bone marrow extraction. Blood samples were collected in heparinized tubes. Cellular suspensions of bone marrow were prepared after animal sacrifice by scraping and washing the inside of the femurs. For this tissue, suspensions were kept at -196°C after progressive freezing (4 hrs at -20°C ; one night at -80°C and -196°C in liquid nitrogen). Every tissue sample from each animal was analyzed separately and not pooled.

Alkaline Single-cell gel electrophoresis (Comet) assay

DNA damages were quantified by means of the Comet assay as described by Singh *et al.* (1988) with minor modifications. Assays were performed under inactinic light at 4°C . Cellular suspensions from livers were obtained by mechanical shaking of 150 mg tissue in 10 mL PBS with 10 % DMSO added as antioxidant before treatment. Differential centrifugations were used to isolate cells from other scraps. Suspensions of bone marrow cells, stored in liquid nitrogen, were thawed just before the assay. Circulating blood was diluted in physiological saline with 2 % DMSO added in order to limit coagulation and cell suspensions were enriched by single centrifugations.

Slides were prepared in triplicate for each sample. 300 µL of cell suspension were added to 300 µL of 1 % low-melting point (LMP) agarose. 75 µL were transferred onto slides, covered with a coverslip and left on ice 10 min to allow agarose to solidify. The coverslip was gently removed and a second layer (75 µL of 0.5 % LMP agarose) was spread, covered and left on

ice for 10 min. After the removal of the coverslips, the slides were immersed in freshly prepared cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris – pH 10 – 1 % N-laurylsarcosinate, 1 % Triton X100 and 10 % DMSO) for 2 h in order to isolate the nuclei and eliminate the cytoplasm and membranes. Thereafter, slides were placed in an electrophoresis box, covered with the electrophoresis buffer (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA) to allow DNA unwinding during 21 min, and then electrophoresed (300 mA, 21 min, 20 V). Slides were washed twice during 10 min in neutralizing buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) before dehydration in a batch of absolute ethanol for 10 min. Nuclear DNA was stained with 25 µL ethidium bromide (20 µg/mL) and observed using an epifluorescence microscope (BX60 Olympus) connected to an image analysis system (Komet 3:1 Kinetic Imaging Ltd). Fifty cells were analyzed per slide, with 3 slides per animal, so that 900 cells were observed for each modality studied in the first experiment (50 x 3 x 6 animals). Cells were scored randomly on the central part of the gel. Slides were coded independently and scored without knowledge of the code. The percentage of DNA in the tail was chosen to express DNA damage because the interexperimental and interelectrophoresis variations registered using this parameter were very low (De Boeck *et al.*, 2000).

Mean values and S.E.M. were calculated. Arbitrary classes of DNA damage in cell populations were defined according to the percentage of DNA in the tail : 0-20 % (class 0), 20-40 % (class 1), 40-60 % (class 2), 60-80 % (class 3) and >80 % (class 4).

As Comet data were not normally distributed, non-parametric statistical tests were used. The Kruskal-Wallis and the median tests, applied on raw data, were used to compare the different treatments. Cell distributions based on the degree of damage were analyzed by means of the Chi-square tests. Differences in cells of treated rats as compared to controls (C) and (CM) were considered as significant when $p \leq 0.05$.

RESULTS

Chemical analysis of food

PAH contamination profiles of mussels differed in the impacted areas from the reference site (table 1). Chrysene, pyrene and fluorene were present in mussels originating only from the impacted zone. Phenanthrene, fluoranthene and benzo(a)pyrene were found in all the batches of mussels, although at a much higher level at the impacted sites than in the reference area. In the impacted areas, benzo(a)pyrene concentrations in mussels increased in proportion with the

total contamination level. The correlation was not so clear for phenanthrene and fluoranthene although the highest concentrations were found in the two most contaminated batches of mussels. At the impacted sites, the total of 16 PAHs in batches of contaminated mussels averaged 310 $\mu\text{g/kg d.w.}$ in batch (M^+), 570 $\mu\text{g/kg d.w.}$ in (M^{++}) and 870 $\mu\text{g/kg d.w.}$ in (M^{+++}), corresponding to 34, 82 and 179 $\mu\text{g TEQs/kg d.w.}$, respectively.

Methylated PAHs and benzothiophenes were also present in the most contaminated mussels (M^{++} and M^{+++}), but at similar concentrations. These levels did not increase with the total contamination by the 16 PAHs. No TEQs were established for these derivatives.

PAH contamination was absent from standard food (C). Food of control mussels from the reference site (CM) contained a total of 69 $\mu\text{g/kg PAHs}$ represented mainly by phenanthrene and fluoranthene and equivalent to 6 TEQs. Therefore, TEQs in contaminated mussels were 5, 14 and 30 fold higher in M^+ , M^{++} and M^{+++} , respectively, than in control mussels CM.

Alkaline Single-cell gel electrophoresis (Comet) assay

In hepatocytes, a higher level of DNA damage ($p < 0.001$) was observed in rats fed with the contaminated food (M^+ , M^{++} and M^{+++}) compared to controls (figure 1). No significant difference was found in hepatocytes of rats fed with standard food (C) and rats fed with control mussels (CM). Whether the experiment lasted 15 or 30 days, the majority of cells (97-98 %) presented little or no damage (class 0), while 2-3 % of cells ranked in class 1 (percentage of DNA in the tail between 20-40%) (figure 1).

In rats fed over 15 days with mussels from impacted areas, the degree of DNA damage increased with the PAH contamination level of food. In rats M^+ and M^{++} , the percentage of hepatocytes with damaged DNA was around 12 % in class 1 and 1.4-1.7 % in class 2 (40-60% DNA in the tail). In rats fed with M^{+++} , the number of cells with DNA breaks was significantly higher than in the two previous groups ($p < 0.001$), with 21 %, 5.2 %, and 1.2 % hepatocytes in class 1, 2 and 3 respectively.

After 30 days of experiment, no difference was noted in rats M^+ , but the intensity of damaged nuclei increased significantly in rats fed with M^{++} and M^{+++} in comparison with 15 days. In the hepatocytes of rats M^{++} , the percentage of highly-damaged cells (class 2) was 3.3 % versus 1.7 % after 15 days ($p = 0.025$) and the increase was greater in rats M^{+++} with 8.2 % hepatocytes in class 2 versus 6.2 % after 15 days ($p = 0.014$).

In bone marrow cells, the basal level of damage in controls was low with less than 3 % cells in class 1. A significant increase in DNA damage was observed in rats fed with contaminated mussels (figure 2). The distribution of cells with altered nuclei was similar in rats M^+ , M^{++} and M^{+++} after 15 days, with 8-10 %, 1-2 % and 0.2 % of cells in class 1, 2 and 3, respectively.

After 30 days, the number of DNA damaged cells in M^+ rats did not differ significantly compared to 15 days.. On the other hand, it was higher in rats M^{++} and M^{+++} , with 15 % cells in class 1, 2.5-3 % in class 2, and 0.2 % in class 3 ($p < 0.001$) . No significant difference was noted in the distribution of DNA-altered cells between rats M^{++} and M^{+++} ($p = 0.87$) (figure 2).

In blood cells, no difference was registered between animal groups, whatever the type of food – standard or mussels - or the duration of the experiment (figure 3). Less than 1.5% cells in control rats fed with standard food presented DNA breaks (class 1), and no significant increase was noted in rats fed with contaminated mussels after 15 and 30 days of experiments.

Some examples of nuclei observations by means of the comet assay were presented in the figure 4.

DISCUSSION

This work demonstrated the occurrence of genotoxic damage due to the consumption of mussels contaminated by the Erika oil slick pollutants. Genotoxic effects were registered in the liver and the bone marrow. No effect of this PAH-contaminated food was observed in circulating blood. The intensity of DNA damage in liver and bone marrow increased with the PAH contamination level of the mussels. The proportion of cells which presented damaged DNA and the degree of DNA injuries were greater in the liver than in the bone marrow. Indeed, the liver is clearly efficient in the metabolism of PAHs known to be activated into genotoxic metabolites, in their conjugation and elimination via the bile. The relative rate of xenobiotic metabolism is much lower in bone marrow than in the liver (Schreck and Latt, 1980). The greater sensitivity of the liver to genotoxic compounds was also registered by Sekihashi *et al.* (2002) in mice and rats exposed to aflatoxin B1, or azobenzene but also to a direct alkylating agent methylmethane sulfonate (MMS).

When experiments did not exceed 15 days, DNA damage in bone marrow was of the same order of magnitude at the three levels of exposure (34, 82 and 179 $\mu\text{g TEQs/kg d.w. mussels}$). Several explanations can be given. Either PAH bioavailability in bone marrow was limited, or biotransformation systems activating PAHs into genotoxic metabolites were saturated. It can also be argued that elimination systems were sufficient to prevent increased damage at high exposure dose. Yet, these adaptive capacities are limited as it appeared from increased genotoxicity after 30 days at the two higher exposure doses which were equivalent to an intake of 82 and 179 $\mu\text{g TEQs / kg mussel}$.

At the lowest exposure dose (34 $\mu\text{g TEQs/kg d.w. mussels}$), genotoxicity in rats did not increase over time beyond 15 days in the liver and in bone marrow. This indicates that detoxification systems remained efficient over time in neutralizing and eliminating PAH metabolites, and/or repairing DNA damage. This is in accordance with the fast elimination of PAHs in mammals at a low level of exposure, and the capacities of vertebrates to repair DNA. A balance between DNA damage, elimination and repair occurred in these tissues.

It appeared from the results that the threshold of PAH daily intake deemed to have genotoxic effects in rats was below 34 $\mu\text{g TEQs/kg d.w. mussels}$. The fact that no genotoxic effect over time was registered in mussels from the reference site, which contained 6 TEQs, allowed us to set the genotoxicity threshold within the wide range 6-34 $\mu\text{g TEQs/kg d.w. mussels}$ which corresponds to the range 0.04-0.225 $\mu\text{g TEQs/kg body weight (b.w.)}$ in rats. Additional studies would be necessary to fix this threshold more precisely.

The interest of the present work was to use samples representative of an environmental pollution by PAHs and not to study artificially-polluted samples. In the case of oil slicks, mussels had especially been studied to follow the impact of the pollution as regards contamination using biomarkers or tissue burden analyses (Solé *et al.*, 1996 ; Glegg *et al.*, 1999 ; Harvey *et al.*, 1999 ; Thomas *et al.*, 1999 a,b ; Fernley *et al.*, 2000 ; Yim *et al.*, 2002). However, these organisms had never been studied as a vector of pollution to mammals, even though the hypothesis of a transfer of contaminants from seafood to consumer has been put forward since 1975 by Earampamoorthy and Koff.

The mutagenicity of some bivalve organic extracts had already been highlighted by means of indirect bacterial tests, in particular in the days following an oil spill and twelve months later for certain samples (Kadhim and Parry, 1984). Similar results had been observed in the case of industrial pollution, such as that arising from aluminum refineries and the forestry product industries (White *et al.*, 1997).

The genotoxic and carcinogenic properties of PAHs, and especially of congeners with five or six aromatic rings, are well known in vertebrates (IARC, 1973, 1987), and this explains why these compounds are taken into consideration in environmental samples contaminated with PAHs mixtures. Yet, the fraction of the 16 PAHs classically analyzed corresponded to 0.3 % in weight of the Erika oil (Tronczynski *et al.*, 2002). Therefore a contribution of other hydrocarbon derivatives and contaminants to toxicity was possible. In our work, methyl-substituted PAHs and benzothiophenes were also found in mussels. The search for these compounds and PAH metabolites in bivalves has not been recommended in chemical analyses so far and no TEF has been established for these compounds. Nevertheless, they might possess toxic properties similar to non-substituted PAHs (Sinsheimer, 1992 ; Poon *et al.*, 1997, 1998 ; Borosky, 1999 ; Binet *et al.*, 2002). So, the use of TEQs based only on the 16 PAHs minimizes the global toxicity that can be deduced from chemical analyses and does not adequately reflect contamination in mussels after the Erika oil spill and the consecutive observed adverse effects (Lemière *et al.*, in press).

The comparison of our results with other studies on rats exposed to PAH-complex mixtures is difficult due to the difference in conditions of exposure and endpoints. Studies on PAH-contaminated soils (Fouchécourt *et al.*, 1999) have measured effects due to PAH exposure by inhalation and ingestion without quantifying animal intake. In addition, genotoxicity was evaluated by quantifying DNA adducts, and not DNA breaks as with the Comet assay. In other studies on PAH-contaminated soils, CYP 1A induction was measured in several tissues, but genotoxicity was not considered (Roos, 2002 ; Roos *et al.*, 2002). Müller *et al.* (2004) and Dybdahl *et al.* (2003) measured DNA damage using the Comet assay after orally exposing Big Blue rats to diesel exhaust particules during a period of 21 days. They found DNA damage at a relatively low level of PAH in particules, corresponding to 0.01 µg total PAHs/kg b.w. . Although the PAH contamination profiles differed, the level of DNA strand breaks and the order of food contamination were similar to our conditions.

The comparison of our results with experimental studies carried out on mammals exposed orally to a single PAH such as BaP could seem easier. Yet, very high doses of benzo(a)pyrene in the diet or given by gavage had generally been used, which limits extrapolations and comparisons. To our knowledge, no assessment of the genotoxic effect of BaP in orally-treated rats in the long term had been done using the Comet assay. Garry *et al.* (2003) used endotracheally treated rats with a single dose of 0.75, 1.5, 3 mg BaP per animal, i.e. 3.5, 7.5 and 15 mg BaP/kg b.w. rat. Kliesch *et al.* (1982) analysed chromosomal damage

in mouse bone marrow and found a significant effect at the lowest effective dose of 6.25 mg/kg BaP after a single treatment. This dose was more than three orders of magnitude higher than the highest daily intake we tested (1.6 µg TEQ/kg b.w. rat (table 3)). Indeed, the PAH-contaminated food tested here ranged between 6 and 179 µg TEQ/ kg d.w. mussels, corresponding to the range of 0.8-24 ppb TEQs (µg/kg fresh weight mussels). These PAH contamination levels were similar to the limit values for consumer exposure to BaP fixed by the WHO (1996) in drinking water (0.7 µg/l) and by the EEC (1988) in meat products (1 µg/kg). Rigdon and Neal (1966) conducted a long-term experiment on rats fed for several weeks with a diet containing 50-250 ppm BaP, and found gastric tumours in 70% animals after 4-6 months. More recently, Culp *et al.* (1998) fed mice a BaP-contaminated diet (between 5 and 100 ppm) and also founds tumours after a 2-year experiment. This corresponded to a daily intake between 2500 and 10000 times higher than the highest mussel concentration (M+++) used by us. Brune *et al.* (1981) conducted a carcinogenicity study on Sprague Dawley rats given 0.15 mg/kg b.w. 5 days per week and observed forestomach, oesophagus and larynx tumours : although this treatment dose is the lowest which can be found in literature in long term studies, the doses used are 100 to 3000 times higher than the ones we used.

Therefore, the genotoxicity results found in rats fed with contaminated mussels cannot be interpreted in terms of carcinogenic potential, nor of mutagenicity. In their study in rats fed a diet containing diesel particles, Muller *et al.* (2004) pointed out that DNA damage was not associated with an increased mutation rate in tissues of Big Blue rats. In addition, as DNA repair is possible, it would be necessary to study the capacity of rats to recover undamaged DNA after repeated ingestion of PAH contaminated food..

CONCLUSION

The present study demonstrated the occurrence of genotoxic damage in rats fed with contaminated mussels, thus underlining the bioavailability of genotoxic pollutants in oil-contaminated mussels to consumers. Rather moderate genotoxic injuries were observed mainly in the liver and to a lesser extent in the bone marrow after a daily consumption of contaminated food for 15 and 30 days. No genotoxicity was found in peripheral blood. The study of DNA damage by means of the Comet assay was confirmed as a sensitive criterion for assessing bioavailability and genotoxicity of food pollutants for consumers. The threshold of

contamination of mussels below which no genotoxicity could be expected, is in the range of 6-34 µg TEQs/kg d.w. (69-310 µg of the 16 PAHs /kg of food d.w.). Complementary studies would be necessary to define thresholds of food contamination which would be devoid of toxic effects for consumers and to study the reversibility of genotoxic effects after the consumption of contaminated food. Finally, only the 16 PAHs selected by US-EPA for biomonitoring were taken into account in the actual recommended level and more knowledge of the other PAH derivatives found in ERIKA polluted samples is needed.

Acknowledgements : *This research was supported by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development. We thank IFREMER teams for their collaboration. The authors are grateful to Tracy Carmona for her help in correcting the English form of this paper.*

REFERENCES

- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), 5 février 2000, Avis du groupe d'experts réunis par l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur les critères de toxicité alimentaire présentés par la pollution engendrée par le naufrage de l'ERIKA, Maisons-Alfort, France, 7 p.
- Binet S., Pfohl-Leszkowicz A., Brandt H., Lafontaine M. and Castegnaro M., 2002, Bitumen fumes: review of work on the potential risk to workers and the present knowledge on its origin, *Science of the Total Environment*, **300**(1-3), 37-49.
- Borosky G.L., 1999, Theoretical study related to the carcinogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives, *Journal of Organic Chemistry*, **64**, 7738-7744.
- Brune H., Deutsch-Wenzel R.P., Habs M., Ivankovic S. and Schmahl D., 1981, Investigation of the tumorigenic response to benzo(a)pyrene in aqueous caffeine solution applied orally to Sprague-Dawley rats, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **102**(2), 153-157.
- Culp S.J., Gaylor D.W., Sheldon W.G., Goldstein L.S. and Beland F.A., 1998, A comparison of the tumours induced by coal tar and benzo[a]pyrene in a 2-year bioassay, *Carcinogenesis*, **19**, 117-124.
- De Boeck M., Touil N., De Visscher G., Aka Vande P. and Kirsch-Volders M., 2000, Validation and implementation of an internal standard in Comet assay analysis, *Mutation Research*, **469**(2), 181-197.
- Dybdahl M., Rison L., Moller P., Autrup H., Wallin H., Vogel U., Bornholdt J., Daneshvar B., Dragsted L.O., Weimann A., Poulsen H.E. and Loft S., 2003, DNA adduct formation and oxidative stress in colon and liver of Big Blue rats after dietary exposure to diesel particles, *Carcinogenesis*, **24**(11), 1759-1766.
- Earampamoorthy S. and Koff R.S., 1975, Health hazards of bivalve-mollusk ingestion, *Annals of Internal Medicine*, **83**(1), 107-110.
- European Economic Community, 1988, Council Directive, of 22 June 1988, on the approximation of the laws of member states relating to flavourings for use in foodstuffs and to source materials for their production (88/388/EEC), *Off. J. Communities*, L184: 61-65.
- Fernley P.W., Moore M.N., Lowe D.M., Donkin P. and Evans S., 2000, Impact of the Sea Empress oil spill on lysosomal stability in mussel blood cells, *Marine Environmental Research*, **50**(1-5), 451-455.
- Fouchécourt M.O., Arnold M., Berny P., Videmann B., Rether B. and Rivière J.L., 1999, Assessment of the bioavailability of PAHs in rats exposed to a polluted soil by natural routes: induction of EROD activity and DNA adducts and PAH burden in both liver and lung, *Environmental Research*, **80**(4), 330-339.

- Garry S., Nesslany F., Aliouat E.M., Haguenoer J.M. and Marzin D., 2003 a, Assessment of genotoxic effect of benzo[a]pyrene in endotracheally treated rat using the comet assay, *Mutation Research*, **534**, 33-43.
- Glegg G.A., Hickman L. and Rowland S.J., 1999, Contamination of Limpets (*Patella vulgata*) Following the Sea Empress Oil Spill, *Marine Pollution Bulletin*, **38**(2), 119-125.
- Harvey J.S., Lyons B.P., Page T.S., Stewart C. and Parry J.M., 1999, An assessment of the genotoxic impact of the Sea Empress oil spill by the measurement of DNA adduct levels in selected invertebrate and vertebrate species, *Mutation Research*, **441**(1), 103-114.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1973, Monograph on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Overall evaluations of carcinogenicity : Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds, 3, Lyon, France, 127 p.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1987, Monograph on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Overall evaluations of carcinogenicity : An updating of IARC Monographs volumes 1 to 42, Lyon, France, 440 p.
- Kadhim M. and Parry J.M., 1984, The detection of mutagenic chemicals in the tissues of shellfish exposed to oil pollution, *Mutation Research*, **136**(2), 93-105.
- Kliesch U., Roupova I. and Adler I.D., 1982, Induction of chromosome damage in mouse bone marrow by benzo[a]pyrene, *Mutation Research*, **102**(3), 265-273.
- Law R.J., Kelly C.A., Baker K.L., Langford K.H. and Bartlett T., 2002, Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments, mussels and crustacea around a former gasworks site in Shoreham-by-Sea, UK, *Marine Pollution Bulletin*, **44**(9), 903-911.
- Lemière S., Cossu-Leguille C., Bispo A., Jourdain M.J., Lanhers M.C., Burnel D. and Vasseur P., in press, Genotoxicity related to oil spill pollutant transfer from mussels to mammals via the food, *Environmental Toxicology*.
- Meador J.P., Stein J.E., Reichert W.L. and Varanasi U., 1995, Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms, *Reviews in Environmental Contamination and Toxicology*, **143**, 79-165.
- Müller AK., Farombi E.O., Moller P., Autrup H.N., Vogel U., Wallin H., Dragsted L.O., Loft S. and Binderup M.L., 2004, DNA damage in lung after oral exposure to diesel exhaust particles in Big Blue rats, *Mutation Research*, **550**, 123-132.
- Nisbet I.C. and LaGoy P.K., 1992, Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Regulatory toxicology and pharmacology* : RTP, **16**(3), 290-300.
- Nunn J.W., Livingstone D.R. and Chipman J.K., 1996, Effect of genetic toxicants in aquatic organisms, 225-251, In *Toxicology and Aquatic Pollution : Physiological Molecular and Cellular Approaches*, Society for Experimental Biology Seminar Series, **57**, Taylor E.W. (Ed), Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Office of the Federal Register (OFR), 1982, Appendix A : Priority Pollutants, Fed Reg 47:52309.
- Poon R., Davis H., Lecavalier P., Liteplo R., Yagminas A., Chu I. and Bihun C.J., 1997, Effects of benzothiophene on male rats following short-term oral exposure, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **50**(1), 53-65.
- Poon R., Davis H., Park G., Lecavalier P., Yagminas A., Elwin J., Chu I. and Valli V.E., 1998, Subchronic toxicity of Benzothiophene on rats following dietary exposure, *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, **55**(2), 133-150.
- Rigdon R.H. and Neal J., 1966, Effect of feeding benzo(a)pyrene on growth of young mice, *Texas Reports on Biology and Medicine*, **24**(3), 473-478.

- Roos P.H., 2002, Differential induction of CYP1A1 in duodenum, liver and kidney of rats after oral intake of soil containing polycyclic aromatic hydrocarbons, *Archives of Toxicology*, **76**, 75-82.
- Roos P.H., Tschirbs S., Welge P., Hack A., Theegarten D., Mogilevski G. and Wilhelm M., 2002, Induction of cytochrome P450 1A1 in multiple organs of minipigs after oral exposure to soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), *Archives of Toxicology*, **76**, 326-334.
- Sasaki Y.F., Izumiyama F., Nishidate E., Ohta T., Ono T., Matsusaka N. and Tsuda S., 1997 (a), Simple detection of *in vivo* genotoxicity of pyrimethamine in rodents by the modified alkaline single-cell gel electrophoresis assay, *Mutation Research*, **392**(3), 251-259.
- Sasaki Y.F., Kawaguchi S., Kamaya A., Ohshita M., Kabasawa K., Iwama K., Taniguchi K. and Tsuda S., 2002, The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives, *Mutation Research*, **519**(1-2), 103-119.
- Sasaki Y.F., Sekihasi K., Izumiyama F., Nishidate E., Saga A., Ishida K. and Tsuda S., 2000, The Comet Assay with Multiple Mouse Organs: Comparison of Comet Assay Results and Carcinogenicity with 208 Chemicals Selected from the IARC Monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, **30**(6), 629-799.
- Sasaki Y.F., Tsuda S., Izumiyama F. and Nishidate E., 1997 (b), Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay, *Mutation Research*, **388**(1), 33-44.
- Scarpato R., Migliore L., Alfinito-Cogneti G. and Barale R., 1990, Induction of micronuclei in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters, *Marine Pollution Bulletin.*, **21**(2), 74-80.
- Schreck R.R. and Latt S.A., 1980, Comparison of benzo(a)pyrene metabolism and sister chromatid exchange induction in mice, *Nature*, **288**, 407-408.
- Sekihasi K., Yamamoto A., Matsumura Y., Ueno S., Watanabe-Akanuma M., Kassie F., Knasmüller S., Tsuda S., Sasaki Y.F., 2002, Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay, *Mutation Research*, **517**(1-2), 53-75.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. and Schneider E.L., 1988, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, **175**, 184-191.
- Sinsheimer J.E., Hooberman B.H., Das S.K., Savla P.M. and Ashe A.J., 1992, Genotoxicity of chryseno[4,5-bcd]thiophene and its sulfone derivative, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **19**(3), 259-264.
- Solé M., Porte C., Biosca X., Mitchelmore C.L., Chipman J.K., Livingstone D.R. and Albaiges J., 1996, Effects of the "Aegean Sea" Oil Spill on biotransformation enzymes, oxydative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.), *Comparative Biochemistry and Physiology*, **113C**(2), 257-265.
- Thomas R.E., Brodersen C., Carls M.G., Babcock M. and Rice S.D., 1999 (a), Lack of physiological responses to hydrocarbon accumulation by *Mytilus trossulus* after 3-4 years chronic exposure to spilled Exxon Valdez crude oil in Prince William Sound, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **122**(1), 153-163.
- Thomas R.E., Harris P.M. and Rice, S.D., 1999 (b), Survival in air of *Mytilus trossulus* following long-term exposure to spilled Exxon Valdez crude oil in Prince William sound. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **122**(1), 147-152.
- Tronczynski J., Moisan K., Munshy C., Truquet I., Dugrais L. and Guiot N., 2002, Etude des empreintes chimiques du fuel de l'Erika et caractérisation de la contamination par les HAPs dans le Golfe de Gascogne, Actes du colloque SAFERSEAS : les leçons techniques de l'Erika et des autres accidents, Brest, 13-16 march 2002, CEDRE, Brest, 15 p.
- Tsuda S., Matsusaka N., Madarame H., Miyamae Y., Ishida K., Satoh M., Sekihasi K. and Sasaki Y.F., 2000, The alkaline single cell electrophoresis assay with eight mouse organs: results with 22 mono-functional

alkylating agents (including 9 dialkyl N-nitrosoamines) and 10 DNA crosslinkers, *Mutation Research*, **467**(1), 83-98.

White P.A., Blaise C. and Rasmussen J.B., 1997, Detection of genotoxic substances in bivalve molluscs from the Saguenay Fjord (Canada), using the SOS chromotest, *Mutation Research*, **392**(3), 277-300.

WHO, 1996, Guidelines for drinking water quality, Volume 2. Health criteria and other supporting information, Geneva, pp 495-505.

Yim U.H., Oh J.R., Hong S.H., Lee S.H., Shim W.J. and Shim J.H., 2002. Identification of PAHs Sources in Bivalves and Sediments 5 Years After the Sea Prince Oil Spill in Korea. *Environmental Forensics*, **3**(3-4), 357-366.

	Concentrations (in µg/kg dry weight mussels)						
	TEFs *	QL [#]	C	CM	M ⁺	M ⁺⁺	M ⁺⁺⁺
Polycyclic Aromatic Hydrocarbons							
Naphtalene	0.001	1	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]
Acenaphthylene	0.001	10	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]
Acenaphtene	0.001	1	< QL [#]	< QL [#]	8	9.4	16.7
Fluorene	0.001	1	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	12.1 ± 1	65.9 ± 13
Phenanthrene	0.001	1	< QL [#]	27.3	37.7 ± 7	33.5 ± 2	88.2 ± 31
Anthracene	0.01	1	< QL [#]	< QL [#]	8.8	< QL [#]	12.1
Fluoranthene	0.001	1	< QL [#]	35.4	61.2 ± 10	146.9 ± 12	100.8 ± 77
Pyrene	0.001	1	< QL [#]	< QL [#]	57.4 ± 9	84.4 ± 7	140.6 ± 15
Benzo(a)anthracene	0.1	1	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]
Chrysene	0.01	1	< QL [#]	< QL [#]	92.4 ± 1	203.1 ± 8	269.4 ± 14
Benzo(b)fluoranthene	0.1	1	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]
Benzo(k)fluoranthene	0.1	1	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]
Benzo(a)pyrene	1	1	< QL [#]	6.2	32.4 ± 5	79.4	176.1
Dibenzo(ah)anthracene	5	5	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]
Benzo(ghi)perylene	0.01	5	< QL [#]	< QL [#]	22.2	< QL [#]	< QL [#]
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	0.1	5	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]
Sum (µg/kg)	-	-	-	68.9	312.1	568.8	869.8
TEQs **	-	-	-	6.26	33.80	81.71	179.33
Substituted and related PAHs							
Methyl Phenanthrenes	-	1	-	16	-	41	39
Methyl Chrysenes	-	1	-	5	-	184	133
Dibenzothiophenes	-	1	-	< QL [#]	-	1	1
Benzo(b)napthothiophenes	-	2	-	< QL [#]	-	24	18

Table 1: PAHs and related contaminants in standard croquettes (C), and mussels sampled in a non impacted site (CM), and in impacted areas (M⁺; M⁺⁺; M⁺⁺⁺) : chemical analyses of the 16 PAHs on the priority list of US-EPA by HPLC (in µg/kg dry weight) and analysis of substituted and related PAHs by GC-MS (in µg/kg dry weight) ([#] quantification limits in µg/kg d.w. ; * toxic equivalent factor in B(a)P and ** toxic equivalent quantities (in µg of B(a)P per kg of food dry weight) according to Nisbet et Lagoy, 1992)).

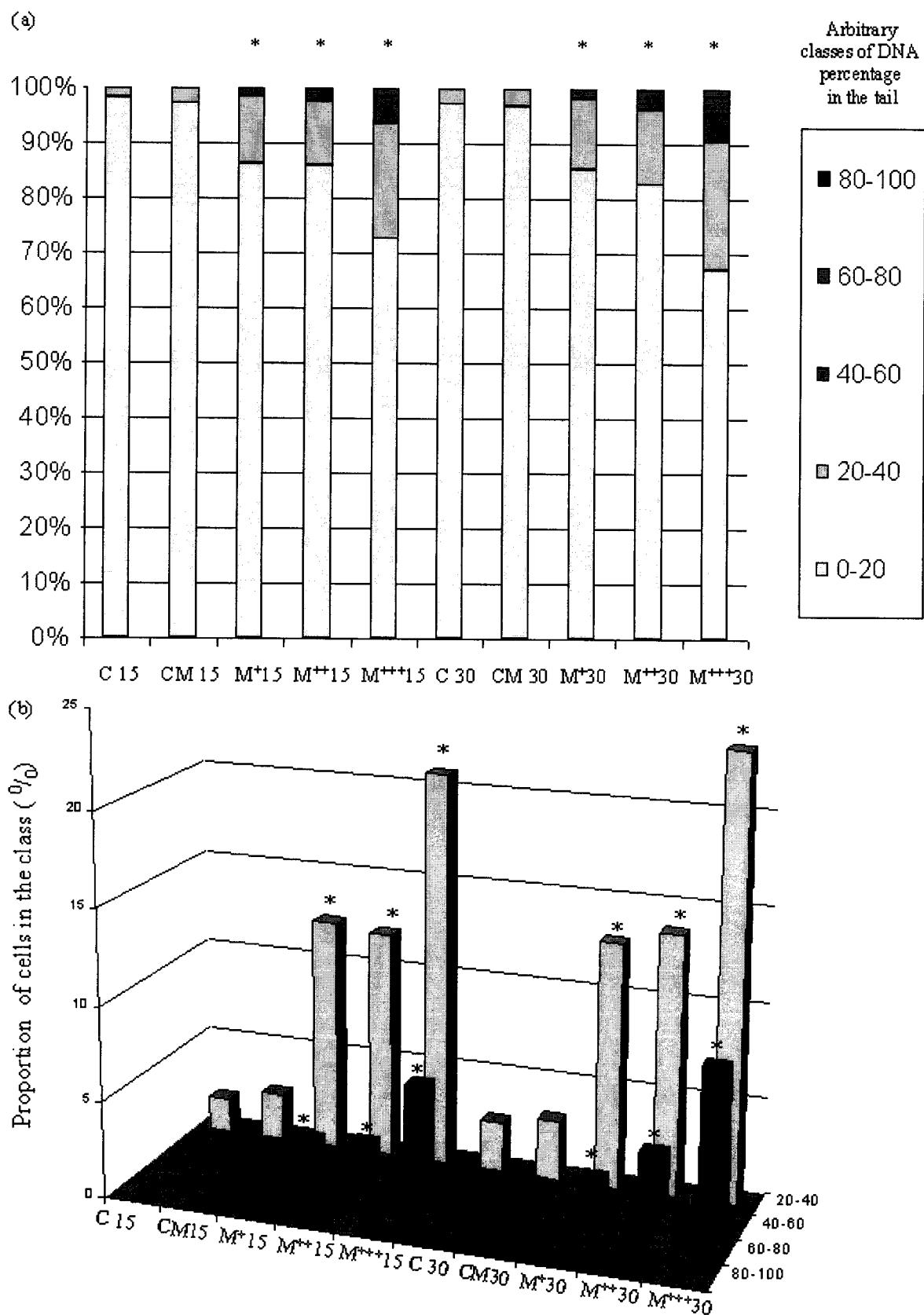


Figure 1 : DNA damage in hepatocytes of rats fed during 15 or 30 days with either standard food (C), mussels sampled in a non impacted site (CM), or in areas impacted to various degrees by the oil slick (M⁺, M⁺⁺ and M⁺⁺⁺) (6 animals per treatment ; Classes of DNA damage in the cell population considering DNA percentage in the tail : 0-20 % (class 0), 20-40 % (class 1), 40-60 % (class 2), 60-80 % (class 3) and >80 % (class 4) ; * significative difference with control ($p < 0.05$)) : (a) : Proportions of cells (%) in the 5 arbitrary classes of DNA percentage in the tail and (b) : Distributions of cells in the classes of DNA damage 1 to 4.

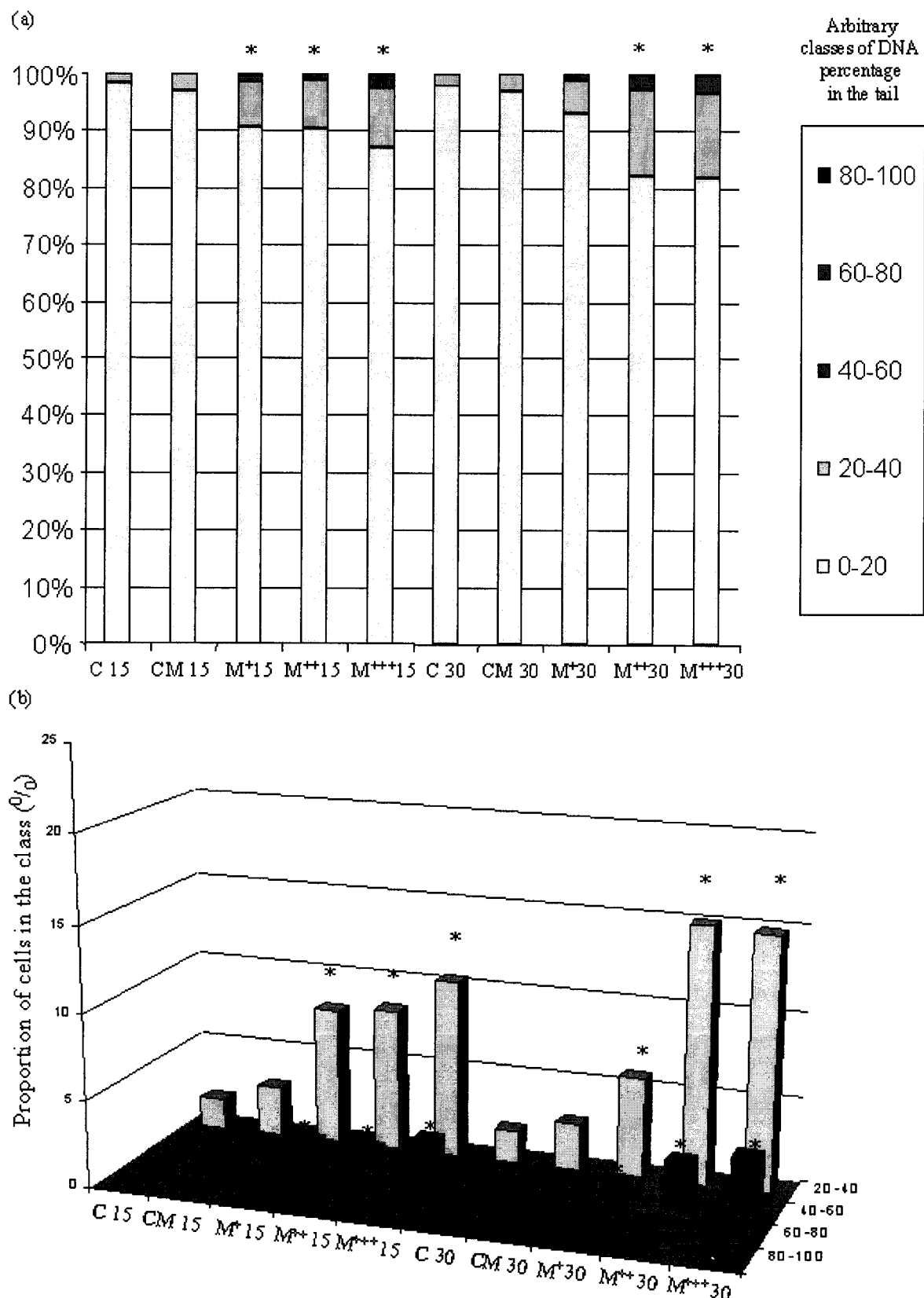


Figure 2 : DNA damage in bone marrow cells of rats fed during 15 or 30 days with either standard food (C), mussels sampled in a non impacted site (CM), or in areas impacted to various degrees by the oil slick (M^+ , M^{++} and M^{+++}) (6 animals per treatment ; Classes of DNA damage in the cell population considering DNA percentage in the tail : 0-20 % (class 0), 20-40 % (class 1), 40-60 % (class 2), 60-80 % (class 3) and >80 % (class 4) ; * significative difference with control ($p < 0.05$)) : (a): Proportions of cells (%) in the 5 arbitrary classes of DNA percentage in the tail and (b): Distributions of cells in the classes of DNA damage 1 to 4.

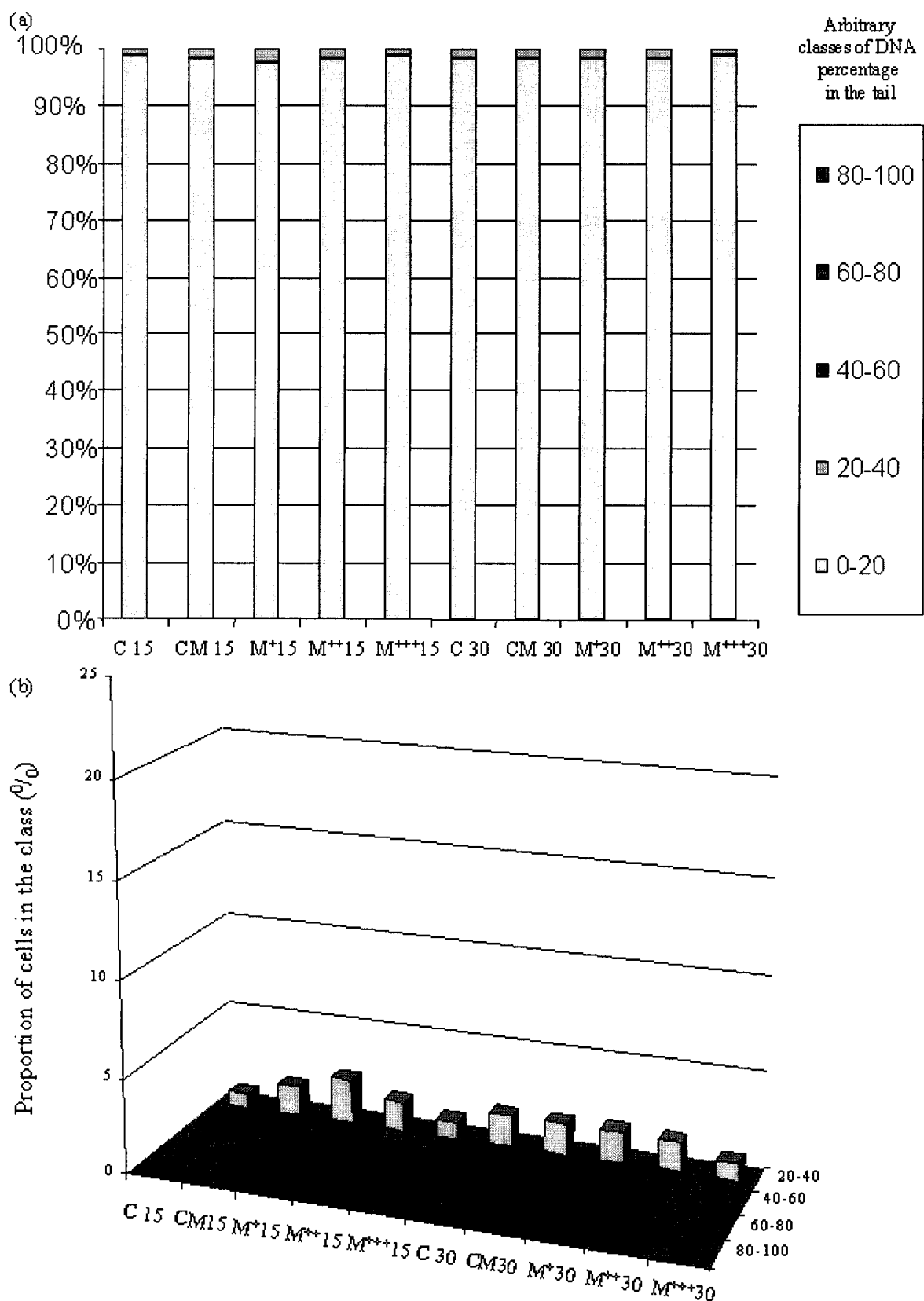


Figure 3 : DNA damage in peripheral blood nucleated cells of rats fed during 15 or 30 days with either standard food (C), mussels sampled in a non impacted site (CM), or in areas impacted to various degrees by the oil slick (M⁺, M⁺⁺ and M⁺⁺⁺) (6 animals per treatment ; Classes of DNA damage in the cell population considering DNA percentage in the tail : 0-20 % (class 0), 20-40 % (class 1), 40-60 % (class 2), 60-80 % (class 3) and >80 % (class 4)) : (a) : Proportions of cells (%) in the 5 arbitrary classes of DNA percentage in the tail and (b) : Distributions of cells in the classes of DNA damage 1 to 4.

	C 15	CM 15	M ⁺ 15	M ⁺⁺ 15	M ⁺⁺⁺ 15	C 30	CM 30	M ⁺ 30	M ⁺⁺ 30	M ⁺⁺⁺ 30
<u>Hepatocytes</u>										
<i>% cells in classes of DNA damage</i>										
80-100	0	0	0	0	0.1	0	0	0	0	0
60-80	0	0	0	0.5	1.2	0	0	0.2	0.4	1.5
40-60	0.1	0.1	1.4	1.7	5.2	0	0.1	1.6	3.3	8.2
20-40	1.8	2.4	12.3	12	20.9	2.6	3.1	12.9	13.7	23.2
0-20	98.1	97.5	86.3	85.8	72.6	97.4	97.8	85.3	82.6	67.1
Averaged Tail DNA	3.8	4.3	8.5*	9.7*	13.8*	4.5	4.7	8.8 *	10.7 *	15.5 *
S.E.M.	0.8	0.7	1.8	1.6	3.4	1.0	0.9	1.4	0.9	2.1
<u>Bone marrow cells</u>										
<i>% cells in classes of DNA damage</i>										
80-100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60-80	0	0	0.2	0	0.2	0	0	0.1	0.2	0.2
40-60	0	0.1	1.1	1.1	2	0	0.1	0.9	2.6	3.2
20-40	1.8	2.9	8	8.3	10.5	1.9	2.8	5.9	15	14.8
0-20	98.2	97	90.7	90.6	87.3	98.1	97.1	93.1	82.2	81.8
Averaged Tail DNA	4.1	4.3	7.2 *	7.5 *	8.7 *	4.2	4.5	6.2	9.9 *	10.8 *
S.E.M.	0.7	0.8	1.9	1.3	1.7	0.7	0.8	1.7	1.2	2.0
<u>Peripheral blood nucleated cells</u>										
<i>% cells in classes of DNA damage</i>										
80-100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60-80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40-60	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20-40	0.8	1.6	2.3	1.6	0.9	1.7	1.7	1.7	1.6	0.9
0-20	99.1	98.4	97.7	98.4	99.1	98.3	98.3	98.3	98.4	99.1
Averaged Tail DNA	3.7	3.6	4.0	4.2	3.8	3.9	4.0	4.2	3.9	3.6
S.E.M.	0.4	0.2	0.7	0.4	0.4	0.6	0.9	0.5	0.4	0.5

Table 2 : Distribution parameters of DNA damage in the three cell populations by comet assay (expressed in terms of DNA percentage in the tail : averaged Tail DNA and S.E.M.) for rats fed during 15 or 30 days with food constituted with either standard croquettes (C), or mussels sampled in a non impacted site (CM) and in less and more impacted areas (M⁺; M⁺⁺; M⁺⁺⁺) (900 cells per treatment were analyzed) (* significative difference with controls noted C (p< 0.01))

<i>Contamination level</i>	Unit	CM	M ⁺	M ⁺⁺	M ⁺⁺⁺
<i>Total 16 PAHs in mussels</i>	µg/kg dry weight	69	310	570	870
<i>TEQs in mussels</i>	µg/kg dry weight	6	34	82	179
	µg/kg fresh weight (ppb)	0.8	4.5	11	24
<i>TEQs per animal / day</i>	µg/kg fresh weight mussels*	0.01	0.06	0.14	0.31
	µg/kg body weight rat**	0.05	0.29	0.70	1.55

Table 3 : PAH concentrations in the batches of control and contaminated mussels and corresponding daily intake of rats fed with mussels
 (* rats were fed a diet of 13 g fresh weight mussel per day ; ** calculated on a averaged weight of 200 g)

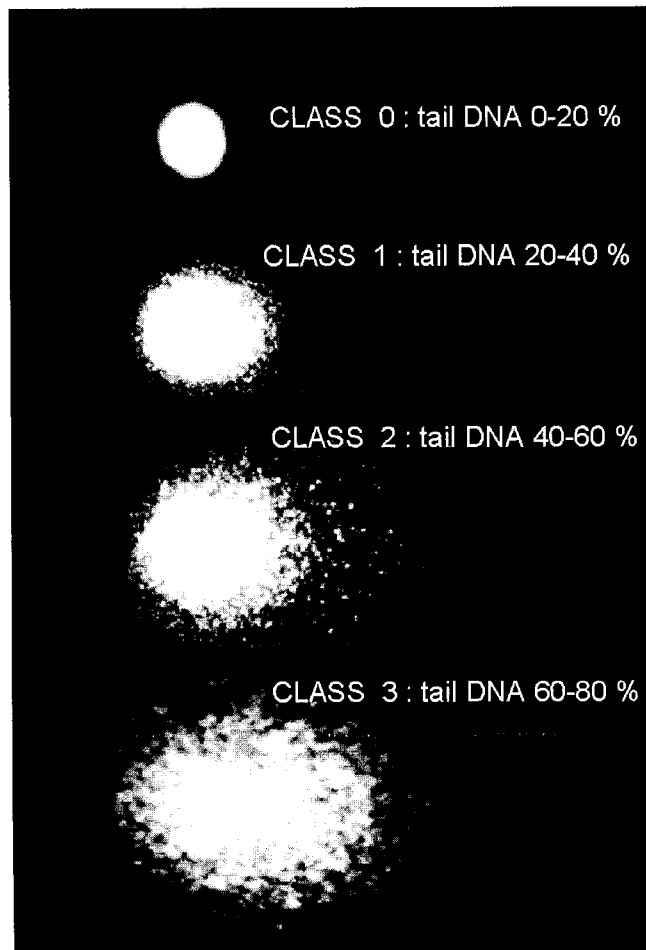


Figure 4 : Examples of nuclei observations in each class of DNA damage (class 0 to 3 ; hepatocyte)

Troisième étude (ARTICLE 3)

Réversibilité des effets génotoxiques chez des mammifères nourris avec des moules contaminées lors d'une marée noire.

(Reversibility of genotoxic effects in mammals fed a diet of oil spill-contaminated mussels)

L'objectif de ce travail était de compléter les deux études précédentes en étudiant la réversibilité des dommages à l'ADN observés lors du transfert alimentaire des polluants de marée noire. Le protocole d'exposition est identique à la seconde étude. Des lots de 4 rats ont reçu comme nourriture des moules témoins ou des moules contaminées, durant 12 jours à raison d'un repas quotidien de bivalves. Les dommages à l'ADN ont été recherchés à trois dates consécutives : trois jours après le dernier repas, dix jours après, et dix-sept jours après la fin de l'exposition. Entre la fin de l'exposition et les dates de sacrifice, les animaux ont reçu une nourriture standard (croquettes UAR, Epinay-sur-Orge). Deux niveaux de contamination de la nourriture ont été étudiés (somme des 16 HAPs dans la matière sèche) : 230 et 570 µg/kg. La génotoxicité a été étudiée par le test des comètes dans les hépatocytes, les cellules de moelle osseuse et les cellules nucléées du sang périphérique.

Des effets génotoxiques sont observés dans le foie et la moelle osseuse de rats nourris pendant quinze jours par des moules contaminées par des polluants de marée noire. Aucun effet n'est jamais observé au niveau des cellules nucléées du sang périphérique. La génotoxicité enregistrée dans la moelle osseuse n'apparaît que dans le cas de l'ingestion quotidienne des moules les plus contaminées. Dès la première semaine après l'arrêt de l'exposition, une réduction des niveaux de dommages est mise en évidence au niveau du foie et de la moelle osseuse. Une semaine plus tard, la réparation apparaît complète dans les deux tissus, traduisant l'efficacité des systèmes de réparation de l'ADN chez les mammifères.

Ces résultats confirment ceux des précédentes études et soulignent l'intérêt du test des comètes pour étudier la génotoxicité d'échantillons environnementaux ainsi que l'évolution des dommages à l'ADN consécutifs aux expositions. L'absence de risques inhérents à la consommation de fruits de mer contaminés ne peut être affirmée, au vu des résultats de ces différents travaux. Cependant, un retour complet en deux semaines, des niveaux de dommages à l'ADN vers les niveaux de base observés dans les témoins est enregistré aux doses étudiées.

REVERSIBILITY OF GENOTOXIC EFFECTS IN MAMMALS FED A DIET OF OIL SPILL-CONTAMINATED MUSSELS⁴

LEMIERE Sébastien¹, COSSU-LEGUILLE Carole¹, JOURDAIN Marie-José², LANHERS Marie-Claire³, BURNEL Daniel³ and VASSEUR Paule¹

¹ESE, CNRS FRE 2635, University of Metz, UFR SciFA, Av. General Delestraint, F-57070 Metz, France ;

²IRH Environnement, 11 bis rue Gabriel Peri, BP 286, F-54515 Vandoeuvre-les-Nancy ;

³INSERM U420, Faculté de médecine, 9 Av. Forêt de Haye, F-54505 Vandoeuvre-les-Nancy

Abstract : Our work aimed to estimate the genotoxicity and reversibility of DNA damage in rats after repeated ingestion of oil spill-contaminated food. Rats were fed daily for 2 weeks with mussels contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) after the wreck of the Erika tanker. Two levels of mussel contamination below or roughly equivalent to the guide-value of PAHs in sea food [500 µg total PAHs /kg dry weight (d.w.)] defined by AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) were tested : 230 and 570 µg PAHs/kg d.w. mussel. Rats were monitored over two weeks after the contamination period. Genotoxicity was studied in the liver, the bone marrow and peripheral blood by means of the single-cell gel electrophoresis (COMET) assay. DNA damage was registered in the liver and the bone marrow of rats at the onset of the decontamination phase, but not in the circulating blood. Genotoxicity was registered in the liver for both levels of mussel contamination, while it was registered in bone marrow only at 570 µg PAHs/kg d.w. mussels. The return of DNA integrity to the baseline level was registered in the liver within one week in rats fed the 230 µg PAHs/kg d.w. contaminated diet, while it required two weeks at 570 µg PAHs/kg d.w.. Return to basal levels in bone marrow cells was also observed within two weeks.

Keywords : polycyclic aromatic hydrocarbons ; COMET assay ; DNA damage ; food transfer ; oil pollutants

⁴ ARTICLE soumis à *Marine Environmental Research*

INTRODUCTION

After an oil slick, it is necessary to evaluate the sanitary risks presented by pollutants in edible marine invertebrates. Indeed, pollutants bioaccumulated in bivalves could be transferred through the food webs, thus inducing hazardous effects in consumers. After the wreck of the Maltese oil tanker Erika, twenty thousand tons of fuel oil poured into the marine environment. The cargo consisted of a type-2 heavy fuel oil, which was a distillation residue of crude oil containing a high fraction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). These hydrocarbons, and especially the congeners with five or six aromatic rings, are known for their genotoxic and carcinogenic properties in vertebrates (IARC, 1973, 1987). PAHs are bioaccumulated in bivalves, in which their half life is much longer than in fish (Stegeman and Lech, 1991 ; Meador *et al.*, 1995). Therefore the transfer of these compounds to humans via food is a concern. A guide-value for marine products contaminated by the oil spill was rapidly fixed by the French Agency for Food Safety (Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA, 2000)) after the Erika oil slick. A total of 500 µg total PAHs/kg d.w. edible marine invertebrates was a threshold above which the selling of seafood to consumers was forbidden. The sixteen PAHs whose quantification had been recommended in seafood were naphtalene, acenaphthylene, acenaphtene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenzo(ah)anthracene, benzo(ghi)perylene and indeno(1,2,3-cd)pyrene. They corresponded to the US-EPA priority PAHs in environmental biomonitoring (OFR, 1982).

In a previous study, we demonstrated that genotoxicity in rats resulted from the repeated ingestion of Erika oil-contaminated mussels given to rats once every two days during a period of 2 and 4 weeks (Lemiere *et al.*, *in press*). Genotoxicity was observed in the liver and the bone marrow, but not in the circulating blood.

Here we investigate the genotoxicity and recovery of DNA damage in rats fed a diet consisting of fuel-oil contaminated mussels containing a PAH level below or fairly close to the guide-value recommended by AFSSA. The purpose of this study is to evaluate the soundness of this threshold. Two levels of PAH contamination related to the 16 US-EPA compounds in mussels were studied : 230 and 570 µg PAHs/kg d.w. mussels. Bivalves had been sampled in areas of the South coast of Brittany impacted by the oil slick. Mussels sampled on the North coast of Brittany, non impacted by the Erika pollution, served as food for control rats (CM). Rats were fed with mussels daily for 2 weeks. Genotoxicity was evaluated during an additional period of 17 days after the end of the oral exposure period.

DNA damage in rats was assessed by means of the single-cell gel electrophoresis (COMET) assay carried out on cells from the liver, the bone marrow and peripheral blood. The COMET assay is a microelectrophoretic technique used on isolated nuclei in agarose gel, first described by Singh *et al.*, (1988) and measuring not only direct single and double strand breaks but also alkali-labile sites and secondary strand breaks consecutive to enzyme repair activity (Speit and Hartmann, 1995 ; Horvathova *et al.*, 1998). This assay has demonstrated its usefulness in the study of genotoxicity of environmental samples and is considered a useful tool in genetic toxicology and in ecotoxicology owing to its sensitivity and its cell-by-cell approach (Nacci *et al.*, 1996 ; Cotellet et Férard, 1999 ; Sumathi *et al.*, 2001 ; Rajaguru *et al.*, 2003 ; Roy *et al.*, 2003).

MATERIALS AND METHODS

Mussels (*Mytilus sp.*) were initially collected from sites of the French Atlantic coast impacted to various degrees by the Erika oil slick. Sampling was carried out by IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'exploitation de la Mer) in Nantes. The mussels were kept at -20°C . We made up food batches whose levels of PAH contamination were 230 and 570 μg total PAHs / kg dry weight (d.w.) mussels. The food preparation and the quantification of PAH derivatives were conducted as described previously (Lemière *et al.*, *in press*).

Three groups of twelve male Wistar rats were randomly composed. The control rats (CM) daily received control mussels (CM) sampled in the non-impacted site named Les Saumonards in North Brittany (France). Rats receiving a diet of artificial food – croquettes delivered from UAR (Epinay-sur-Orge, France) - were used as additional controls. The other animals received a ration of 13 g (fresh weight) mussels daily, during a period of fifteen days, - either the contaminated mussels M+ (230 μg PAHs / kg d.w.) or M++ (570 μg PAHs / kg d.w.). During the recovery phase, the animals were fed croquettes only. Four rats from each lot were sacrificed three days after the last meal of contaminated food (noted t_0), four others seven days later (t_{+7}), and the last four fourteen days later (t_{+14}). The control rats fed the artificial food were killed at t_0 and t_{+14} only.

All the collected tissues (liver and peripheral blood) were stored at -196°C in liquid nitrogen except intact femurs which were kept at -20°C before bone marrow extraction. Cellular suspensions of bone marrow were prepared by scraping and washing the inside of the femur with phosphate-buffered saline (PBS, Ca^{++} and Mg^{++} free, pH 7.4) with 10 % dimethylsulfoxide (DMSO) added and then stored at -196°C , after progressive freezing.

DNA damage was quantified by means of the Comet assay according to Singh *et al.* (1988) with minor modifications described previously (Lemière *et al.*, in press). To summarize, assays were performed in triplicate under inactinic light at 4°C, for each sample. After electrophoresis, nuclear DNA was stained with 25 µL ethidium bromide (20 µg/mL) and observed using an epifluorescence microscope (BX60 Olympus) connected to an image analysis system (Komet 3:1, Kinetic Imaging Ltd). Fifty cells from each tissue were analyzed per slide, three slides were examined per animal and four animals per group, so that 600 cells (50x3x4) were observed for each variation studied. Cells were scored randomly on the central part of the gel. All slides were coded and scored blindly. The percentage of DNA in the tail was chosen to express DNA damage and arbitrary classes of DNA damage in cell populations were defined according to this parameter : 0-20 % (class 0), 20-40 % (class 1), 40-60 % (class 2), 60-80 % (class 3) and >80 % (class 4). Non-parametric statistical tests were used to compare the results : the Kruskal-Wallis and the median tests, applied to raw data, were used to compare the different variations while cellular distributions were analyzed by means of the Chi-square test. Differences in cells of treated rats as compared to controls (CM) or between individuals at different times, were considered as significant when $p \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

PAH contamination profiles of mussels were different in the impacted areas compared to the non-impacted sites (table 1). PAH contamination was not absent in mussels sampled at the non-impacted station “Les Saumonards” (CM), but their tissue content in the 16 PAHs (69 µg/kg d.w.) was below the chronic level of mussel contamination registered around the French coasts (130 µg/kg d.w.) (RNO, 2002). In mussels sampled in areas impacted by the Erika oil slick, PAHs with 5 aromatic rings were represented by benzo(a)pyrene (BaP) and benzo(b)fluoranthene, but no compounds with 6 aromatic rings were present. The sum of the 16 PAHs was expressed in toxic equivalent quantities (TEQs) using the toxic equivalent factors (TEFs) to BaP as defined by Nisbet and Lagoy (1992). TEQs reached 31 in M+ and 82 µg TEQs/kg d.w. in M++ while it was 6 µg TEQs/kg d.w. in control mussels. Methylated PAHs and benzothiophenes were also found in the contaminated mussels, but were not taken into consideration in TEQ values, because no TEF had been established for these compounds.

The baseline of DNA breaks in liver, bone marrow and peripheral blood was similar in control rats whether they were fed control mussels or an artificial diet, and the mean

percentage of DNA in the tail averaged 4.35 ± 0.8 % in hepatocytes, 4.2 ± 0.1 % in bone marrow cells and 4.2 ± 0.7 in blood cells.

In rats fed with the Erika contaminated mussels, no significant DNA damage was observed in nucleated cells of peripheral blood during the whole experiment, whatever the level of mussel contamination. Globally, the level of DNA damage in this tissue averaged 4.8 ± 0.6 % , a value similar to the baseline measured in control rats ($p = 0.73$) (table 2).

On the other hand, at the first date of sacrifice t_0 , DNA damage was registered in the liver and the bone marrow of rats fed with the most contaminated mussels M++ (570 $\mu\text{g/kg dw}$). Only lesions of the liver were recorded in rats fed M+ mussels. The mean percentages of DNA in the tail averaged 8 ± 1.0 % in these three cell populations (table 2). Cells with a higher level of damage (class 2) were recorded in the liver and the bone marrow of rats fed mussels M++ compared to rats fed mussels M+ (figure 1).

During the following two weeks, DNA lesions dropped in both tissues. In hepatocytes, DNA integrity totally recovered within 7 days in rats M+ (230 $\mu\text{g/kg dw}$), but within 14 days in rats M++ (570 $\mu\text{g/kg dw}$). At t_{+7} , recovery in rats M++ concerned primarily highly damaged cells of class 2, while no change appeared in class 1 cells. At t_{+14} , the hepatocyte population had returned to the baseline level and was similar to the controls.

In bone marrow, the number of DNA damaged cells in rats M++ decreased at t_{+7} , the decrease concerned class 1 and class 2 damaged cells. Recovery was only observed at t_{+14} , no significant difference with controls being noted at that time ($p < 0.10$).

To summarize, genotoxic effects were registered in the liver and the bone marrow 3 days after the last ingestion of a daily contaminated diet of fifteen days. Repair was total within the following two weeks in both tissues. The lower the level of mussel contamination, the faster the recovery, as shown in hepatocytes within 7 days in rats fed M+ mussels. No impact of PAH contaminated mussel consumption, was observed in circulating blood.

The intensity of DNA damage in the liver remained moderate, with an average level of DNA in the tail not exceeding 8 % and a proportion of damaged cells of class 1 and 2 inferior to 15%. This study confirmed our previous results (Lemière *et al.*, *in press*) on account that : (i) the liver appeared more sensitive than the bone marrow to genotoxicity of the ingested pollutants ; (ii) the DNA background damage in controls averaged 4.3 ± 0.5 % expressed as median tail DNA in the liver and the bone marrow. These results were in accordance with backgrounds of median tail DNA % found by other authors, i.e. 4 ± 1 % (Moller *et al.*, 2002)

and 4 ± 2 % (Dybdahl *et al.*, 2003) in the liver of Big Blue rats, and in the range 4-5 % in the liver and gills of fish (Belpaeme *et al.*, 1998) ; (iii) repair occurred rapidly and was efficient enough to counterbalance the effects of genotoxic agents at the low level of contamination as shown in bone marrow. Efficiency appeared also in our previous study in which DNA damage in rats fed 310 $\mu\text{g/kg}$ d.w. mussels did not increase although the duration of contamination was twice as long.

In the present study, DNA integrity recovered in less than 10 days after the last ingestion of contaminated food at the low PAH level (230 $\mu\text{g/kg}$ d.w. mussels). It is possible that total recovery occurred before the end of the 7-day period separating COMET measurements in our experiment design.

Generally, DNA repair is triggered rapidly after initiation of DNA damage. Yet, as long as genotoxic pressure overwhelms repairing capacity, repair is masked and becomes apparent only after exposure to genotoxic agents has stopped. The speed of recovery depends on several factors : the cell type studied, the species, the exposure lengths, the genotoxic agent and the intensity of initial damage (Pandurangi *et al.*, 1995 ; Ralph *et al.*, 1996; Rajaguru *et al.*, 2001 ; Taddei *et al.*, 2001; Aoyama *et al.*, 2003 ; Hook and Lee, 2004 ; Russo *et al.*, 2004). In rats fed a single ingestion of a metal-contaminated diet, repair was significant 24h after the peak of DNA damage could be observed and occurred within 72h after treatment with mercury (Grover *et al.*, 2001), nickel (Dana Devi *et al.*, 2004), chromates (Dana Devi *et al.*, 2001) and lead (Dana Devi *et al.*, 2000). Recovery was also obtained within 20h in grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, exposed to Chrome VI, while larvae, at the developmental stage IV, were less susceptible to DNA damage, but also less competent in repair (Hook and Lee, 2004). Repair was effective 24h after the peak of damage in erythrocytes of the newt after exposure to MMS (methyl methane sulfonate) (Ralph *et al.*, 1996). Rajaguru *et al.* (2001) observed a complete repair in erythrocytes of *Rana hexadactyla*, 24h after exposure of the amphibians to EMS (ethyl methane sulfonate) and 48h after their exposure to organic sulfur dyes. Yet, repair may take much longer as was found in rats exposed to EGME (ethylene glycol methyl ether) in bone marrow and spermatocytes (Anderson *et al.*, 1996). In this case, DNA damage still remained significant two weeks after the end of the exposure.

Repair had been mainly studied in cells in which the kinetics of repair is fast and especially after ionizing treatment. Only a few studies have been conducted *in vivo*.

A high rate of repair is a condition for safety and DNA integrity, because DNA breaks can be transformed into non-reversible mutations if repair is delayed. Therefore, the consequences of

genotoxicity recorded in rats receiving a diet contaminated with 570 µg PAHs/kg dw mussels is a matter for discussion although damage was repaired within two weeks. Indeed, before DNA integrity is restored, the structural genomic alterations may result in a dysfunction of the corresponding genomic sequences. Mutations could result from DNA damage produced during the replication phase (Christmann *et al.*, 2003, Sarasin, 2003).

Genomic alterations of housekeeping genes, protooncogenes, and tumor suppressor genes may be detrimental to the cell cycle control and to the differentiation of highly active dividing cells. The bone marrow is the site of origin of pluripotent stem cells, which are self-renewing cells from which all other hematopoietic cells are derived. DNA damage in bone marrow, - a tissue characterized by its constant mitotic activity, rapidity and intensity of cell division and differentiation, - may have harmful consequences to blood and immune systems. Consequently, the probability that the genome of dividing cells is altered during the two weeks required for repair is not negligible, even though no abnormal DNA breaks were found in peripheral blood.

The Comet assay is appropriate for the detection of hazardous effects of genotoxic agents. It gives an instant picture of the intensity of damage affecting the genome and integrating the effects of genotoxic agents and of repair systems. Yet, it is not sufficient in itself to assess the long term consequences of DNA alterations.

In the present case, the AFSSA threshold of 500 µg total PAH/kg d.w. mussels would be equivalent to 70 µg TEQ/kg d.w. mussels, a value extrapolated from TEQs of M+ and M++ mussels. From the results of this study, it cannot be concluded that the AFSSA threshold of 500 µg total PAH/kg dw mussels is a guarantee of safety for consumers. Indeed, recovery of DNA integrity was observed after the oral contamination with mussels containing 570 µg total PAHs /kg d.w. (82 µg TEQs/kg d.w.), a level close to the AFSSA threshold, but only after a period of 2 weeks. No damage was found in bone marrow at 230 µg/kg dw mussels, therefore a threshold of 31 µg TEQs/kg dw mussel could be proposed rather than the present AFSSA guide-value, if bone marrow effects are taken into consideration. This proposal holds true provided that the liver genomic lesions observed at this level are insignificant because of rapid repair. Otherwise, only a threshold below 31 µg TEQs/kg dw mussel would be acceptable. Additional studies would be necessary to specify the level of mussel contamination between 6 µg TEQs/kg d.w. mussel - the level in control mussels - and 31 µg TEQs/kg d.w. mussel, deemed to be devoid of genotoxicity in the liver.

CONCLUSION

An absence of risks linked to the consumption of contaminated seafood could not be ascertained from these results. The threshold of contamination of the mussels, at which genotoxicity was recorded in the liver was 31 µg TEQs/kg d.w. mussels or 235 µg total PAHs /kg d.w.. Certainly, the study related to a daily intake of contaminated mussels during two weeks is not fully representative of human consumption ; yet, this is not a worst-case scenario because higher PAH concentrations in Erika-contaminated mussels could be found during the months following the oil-spill. A lower guide-value than the present AFSSA threshold of 70 µg TEQs/kg d.w. seafood would be adviseable.

For a better extrapolation from chemical analyses to biological effects, it would be useful to know the genotoxic activity of substituted PAHs and thiophenes in order to take into account all mussel contaminants in TEQ assessment when no biological survey in consumers is conducted.

These results confirm the usefulness of the comet assay as a diagnostic tool in environmental genotoxicology. DNA damage was registered in rats fed with contaminated mussels, thus underlining that genotoxic pollutants in oil-contaminated mussels are bioavailable to consumers. Although DNA damage observed in the liver and the bone marrow did not last beyond two weeks, the consequences of genotoxicity before repair have to be considered.

Acknowledgements : *This research was supported by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development – Liteau Programme. We thank IFREMER teams for their cooperation. The authors warmly acknowledge Tracy Carmona for her help in correcting the English form of the paper.*

REFERENCES

- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), 5 février 2000, Avis du groupe d'experts réunis par l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur les critères de toxicité alimentaire présentés par la pollution engendrée par le naufrage de l'ERIKA, Maisons-Alfort, France, 7 p.
- Anderson D., Dhawan A., Yu T.W. and Plewa M.J., 1996, An investigation of bone marrow and testicular cells *in vivo* using the comet assay, *Mutation Research*, **370**(3-4), 159-174.
- Aoyama K., Iwahori K. and Miyata N., 2003, Application of *Euglena gracilis* cells to comet assay: evaluation of DNA damage and repair, *Mutation Research*, **538**(1-2), 155-162.
- Belpaeme K., Cooreman K. and Kirsch-Volders M., 1998, Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish, *Mutation Research*, **415**, 167-184.
- Christmann M., Tomicic M.J., Roos W.P. and Kaina B., 2003, Mechanisms of human DNA repair: an update, *Toxicology*, **193**(1-2), 3-34.

- Cotelle S. and Ferard J.F., 1999, Comet assay in genetic ecotoxicology : A Review, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **34**, 246-255.
- Dana Devi K., Rozati R., Saleha Banu B. and Grover P., 2004, *In vivo* genotoxic effect of nickel chloride in mice leukocytes using comet assay, *Food And Chemical Toxicology*, **42**(5), 751-757.
- Dana Devi K., Rozati R., Saleha Banu B., Jamil K. and Grover P., 2001, *In vivo* genotoxic effect of potassium dichromate in mice leukocytes using comet assay, *Food and Chemical Toxicology*, **39**(8), 859-865.
- Dana Devi K., Saleha Banu B., Grover P. and Jamil K., 2000, Genotoxic effect of lead nitrate on mice using SCGE (comet assay), *Toxicology*, **145**(2-3), 195-201.
- Dybdahl M., Rison L., Moller P., Autrup H., Wallin H., Vogel U., Bornholdt J., Daneshvar B., Dragsted L.O., Weimann A., Poulsen H.E. and Loft S., 2003, DNA adduct formation and oxidative stress in colon and liver of Big Blue rats after dietary exposure to diesel particles, *Carcinogenesis*, **24**(11), 1759-1766.
- Grover P., Saleha Banu B., Dana Devi K. and Begum S., 2001, *In vivo* genotoxic effects of mercuric chloride in rat peripheral blood leucocytes using comet assay, *Toxicology*, **167**(3), 2001, 191-197.
- Hook S.E and Lee R.F., 2004, Genotoxicant induced DNA damage and repair in early and late developmental stages of the grass Shrimp *Palaemonetes pugio* embryo as measured by the comet assay, *Aquatic Toxicology*, **66**, 1-14.
- Horvathova E., Slamenova D., Hlicikova L., Mandal T.K., Gabelova A. and Collins A.R., 1998, The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay, *Mutation Research*, **409**, 163-171.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1973, Monograph on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Overall evaluations of carcinogenicity : Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds, 3, Lyon, France, 127 p.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1987, Monograph on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Overall evaluations of carcinogenicity : An updating of IARC Monographs volumes 1 to 42, Lyon, France, 440 p.
- Lemièrre S., Cossu-Leguille C., Bispo A., Jourdain M.J., Lanhers M.C., Burnel D. and Vasseur P., in press, Genotoxicity related to oil spill pollutant transfer from mussels to mammals via the food, *Environmental Toxicology*.
- Meador J.P., Stein J.E., Reichert W.L. and Varanasi U., 1995, Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms, *Reviews in Environmental Contamination and Toxicology*, **143**, 79-165.
- Møller P., Wallin H., Vogel U., Autrup H., Risom L., Hald M.T., Daneshvar B., Dragsted L.O., Poulsen H.E., Henrik E. et Loft S., 2002, Mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in colon and liver of Big Blue rats: role of DNA adducts, strand breaks, DNA repair and oxidative stress, *Carcinogenesis*, **23**(8), 1379-1385.
- Nacci D.E., Cayula S. and Jackim E., 1996, Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay, *Aquatic toxicology*, **35**, 197-210.
- Nisbet I.C. and LaGoy P.K., 1992, Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Regulatory toxicology and pharmacology* : RTP, **16**(3), 290-300.
- Office of the Federal Register (OFR), 1982, Appendix A : Priority Pollutants, Fed Reg 47:52309.
- Pandurangi R., Petras M., Ralph S. and Vrzoc M., 1995, Alkaline single cell gel (Comet) assay and genotoxicity monitoring using Bullheads and Carps, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **26**, 345-356.

- Rajaguru P., Kalpana R., Hema A., Suba S., Baskarasethupathi B., Kumar P.A. and Kalaiselvi K., 2001, Genotoxicity of some sulfur dyes on tadpoles (*Rana hexadactyla*) measured using the comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **38**(4), 316-22.
- Rajaguru P., Suba S., Palanivel M. and Kalaiselvi K., 2003, Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues, *Environmental And Molecular Mutagenesis*, **41**(2), 85-91.
- Ralph S., Petras M., Pandrangi R. and Vrzoc M., 1996, Alkaline single-cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **28**(2), 112-120.
- Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO). 2002. Surveillance du milieu marin, travaux du RNO. IFREMER, Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, France. 48p.
- Roy L.A., Steinert S., Bay S.M., Greenstein D., Sapozhnikova Y., Bawardi O., Leifer I. and Schlenk D., 2003 a, Biochemical effects of petroleum exposure in hornyhead turbot (*Pleuronichthys verticalis*) exposed to a gradient of sediments collected from a natural petroleum seep in CA, USA, *Aquatic Toxicology*, **65**(2), 159-169.
- Russo C., Rocco L., Morescalchi M.A. and Stingo V., 2004, Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **57**(2), 168-174.
- Sarasin A., 2003, An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis, *Mutation Research*, **544**(2-3), 99-106.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. and Schneider E.L., 1988, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, **175**, 184-191.
- Speit G. and Hartmann A., 1995, The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay), *Mutagenesis*, **10**(6), 555-559.
- Stegeman J.J. and, Lech J.J., 1991, Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species : carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure, *Environmental Health Perspectives*, **90**, 101-109.
- Sumathi M., Kalaiselvi K., Palanivel M., Rajaguru P., 2001, Genotoxicity of textile dye effluent on fish (*Cyprinus carpio*) measured using the comet assay, *Bulletin Of Environmental Contamination and Toxicology*, **66**(3), 407-414.
- Taddei F., Scarcelli V., Frenzilli G. and Nigro M., 2001, Genotoxic hazard of pollutants in cetaceans : DNA damage and repair evaluated in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) by the comet assay, *Marine Pollution Bulletin*, **42**(4), 324-328.

	TEFs *	QL [#]	C	CM	M ⁺	M ⁺⁺
Polycyclic Aromatic Hydrocarbons						
Naphtalene	0.001	1	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]
Acenaphthylene	0.001	10	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]
Acenaphthene	0.001	1	< QL [#]	< QL [#]	2.2	9.4
Fluorene	0.001	1	< QL [#]	< QL [#]	2.8	12.1 ± 1
Phenanthrene	0.001	1	< QL [#]	27.3	29.3	33.5 ± 2
Anthracene	0.01	1	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]
Fluoranthene	0.001	1	< QL [#]	35.4	56.9	146.9 ± 12
Pyrene	0.001	1	< QL [#]	< QL [#]	31.7	84.4 ± 7
Benzo(a)anthracene	0.1	1	< QL [#]	< QL [#]	16.2	< QL [#]
Chrysene	0.01	1	< QL [#]	< QL [#]	57.5	203.1 ± 8
Benzo(b)fluoranthene	0.1	1	< QL [#]	< QL [#]	9.2	< QL [#]
Benzo(k)fluoranthene	0.1	1	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]
Benzo(a)pyrene	1	1	< QL [#]	6.2	27.5	79.4
Di-benzo(ah)anthracene	5	5	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]
Benzo(ghi)perylene	0.01	5	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	0.1	5	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]	< QL [#]
Sum (µg/kg)	-	-	-	68.9	233.2	568.8
TEQs **	-	-	-	6.3	30.7	81.7
Substituted and related PAHs						
Methyl Phenanthrenes	-	1	-	16	8	41
Methyl Chrysenes	-	1	-	5	30	184
Dibenzothiophenes	-	1	-	< QL [#]	1	1
Benzo(b)naphthothiophenes	-	2	-	< QL [#]	3	24

Table 1: PAHs and related contaminants in standard food (C) and in mussels sampled in a non impacted site (CM), and in impacted areas (M⁺ and M⁺⁺) (concentrations in µg/kg dry weight ; [#] quantification limits in µg/kg d.w. ; * toxic equivalent factor in B(a)P and ** toxic equivalent quantities (in µg of B(a)P per kg of food dry weight) according to Nisbet et Lagoy, 1992).

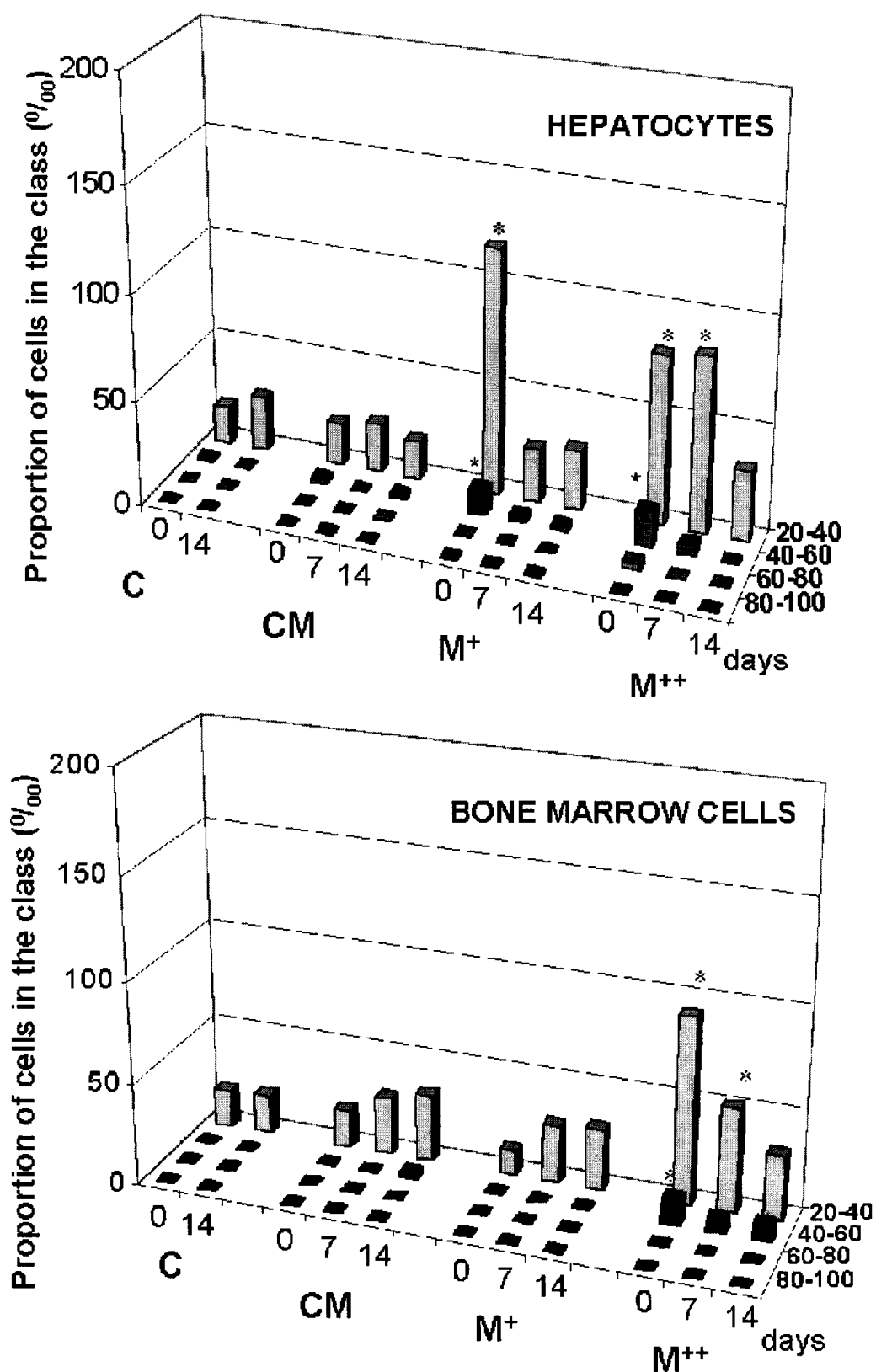


Figure 1: Evolution of the proportions of cells observed in the classes of DNA damage : 20-40%, 40-60 % , 60-80 % and > 80 % (Tail DNA) for hepatocytes and bone marrow cells of rats fed during 15 days with standard food or with mussels sampled in a non impacted site (CM), or in less and more impacted areas (M⁺ and M⁺⁺), and sacrificed at spread out dates : three days after the end of food exposure (t₀), seven days later (t₇) and fourteen days later (t₁₄) (4 animals for each modalities).

	C t ₀	C t ₋₁₄	CM t ₀	CM t ₊₇	CM t ₊₁₄	M ⁻ t ₀	M ⁺ t ₊₇	M ⁺ t ₊₁₄	M ⁺⁺ t ₀	M ⁺⁺ t ₊₇	M ⁺⁺ t ₊₁₄
HEPATOCYTES											
<i>% of cells in classes of DNA damage</i>											
80-100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60-80	0	0	0	0	0	0	0	0	0.3	0	0
40-60	0.1	0	0.2	0	0.2	1.2	0.3	0.2	1.7	0.5	0
20-40	1.8	2.6	2	2.3	1.8	11.7	2.5	2.8	8	8.3	3.3
0-20	98.1	97.4	97.8	97.7	98	87.1	97.2	97	90	91.2	96.7
Averaged Tail DNA	3.8	4.5	4.9	4.9	5.3	8.1 *	5.5	4.9	7.9 *	6.9 *	4.9
S.E.M.	0.8	1.0	0.5	0.2	0.5	1.0	0.5	0.6	0.8	1.0	0.5
BONE MARROW CELLS											
<i>% of cells in classes of DNA damage</i>											
80-100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60-80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40-60	0	0	0	0	0.3	0	0	0	1.3	0.7	0.8
20-40	1.8	1.9	1.8	2.8	3.3	1.2	2.8	3	9.2	5.1	3.2
0-20	98.2	98.1	98.2	97.2	96.4	98.8	97.2	97	89.5	94.2	96
Averaged Tail DNA	4.1	4.2	4.3	4.2	4.6	4.4	4.4	4.8	7.9 *	5.8 *	5.2
S.E.M.	0.7	0.7	0.3	0.6	0.7	0.1	1.0	0.7	2.2	1.1	0.5
PERIPHERAL BLOOD NUCLEATED CELLS											
<i>% of cells in classes of DNA damage</i>											
80-100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60-80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40-60	0.1	0	0	0	0	0.2	0.2	0.5	0.3	0	0.5
20-40	0.8	1.7	3.2	4	4	2.7	3.3	2.8	2	3.5	3.2
0-20	99.1	98.3	96.8	96	96	97.1	96.5	96.7	97.7	96.5	96.3
Averaged Tail DNA	3.7	3.9	4.7	4.8	5.0	4.4	4.7	4.9	4.7	5.1	5.0
S.E.M.	0.4	0.6	0.4	0.7	1.5	0.7	0.5	0.1	0.6	0.7	0.3

Table 2 : DNA damage (Averaged TAIL DNA percentages and S.E.M.) in the three cell populations by comet assay for rats fed during 15 days with either standard food or mussels and sacrificed at spread out dates 3 days after the end of food exposure (t₀), 7 days later (t₊₇) and 14 days later (t₊₁₄) (600 cells per treatment were analyzed ; * significative difference with control mussels at the same time (p = 0.05))

Seconde partie (ARTICLE 4)

Domages à l'ADN mesurés par le test des comètes et 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine mesurée par HPLC-EC en conditions de stress oxydatif chez le bivalve dulçaquicole *Unio tumidus*

(DNA Damage (Comet assay) and 8-oxodGuo (HPLC-EC) in relation to oxidative stress in the freshwater bivalve Unio tumidus)

La seconde partie de ce travail concernait des expositions *in vivo* au benzo(a)pyrène et au fer ferrique de bivalves dulçaquicoles *Unio tumidus*. Nous avons comme objectif l'étude des relations entre deux paramètres de génotoxicité et un paramètre de toxicité : la mesure des taux de 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine, l'étude des dommages à l'ADN mesurés par le test des comètes et les niveaux de malondialdéhyde, indicateurs de la peroxydation lipidique, dans le cadre d'une exposition à des xénobiotiques capables d'induire un stress oxydant. Ces travaux visaient à étudier le lien entre un stress oxydant et des effets toxiques et génotoxiques chez cet invertébré et à approcher les possibles effets de synergies toxiques entre le B(a)P et le fer ferrique. Nous souhaitions étudier la complémentarité d'une approche multimarqueur et l'informativité de chacun des paramètres au laboratoire en vue d'applications ultérieures sur le terrain, en conditions environnementales.

Les bivalves ont été exposés pendant 6 jours, en conditions contrôlées avec un changement quotidien du milieu d'exposition. Les concentrations de toxique utilisées étaient :

- 20 et 40 mg/L de Fe^{3+}
- 50 et 100 $\mu\text{g/L}$ de B(a)P

Chaque concentration a été utilisée seule ou en mélange afin d'étudier les effets des coexpositions. Les niveaux de malondialdéhyde ont été mesurés dans les branchies et la glande digestive, en parallèle aux deux marqueurs de génotoxicité. Le test des comètes a été appliqué suite aux expositions dans les cellules branchiales, de glande digestive et les hémocytes. La 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine a été recherchée par chromatographie liquide haute performance, couplée à la détection électrochimique (HPLC-EC), dans les branchies et la glande digestive.

La lipoperoxydation, évaluée par les niveaux de malondialdéhyde, utilisée comme marqueur de toxicité, augmente significativement après les expositions au benzo(a)pyrène et au fer ferrique, pour toutes les modalités étudiées. Les dommages oxydatifs à l'ADN augmentent principalement dans les branchies et la glande digestive, dans le cas des expositions au B(a)P, de même que les cassures à l'ADN dans les cellules de glande digestive et les hémocytes. Aucune relation dose effet n'est clairement observée pour les deux composés. Aucune synergie toxique n'est observée dans les cas des expositions aux mélanges Fer et B(a)P. Une réduction de la lipoperoxydation et des dommages oxydatifs est même observée après certaines coexpositions. Cette diminution n'est pas toujours significative et la production de mucus chez les animaux exposés pourrait expliquer en partie cette observation.

Cette étude met en œuvre deux marqueurs de génotoxicité chez le bivalve *Unio tumidus* : les cassures à l'ADN mesurées par le test des comètes et la recherche de 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine (8-oxodGuo) par HPLC-EC. La peroxydation lipidique a été évaluée en complément. Les effets d'expositions et de coexpositions au fer ferrique et au benzo(a)pyrène ont été analysés. La glande digestive d'*Unio tumidus* est le tissu où les dommages à l'ADN les plus importants sont observés, comparativement aux branchies. Aucune synergie toxique n'est clairement observée entre le fer ferrique et le B(a)P ainsi qu'aucune relation dose effet pour chaque composé. Dans ce travail, les dommages à l'ADN, étudiés par le test des comètes n'apparaissent pas comme le paramètre le plus sensible en conditions de stress oxydant, mais son application dans une approche multimarqueur est intéressante et permettrait d'apporter une information complémentaire, notamment en ce qui concerne les différentes réponses tissulaires. Des études complémentaires sont nécessaires pour tester l'hypothèse que la production de mucus entraînerait une biodisponibilité réduite des toxiques étudiés et expliquerait la diminution de toxicité observée dans certaines coexpositions.

DNA DAMAGE (COMET ASSAY) AND 8-OXODGUO (HPLC-EC) IN RELATION TO OXIDATIVE STRESS IN THE FRESHWATER BIVALVE *UNIO TUMIDUS*⁵

LEMIERE Sébastien¹, COSSU-LEGUILLE Carole¹, CHARISSOU Anne-Marie² and VASSEUR Paule¹

¹ESE, CNRS FRE 2635, University of Metz, UFR SciFA, Av. General Delestraint, F-57070 Metz, France ;

²IRH Environnement, 11 bis rue Gabriel Peri, BP 286, F-54515 Vandoeuvre-les-Nancy ;

³INSERM U420, Faculté de médecine, 9 Av. Forêt de Haye, F-54505 Vandoeuvre-les-Nancy

Abstract : This work aims at studying the relationships between DNA damage and oxidative stress in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. Two markers of genotoxicity were measured : DNA breaks by means of the Comet assay in the digestive gland, the gills and hemocytes, and oxidative DNA lesions by means of 8-oxodGuo measured using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to electrochemical detection. Lipid peroxidation was evaluated by measuring malondialdehyde (MDA) tissue levels. Effects were studied after exposure of bivalves for 6 days to benzo(a)pyrene (B(a)P) (50 and 100 µg/L) and ferric iron (20 and 40 mg/L), applied alone or in combination.

Lipid peroxidation in the digestive gland and the gills resulted from exposure to Fe³⁺ or B(a)P whatever the concentrations tested. DNA oxidative lesions were induced in the two tissues at a much higher level after B(a)P exposure than after Fe³⁺ treatment. No significant dose-response relationship was found with the two compounds and no synergistic effect was observed between Fe³⁺ and B(a)P in each of the conditions tested.

The gills appeared less sensitive than the digestive gland to DNA oxidative lesions expressed as 8-oxodGuo. DNA breaks were registered in hemocytes and the digestive gland, but not in the gills. The measurement of DNA breaks by means of the Comet assay was not the most sensitive parameter for measuring DNA oxidative damage, but appeared complementary to 8-oxodGuo for DNA lesions.

Keywords : *Unio tumidus*, freshwater bivalve, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, Comet assay, DNA damage, malondialdehyde

INTRODUCTION

The single-cell gel electrophoresis (Comet) assay is a microelectrophoretic technique of isolated nuclei in agarose gel, first described by Singh *et al.* (1988), and now extensively used to study genotoxicity. DNA damage measured using this technique applied at pH $\geq$ 13, expresses not only direct single and double strand breaks but also alkali-labile sites and secondary damage consecutive to repair enzyme activity (Speit and Hartmann, 1995 ; Horvathova *et al.*, 1998 ; Menke *et al.*, 2001 ; Wozniak and Blasiak, 2003). Alkali-labile lesions comprised oxidative DNA damage as apurinic and apyrimidinic sites (sites AP) (Horvathova *et al.*, 1998), but 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine - a major oxidative lesion -, could not be detected with this assay. Only the use of specific repair enzyme as formamidopyrimidine glycosylase (Fpg) could allow to identify this lesion (Collins *et al.*, 1996, Wozniak et Blasiak 2003).

The 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) was considered as a relevant marker of DNA oxidative damage (Collins *et al.*, 1996). DNA molecules are important targets for radical attacks (Carr and Balz, 1999) and to date, the authors have been interested mainly to the modifications of guanine and thymine (Cadet *et al.*, 1999 ; Evans and Cooke, 2004). 8-oxodGuo measurement was the most used parameter to assess DNA oxidative damage in biomonitoring of animal and human populations. This measurement is of interest because of the biological significance of the lesion and the possible cellular consequences of oxidative damage (Collins *et al.*, 1996 ; Griffiths *et al.*, 2002). The high performance liquid chromatography (HPLC) technique coupled to electrochemical detection was shown as the most appropriate technique for the measurement of 8-oxodGuo. The introduction of desferroxamine into reagents and buffers, and the chaotropic extraction of DNA by means of sodium iodide improved the quantification of 8-oxodGuo in tissues, by reducing oxidation artifacts during sample preparations (Helbock *et al.*, 1998 ; Pouget *et al.*, 2000).

The present work aimed at studying the responses of the two markers of genotoxicity : DNA breaks measured by means of the Comet assay and 8-oxodGuo levels in order to assess DNA damage in the freshwater bivalve *Unio tumidus* after oxidative stress. The possible effects of ferric iron and benzo(a)pyrene were studied after 6 days of exposure, in the gills, the digestive gland and hemocytes.

Iron could trigger *in vivo* the production of oxygen reactive species (ROS) responsible for oxidative stress and lipid peroxidation, *via* a mechanism involving the Haber Weiss reaction catalyzed by iron complexed to organic ligands (Castilho *et al.*, 1999).

In vertebrates, B(a)P is known for its genotoxicity due to covalent binding of its active metabolites to DNA. In invertebrates, the major activation pathway produces quinones, responsible for oxidative damage through the production of reactive species, - anion semiquinone radicals and ROS -, *via* the redox quinone cycle (Michel *et al.*, 1995 ; Mitchelmore *et al.*, 1998).

The concentrations of iron and B(a)P tested were representative of polluted aquatic environments. Concentrations were chosen on the basis of quality levels scored according to the evaluation system of water quality (SEQ water) established by the French authorities (Agences de l'Eau, 2000 a). The concentration of 50 µg/L of B(a)P is the threshold differentiating medium and low grades of water quality (class 2 and 3) ; 100µg/L corresponded to a low grade of water quality (class 3).

No quality criteria has been established for iron in surface waters, but a threshold of 50 mg/L has been defined for use in irrigation and cattle watering (Agences de l'Eau, 2000 b). We chose to study the concentrations of 20 and 40 mg/L, below this threshold.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Commercial enzymes, 2'-deoxyguanosine (dG), 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, Benzo(a)pyrene (B(a)P), N-laurylsarcosinate, phenylmethyl-sulfonyl fluoride, tetradecyltrimethylammonium bromide and Triton X100 were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Alkaline phosphatase was purchased from Interchim (Montluçon, France) and the Oxytek DNA Isolation kit reference Zeptomatrix 0805001 from Gentaur Molecular Products (Brussels, Belgium). All other reagents were of analytical, chromatographic or molecular biology grade.

Animals

Bivalves, *Unio tumidus* (8-9 cm) were sampled in a control site (La Maxe, France), continuously surveyed for its small level of chemical pollutions. After collection from this

site, mussels were immediately kept in reconstituted water at controlled temperature (17° C) for three days of acclimatization.

Exposure

Groups of 5 bivalves were exposed to benzo(a)pyrene (B(a)P1 = 50 µg/L ; B(a)P2 = 100 µg/L) and/or Fe³⁺ (Fe1 = 20 mg/L Fe³⁺ ; Fe2 = 40 mg/L Fe³⁺), for 6 days in polyvinyl chloride (PVC) tanks, in the dark, in reconstituted water at 19 °C. Media were renewed each day. The vehicle solvent of B(a)P was dimethylsulfoxide (DMSO) used at a final concentration of 0.005 %. Five animals were exposed to DMSO alone at the same concentration. *Unio tumidus* were exposed to Fe³⁺ (Fe1 = 20 mg/L Fe³⁺ ; Fe2 = 40 mg/L Fe³⁺) added or not with DMSO. Mussels were fed with algae (7x10⁷ cells/L per animal per day), 1 h before the renewal of the tested medium.

At the end of the exposure period, hemocytes were collected by puncture (500 µl) into the pallial cavity with a syringe introduced through the anterior muscle. The digestive glands and the gills were dissected out and stored in liquid nitrogen (-196°C) prior to biochemical analyses. Samples of tissues for DNA damage analyses were kept in phosphate buffered saline (PBS, 0.01 M, Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ free, pH 7.4) containing 10% DMSO as cryoprotector and stored at -196°C in liquid nitrogen.

Determination of malondialdehyde levels

Malondialdehyde (MDA) levels were measured on total tissue homogenates of digestive gland and gills as a lipid peroxidation index. Sample preparations and MDA determination were performed as previously described (Doyotte *et al.*, 1997 ; Cossu *et al.*, 1997 ; Charissou *et al.*, 2004). To summarize, thawed tissues were homogenized with a manual Potter in a 50 mM phosphate buffer (pH 7.6) with 1 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoridic acid (PMSF) added as protease inhibitor and 1 mM L-serine/borate mixture as inhibitor of the γ-glutamyl transpeptidase. All the steps were carried out at 4° C. The homogenization of the digestive gland (0.5 g fresh weight) or the gills (1 g) was performed in 2 mL of phosphate buffer. The total homogenate was deproteinized for 1 h with 50 % ethanol and centrifuged for 30 min at 30 000 g. 20 µL of the supernatant were injected onto a reversed-phase LiChrospher 100 RP 18 column (Merck, Strasbourg France).

HPLC separation was performed at 25° C by means of an elution in 25 % ethanol buffer (KH₂PO₄ 30 mM, Na₂HPO₄ 30 mM, pH 6.5), containing 0.5 mM tetradecyl trimethylammonium bromide as the ion-pair reagent. The HPLC system consisted of a Merck (Strasbourg, France) model L-6000A, a UV L-4000A detector (Merck-Hitachi, Strasbourg, France) and a chromointegrator D-2500A (Merck, Strasbourg France). MDA measurements were duplicated for each tissue and each animal. The statistical differences between the control and exposed bivalves were assessed by means of the Student's *t* test. Total protein content of each fraction was determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

Determination of 8-oxodGuo

Measurements of 2'-deoxyguanosine (dG) and 8-oxodGuo were performed by means of an HPLC method adapted from Shigenaga *et al.* (1994) and as previously described (Charissou *et al.*, 2004) with the modifications recommended by Helbock *et al.* (1998) and Pouget *et al.* (2000). This method used UV detection (290 nm) for dG and electrochemical detection for 8-oxodGuo.

All the steps of the sample preparation were carried out at 4°C, under nitrogen atmosphere. Extraction of tissue DNA was conducted using the Oxytek DNA isolation kit, according to the recommendations of the manufacturer (Zeptometrix Corporation, Buffalo, USA). This kit provided a chaotropic extraction procedure of DNA, with desferrioxamine in all buffers and sodium iodide as chaotropic agent. DNA was then digested by nuclease P1 (final concentration of 64.7 µg/mL, incubation for 10 min at 65° C). pH was then adjusted to 8.5 with TRIS-HCl (1 M) and nucleotides hydrolyzed in nucleosides by alkaline phosphatase (0.2 U/µL, incubation for 1 h at 37° C). A volume of 114 µL chloroform was then added and the mixture was centrifuged at 12 000 g for 5 min. 50 µL of the supernatant were injected onto a reversed-phase C18 Supelco Supelcosil LC-18 DB column (Merck, Strasbourg France). The HPLC System was similar to the one used for MDA analyses and equipped with an UV detector L-4000A (Merck, Strasbourg, France), in line with an ESA 5100 Coulochem II detector (Eurosep Instruments, Cergy-Pontoise, France). The electrochemical detector was equipped with a conditioning cell (adjusted to 110 mV) and a 5010 analytical cell (electrodes E1 and E2 adjusted to 125 and 350 mV respectively, with a sensitivity of 50 nA). The levels of 8-oxodGuo were expressed as the number of lesions per 10⁵ dG. The statistical differences between the control and exposed bivalves were assessed by means of the Student's *t* test.

Alkaline Single-cell gel electrophoresis (Comet) assay

DNA damage was quantified in hemocytes, and cells of the digestive gland and gills, by means of the Comet assay as described by Singh *et al.* (1988) with minor modifications. Assays were performed under inactinic light at 4°C. The cellular suspensions from solid tissues (gills and digestive gland) were obtained by mechanical dissociation of 100 mg tissue in 10 mL PBS (0.01 M, pH 7.4) with 10 % DMSO added as antioxidant before treatment. Differential centrifugations were used to isolate cells from other scraps. For hemolymph, a single centrifugation allowed to concentrate samples. Slides were prepared in triplicate for each sample. 300 µL of cell suspension were added to 300 µL of 1 % low-melting point (LMP) agarose. 75 µL were transferred onto slides, covered with a coverslip and left on ice 10 min to allow agarose to solidify. The coverslip was gently removed and a second layer (75 µL of 0.5 % LMP agarose) was spread, covered and left on ice for 10 min. After the removal of the coverslips, the slides were immersed in freshly prepared cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris – pH 10 – 1 % N-laurylsarcosinate, 1 % Triton X100 and 10 % DMSO) for 2 h (1 hour only for hemocytes), in order to isolate the nuclei and eliminate the cytoplasm and membranes. Thereafter, slides were placed in an electrophoresis tanker, covered with electrophoresis buffer (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA) to allow DNA unwinding for 21 min, and then electrophoresed (300 mA, 21 min, 20 V). Slides were washed twice for 10 min in neutralizing buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) before dehydration in a batch of absolute ethanol for 10 min. Nuclear DNA was stained with 25 µL ethidium bromide (20 µg/mL) and observed under a UV light using an epifluorescence microscope (BX60 Olympus) connected to an image analysis system (Komet 3:1 Kinetic Imaging Ltd). Twenty-five to fifty cells were analyzed per slide, randomly on the central part of the gel. Slides were independently and scored blindly. The percentage of DNA in the tail was chosen to express DNA damage because of the small interexperimental and interelectrophoresis variation registered using this parameter (De Boeck *et al.*, 2000).

Averaged Tail DNA and standard deviation were calculated. As Comet data were not normally distributed, non-parametric statistical tests were used. The Kruskal-Wallis and the median tests, applied on raw data, were used to compare the different modalities. Data distributions were analyzed by means of the Chi-square test. The differences in cells of the treated bivalves as compared to controls and solvent controls were considered as significant when $p \leq 0.01$.

RESULTS

The whole results were summarized in Table 1. During the 6-day experiment, no sign of toxicity was registered in the bivalves exposed to the chemicals. Filtering capacities were maintained. Yet production of mucus was noted in bivalves exposed to each chemicals, but not in the controls.

Lipid peroxidation

Basal MDA levels averaged 3.7 ± 0.5 ng/mg protein in the digestive gland and 4.0 ± 0.4 ng/mg protein in the gills. Lipid peroxidation increased significantly in both tissues for each treatment (figure 1).

In the digestive gland, MDA concentrations were found in the range 10-12 ng/mg protein after exposure to Fe^{3+} and 9-11 ng/mg protein after exposure to B(a)P. These MDA levels corresponded to a 3 fold increase compared to controls in case of exposure to Fe^{3+} and a 2 fold increase in case of B(a)P exposure. Although the intensity of the effects seemed to increase with the chemical concentrations, the difference was not significant between the 2 concentrations of iron or B(a)P tested. No significant effect was found when both compounds were mixed compared to the effects of the chemicals alone (figure 2).

In the gills, lipid peroxidation was not so high as in the digestive gland, whatever the chemical tested. No synergistic effect resulted from the mixture of the two chemicals.

Oxidative DNA damage

The basal levels of 8-oxodGuo averaged 2.6 ± 0.5 lesions per 10^5 dG in the digestive gland and 3.1 ± 0.8 lesions per 10^5 dG in the gills. In the digestive gland, oxidative DNA damage increased significantly in bivalves exposed to B(a)P (50 and 100 $\mu\text{g/L}$) and to iron (40 mg/L) (figure 2 a).

In the gills, no effect of iron was observed, while oxidative DNA damage increased significantly after exposure to B(a)P (50 and 100 $\mu\text{g/L}$) (figure 2 b). The 8-oxodGuo levels were not enhanced with B(a)P concentration. The co-exposure to B(a)P and Fe^{3+} did not increase significantly oxidative DNA damage as compared to the effects of the single

compounds. On the other side, 8-oxodGuo levels decreased after a co-exposure to 100 µg/L B(a)P and 20 mg/L Fe³⁺.

DNA breaks

The basal percentage of Tail DNA averaged 3.6 ± 3 % in hemocytes, 4.4 ± 1.2 % in the cells of the digestive gland and 2.2 ± 0.9 % in gill cells. No significant difference was registered in the gills of control and treated mussels, although a slight increase was observed in the latter (figures 3c).

In the digestive gland, exposure to B(a)P produced significant DNA damage, but the increase was similar in all cases. Globally, DNA damage was twice higher in the digestive gland of bivalves exposed to B(a)P than in controls, whatever the B(a)P concentration tested. No effect of a co-exposure to Fe³⁺ was observed on the genotoxicity of B(a)P.

In hemocytes, (figure 3 a), B(a)P treatment, in combination or not with Fe³⁺, enhanced significantly DNA damage, whereas iron exposure did not.

DISCUSSION

This study confirmed that exposure to iron and B(a)P produced an oxidative stress in bivalves. B(a)P induced membrane oxidative damage as well as DNA damage. On the other hand, Fe³⁺-induced oxidative stress altered membranes prioritarilly, but DNA oxidative lesions were low. No synergistic effects were registered in the case of a co-exposure to both chemicals.

Whereas lipid peroxidation was high in the two tissues, the gills appeared less sensitive to DNA oxidative damage than the digestive gland. DNA breaks measured by means of the Comet assay were observed in hemocytes to a higher extent than in the digestive gland, and almost after B(a)P exposure.

The basal levels of 8-oxodGuo in control bivalves were low in the present study. Indeed, we used a chaotropic extraction of DNA which reduced the baseline, especially in the gills. Basal levels of DNA damage observed in cells of *Unio tumidus* were in the range 2-4 % DNA in the tail. They were lower than those observed in marine bivalve, *Mytilus edulis* or *Perna viridis* (Birmelin *et al.*, 1998 ; Mitchelmore *et al.*, 1998 a ; Siu *et al.*, 2004 ; Shaw *et al.*, 2004). In the literature, basal level of DNA damage expressed in term of Tail DNA percentage ranged from

2 to 25 % in different cell types of various aquatic organisms (hepatocytes, erythrocytes, hemocytes, gill cells...). The basal levels observed in tissues of *Unio* were equivalent to those observed in freshwater species, such as fish - trout, goldfish, zebrafish - or amphibians (Belpaeme *et al.*, 1998 ; Mitchelmore et Chipman, 1998 a et b ; Anitha *et al.*, 2000 ; Schnurstein et Braunbeck, 2001 ; Roy *et al.*, 2003 ; Chemeris *et al.*, 2004).

From the whole results, it appears that good correlations were found between Tail DNA (Comet assay) and 8-oxodGuo in the digestive gland and in the gills (figure 4). Correlations between lipid peroxidation and DNA damage – tail DNA or 8-oxodGuo – were also found in the digestive gland, but not in the gills. The correlation in the digestive gland is much better with B(a)P, than with Fe^{3+} (figure 4).

No synergy was registered between B(a)P and Fe^{3+} . On the opposite, the effects of the two chemicals on lipid peroxidation and oxidative DNA injuries seemed to antagonize in some circumstances, although the decreased effects were not always significant. We have no explanation to this negative interaction. Several hypothesis can be put forward : (1) a faster induction of repair mechanisms had occurred leading to reduced lesions at day 6 ; (2) a reduced bioavailability of the two chemicals, when combined, due to the production of mucus in the exposed animals. The production of mucus should have been measured in order to check this hypothesis.

DNA breaks assessed by means of the Comet assay, were often studied in parallel to other parameters in aquatic organisms, in field and lab studies. The Comet assay was generally performed to investigate genotoxicity resulting from pollutants, within multimarker approaches in association with the EROD activity study (Devaux *et al.*, 1998; Larno *et al.*, 2001; Flammarion *et al.*, 2002), measurements of the expression of cytochrome P450 1A, histopathologic observations (Akcha *et al.*, 2003, Roy *et al.*, 2003), or fluorescent biliary metabolites (Roy *et al.*, 2003 ; Brown and Steinert, 2004).

In this study, DNA breaks studied by means of the Comet assay did not appear as the most sensitive parameter in case of oxidative stress. No significant effect was observed in the gills, on the opposite to 8-oxodGuo which is a more appropriate marker for evaluating genomic oxidative injuries. The present 8-oxodGuo results were in accordance with the findings of a study carried out on *Unio tumidus* by Charissou *et al.* (2004). The duration of six days of exposure was chosen with regards to this field study. Indeed, the 8-oxodGuo levels in the

digestive gland were greater after 7 days than after a 21-day field exposure of the bivalves in a large pond with a water of medium grade quality. Charissou *et al.* (2004) noted that DNA of the freshwater *Unio tumidus* was sensitive to oxidative lesions and that 8-oxodGuo lesions appeared time-dependent, with an earlier occurrence in the digestive gland than in the gills.

The present 8-oxodGuo results can be also compared with those of Canova *et al.* (1998) who studied B(a)P contamination levels in water close to the concentrations tested here. The authors exposed *Mytilus galloprovincialis* to B(a)P (in the range 0-0.5-5-50-100-500-1000 µg/L for 0, 48 and 72 h) and registered an increase of the oxidized base but no dose-response relationship in 8-oxodGuo induction was observed. Comparisons with results of Akcha *et al.* (2000 a and b) were more difficult, because the authors used high B(a)P concentrations in food (0-50-100 mg/kg). Yet 8-oxodGuo formation had also been registered.

The hemocytes appeared very sensitive to DNA damage measured by the Comet assay. The sensivity of these cells, added to the facility of sampling and preparation, justifies the wide use of this cell type in environmental genotoxicity studies.

A number of studies measured B(a)P-induced DNA damage in bivalves during a short period of time of some hours. Only a few studies investigating effects in the long term could be compared to the present work. Siu *et al.* (2004) observed DNA damage in hemocytes after exposure of *Perna viridis* to B(a)P in the range 0-0.3-3-30 µg/L in the water for twelve days. DNA damage was significant after 3 days of exposure to 0.3 µg/L ; it peaked after 6 days of exposure to 3 and 30 µg B(a)P /L and lasted until 12 days. On the other hand, some experiments using sediment contaminated with B(a)P or polycyclic aromatic hydrocarbons for a long period of time showed negative or small DNA damage, probably due to the low bioavailability of hydrocarbons in sediment (Nacci *et al.*, 1996 ; Hamoutene *et al.*, 2002 ; Hartl *et al.*, 2004 ; Coughlan *et al.*, 2002). A B(a)P-contaminated diet which consisted in microalgae pre-incubated in 0-0.5-20 µg/L B(a)P solution, was delivered to *Mytilus edulis*, every day for 14 days ; this resulted in DNA damage observed in the digestive gland at day-3, day-7 and day-14, but no dose-effect-time increase was registered (Large *et al.*, 2002)

CONCLUSION

Two markers of genotoxicity - DNA breaks measured by means of the Comet assay, and 8-oxodGuo measured by means of HPLC coupled to electrochemical detection -, were studied to assess DNA damage in the freshwater bivalve *Unio tumidus* exposed to oxidative stress.

Exposure to ferric iron or B(a)P resulted in lipid peroxidation, in the digestive gland and the gills. B(a)P induced clear DNA oxidative damage in both tissues while genotoxicity of Fe^{3+} was much lower. The digestive gland and hemolymph were more sensitive to DNA oxidative damage than the gills. No synergistic effect was observed between ferric ion and B(a)P, but a trend to an antagonistic effects was registered..

No dose-response relationship was observed for both compounds, for any of the parameters studied. DNA breaks studied by means of the Comet assay was not the most sensitive parameter to measure genotoxic lesions induced by an oxidative stress. The measurement of 8-oxodGuo levels is more appropriate to reflect DNA oxidative damage. Therefore, the Comet assay is a complement to 8-oxodGuo measurements to assess DNA damage. Additional studies would be necessary to test the hypothesis that the production of mucus was related to a reduced bioavailability of the chemicals explaining the decreased toxicity.

REFERENCES

- Agences de l'Eau, 2000 a, Système d'évaluation de la qualité de l'eau (SEQ-EAU) – Principes Généraux - Etudes Inter Agences no.64, Agences de l'Eau et Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, Paris, 19p.
- Agences de l'Eau, 2000 b, Système d'évaluation de la qualité des eaux souterraines (SEQ-EAUX), 2000, Rapport de présentation (version 0), Agences de l'Eau et Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, Paris, 63p.
- Akcha F., Burgeot T., Leskiewicz A., Budzinski H. and Narbonne J.F., 2000 b, Induction and elimination of bulky benzo[a]pyrene-related DNA adducts and 8-oxodGuo in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed in vivo to B[a]P-contaminated feed, *Marine Ecology Progress Series*, **205**, 195-206.
- Akcha F., Hubert V. and Pfohl-Leszkowicz A., 2003, Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds, *Mutation Research*, **534**(1-2), 21-32.
- Akcha F., Ruiz S., Zamperon C., Venier P., Burgeot T., Cadet J. and Narbonne J.F., 2000 a, Benzo(a)pyrene-induced DNA damage in *Mytilus galloprovincialis*: measurement of bulky DNA adducts and DNA oxidative damage in terms of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine formation, *Biomarkers*, **5**(5), 355-361.
- Anitha B., Chandra N., Gopinath P. M. and Durairaj G., 2000, Genotoxicity evaluation of heat shock in gold fish (*Carassius auratus*), *Mutation Research*, **469**(1), 1-8.
- Belpaeme K., Cooreman K. and Kirsch-Volders M., 1998, Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish, *Mutation Research*, **415**, 167-184.
- Birmelin C., Mitchelmore C.L., Goldfarb P.S. and Livingstone D.R., 1998, Characterisation of biotransformation enzyme activities and DNA integrity in isolated cells of the digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis* L., *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A : Molecular and Integrative Physiology*, **120**(1), 51-56.
- Bradford M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Annals of Biochemistry*, **72**, 248-254.

- Brown J.S. and Steinert S.A., 2004, DNA damage and biliary PAH metabolites in flatfish from Southern California bays and harbors, and the Channel Islands, *Ecological Indicators*, **3**(4), 263-274.
- Cadet J., Delatour T., Douki T., Gasparutto D., Pouget J.P., Ravanat J.L. and Sauvaigo S., 1999, Hydroxyl radicals and DNA base damage, *Mutation Research*, **424**(1-2), 9-21.
- Canova S., Degan P., Peters L.D., Livingstone D.R., Voltan R. and Venier P., 1998, Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo(a)pyrene, *Mutation Research*, **399**, 17-30.
- Carr A. and Balz F., 1999, Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions ?, *The FASEB Journal*, **13**, 1007-1024.
- Castilho R.F., Meinicke A.R., Vercesi A.E. and Hermes-Lima M., 1999, Role of Fe(III) in Fe(II)citrate-mediated peroxidation of mitochondrial membrane lipids, *Molecular and cellular Biochemistry*, **196**, 163-168.
- Charissou A.M., Cossu-Leguille C. and Vasseur P., 2004, Relationship between two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, in the freshwater bivalve *Unio tumidus*, *Science of the Total Environment*, **322**, 109-122.
- Chemieris N.K., Gapeyev A.B., Sirota N.P., Gudkova O.Y., Kornienko N.V., Tankanag A.V., Konovalov I.V., Buzoverya M.E., Suvorov V.G. and Logunov V.A., 2004, DNA damage in frog erythrocytes after *in vitro* exposure to a high peak-power pulsed electromagnetic field, *Mutation Research*, **558**(1-2), 27-34.
- Collins A.R., Dusinska M., Gedik C.M. and Stetina R., 1996, Oxidative damage to DNA : Do we have a reliable biomarker ?, *Environmental Health Perspectives*, **104**(3), 465-469.
- Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.-C., Babut M., Exinger A. and 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, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **38**, 122-131.
- Coughlan B.M., Hartl M.G., O'Reilly S.J., Sheehan D., Morthersill C., van Pelt F.N., O'Halloran J. and O'Brien N.M., 2002, Detecting genotoxicity using the Comet assay following chronic exposure of Manila clam *Tapes semidecussatus* to polluted estuarine sediments, *Marine Pollution Bulletin*, **44**(12), 1359-1365.
- De Boeck M., Touil N., De Visscher G., Aka Vande P. and Kirsch-Volders M., 2000, Validation and implementation of an internal standard in Comet assay analysis, *Mutation Research*, **469**(2), 181-197.
- Devaux A., Flammarion P., Bernardon V., Garric J. and Monod G., 1998, Monitoring of the chemical pollution of the river Rhône through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A Induction in Chub (*Leuciscus cephalus*), *Marine Environmental Research*, **46**(1-5), 257-262.
- Doyotte A., Cossu C., Jacquin M.-C., Babut M. and 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*, *Aquatic Toxicology*, **39**, 93-110.
- Evans M.D. and Cooke M.S., 2004, Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids, *Bioessays*, **26**(5), 533-542.
- Flammarion P., Devaux A., Nehls S., Migeon B., Noury P. and Garric J., 2002, Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France), *Ecotoxicology And Environmental Safety*, **51**(2), 145-153.
- Griffiths H.R., Møller L., Bartosz G., Bast A., Bertoni-Freddari C., Collins A., Cooke M., Coolen S., Haenen G., Hoberg A.M. et al., 2002, Biomarkers, *Molecular Aspects of Medicine*, **23**(1-3), 101-208.
- Hamoutene D., Payne J.F., Rahimtula a. and Lee K., 2002, Use of the Comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons, *Marine Environmental Research*, **54**(3-5), 471-474.

- Hartl M.G., Coughlan B.M., Sheehan D., Mothersill C., van Pelt F.N., O'Reilly S.J., Heffron J.J., O'Halloran J. and O'Brien N.M., 2004, Implications of seasonal priming and reproductive activity on the interpretation of Comet assay data derived from the clam, *Tapes semidecussatus* Reeves 1864, exposed to contaminated sediments, *Marine Environmental Research*, **57**(4), 295-310.
- Helbock H.J., Beckman K.B., Shigenaga M.K., Walter P.B., Woodall A.A., Yeo H.C., Ames B.N., 1998, DNA Oxidation Matters : The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 288-293.
- Horvathova E., Slamenova D., Hlicikova L., Mandal T.K., Gabelova A. and Collins A.R., 1998, The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay, *Mutation Research*, **409**, 163-171.
- Large T., Shaw J.P., Peters L.D., McIntosh A.D., Webster L., Mally A. and Chipman J.K., 2002, Different levels of mussel (*Mytilus edulis*) DNA strand breaks following chronic field and acute laboratory exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Marine Environmental Research*, **54**(3-5), 493-497.
- Larno V., Laroche J., Launey S., Flammarion P. and Devaux A., 2001, Responses of chub (*Leuciscus cephalus*) populations to chemical stress, assessed by genetic markers, DNA damage and cytochrome P4501A induction, *Ecotoxicology*, **10**(3), 145-158.
- Menke M., Chen I.P., Angelis K.J. and Schubert I., 2001, DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins, *Mutation Research*, **493**(1-2), 87-93.
- Michel X.R., Beasse J.F. and Narbonne J.F., 1995, *In vivo* metabolism of benzo(a)pyrene in the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **28**(2), 215-222.
- Mitchelmore C.L. and Chipman J.K., 1998 a, DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring, *Mutation Research*, **399**, 135-147.
- Mitchelmore C.L., Birmelin C., Chipman J.K. and Livingstone D.R., 1998, Evidence for cytochrome P-450 catalysis and free radical involvement in the production of DNA strand breaks by benzo[a]pyrene and nitroaromatics in mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells, *Aquatic Toxicology*, **41**(3), 193-212.
- Mitchelmore L. and Chipman J. K., 1998 b, Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay, *Aquatic Toxicology*, **4**(1-2), 161-182.
- Nacci D.E., Cayuala S. and Jackim E., 1996, Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay, *Aquatic toxicology*, **35**, 197-210.
- Pouget J.P., Douki T., Richard M.J. and Cadet J., 2000, DNA damage induced in cells by gamma and UVA radiation as measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and Comet assay, *Chemical Research in Toxicology*, **13**, 541-549.
- Roy L.A., Armstrong J.L., Sakamoto K., Steinert S., Perkins E., Lomax D.P., Johnson, L.L. and Schlenk D., 2003, The relationships of biochemical endpoints to histopathology and population metrics in feral flatfish species collected near the municipal wastewater outfall of Orange County, California, USA, *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, **22**(6), 1309-1317.
- Schnurstein A. and Braunbeck T., 2001, Tail Moment versus Tail Length-Application of an *in vitro* version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from Zebrafish (*Danio rerio*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **49**, 187-196.
- Shaw J. P., Large A.T., Donkin P., Evans S.V., Staff F.J., Livingstone D.R., Chipman J.K. and Peters L.D., 2004, Seasonal variation in cytochrome P450 immunopositive protein levels, lipid peroxidation and genetic toxicity in digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*, *Aquatic Toxicology*, **67**(4), 325-336.

Shigenaga MK., Aboujaoude E.N., Chen Q., and Ames B.N., 1994, Assays of oxidative damage biomarkers 8-OHdG and 8-oxoguanine in nuclear DNA and biological fluids by HPLC with ED, *Methods in Enzymology*, **234**, 16-33.

Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. and Schneider E.L., 1988, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, **175**, 184-191.

Siu W.H. L., Cao J., Jack R.W., Wu R.S.S., Richardson B.J., Xu L. and Lam P.K.S., 2004, Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*), *Aquatic Toxicology*, **66**(4), 381-392.

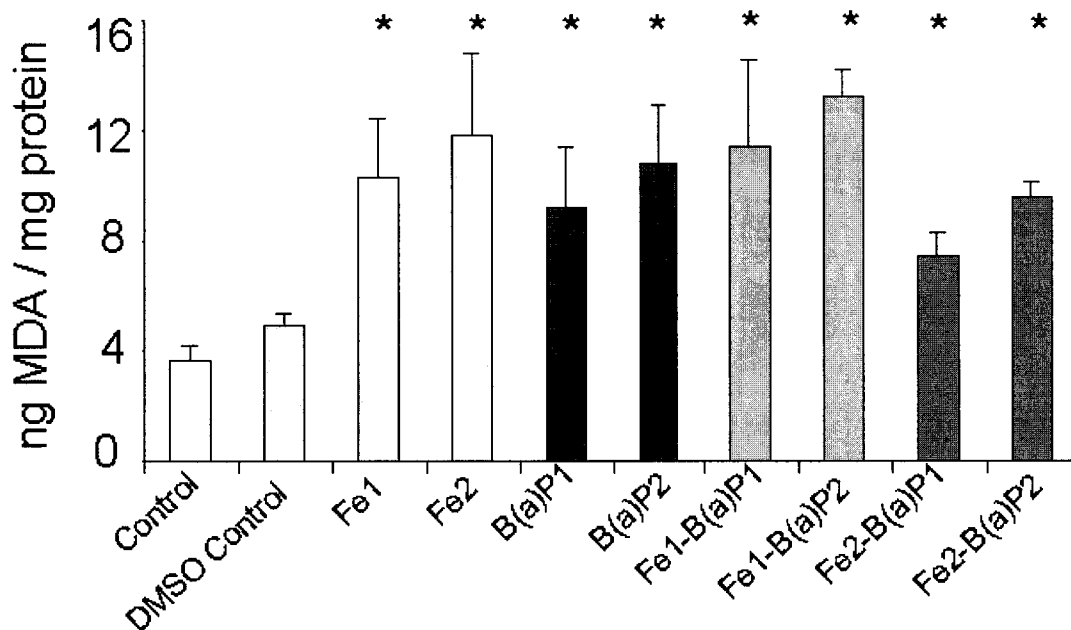
Speit G. and Hartmann A., 1995, The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay), *Mutagenesis*, **10**(6), 555-559.

Wozniak K. and Blasiak J., 2003, In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA-protein cross-links, *Mutation Research*, **535**(2), 127-139.

	Control	Vehicle solvent Control (DMSO)	Fe1	Fe1 -DMSO	Fe2	Fe2 -DMSO	B(a)P1	B(a)P2	Fe1 -B(a)P1	Fe1 -B(a)P2	Fe2 -B(a)P1	Fe2 -B(a)P2	
<u>Lipid peroxidation index (MDA)</u>													
<u>Digestive gland</u>													
Mean (ng MDA per mg of protein)	3.7	4.0	10.2 *	-	11.8 *	-	9.1 *	10.8 *	11.4 *	13.2 *	7.3 *	9.5 *	
S.E.M.	0.5	0.4	2.2	-	3.0	-	2.3	2.1	3.1	1.0	0.9	0.6	
<u>Gills</u>													
Mean (ng MDA per mg of protein)	4.0	4.3	9.3 *	-	8.3 *	-	7.1 *	6.5 *	5.5 *	5.8 *	7.3 *	8.7 *	
S.E.M.	0.3	0.6	2.4	-	1.3	-	0.8	0.8	1.0	0.9	2.0	2.2	
<u>oxidative DNA damage (8-oxodGuo)</u>													
<u>Digestive gland</u>													
Averaged number of lesions for 10 ⁵ dG	2.6	2.4	3.4	3.3	4.5 *	4.5 *	7.6 *	7.8 *	7.6 * [§]	7.1 * [§]	7.2 * [§]	6.3 * ^{§§}	
S.E.M.	0.5	0.9	1.1	1.1	1.0	0.5	1.0	1.3	1.3	1.4	1.1	0.4	
<u>Gills</u>													
Averaged number of lesions for 10 ⁵ dG	3.1	3.71	4.1	4.5	4.8	4.2	7.18 *	5.92 *	7.96 * [§]	4.79 [§]	7.80 * [§]	7.72 * ^{§§}	
S.E.M.	0.8	1.4	1.0	1.2	0.7	1.0	1.1	1.0	0.9	0.4	1.2	0.8	
<u>DNA damage (comet assay)</u>													
<u>Hemocytes</u>													
Averaged Tail DNA (%)	3.6	4.0	7.4	9.0	7.7	9.4	11.6 *	10.3 *	6.4 [§]	9.6*	10.4 *	7.8	
S.E.M.	3.0	3.0	3.8	2.4	3.0	1.6	3.0	3.0	2.6	2.7	3.8	2.7	
<u>Digestive gland cells</u>													
Averaged Tail DNA (%)	4.4	5.3	6.5	7.3	7.1	7.9	9.6 *	10.2 *	10.3 * [§]	10.4 * [§]	9.9 *	11.0 * [§]	
S.E.M.	1.2	0.9	2.0	3.2	1.5	1.2	2.9	2.9	1.5	2.0	1.8	3.8	
<u>Gill cells</u>													
Averaged Tail DNA (%)	2.2	2.0	4.0	3.0	4.0	2.4	6.4	6.5	6.3	5.5	5.7	5.9	
S.E.M.	0.9	0.5	1.0	1.4	1.0	0.7	0.9	1.9	1.6	0.7	1.7	1.3	

Table 1 : Lipid peroxydation index, oxidative DNA damage and DNA breaks, in the digestive gland, in the gills and in the hemocytes of *Unio tumidus* exposed to benzo(a)pyrene (B(a)P1 =50 µg/L ; B(a)P2 =100 µg/L) and/or ferric iron (Fe1 = 20 mg/L Fe³⁺ ; Fe2 :40 mg/L Fe³⁺) during 6 days (* significant difference with respective control (p = 0.05) ; § significant difference between animals treated with a mixture (Fe³⁺+ benzo(a)pyrene) and same treatment without benzo(a)pyrene (Fe³⁺ alone) (p = 0.05) ; \$ significant difference between animals treated with a mixture (Fe³⁺+ benzo(a)pyrene) and same treatment without Fe³⁺ (benzo(a)pyrene alone) (p = 0.05) ; DMSO : dimethylsulfoxide ; dG : 2'-deoxyguanosine ; MDA : Malondialdehyde)

(a) Digestive gland



(b) Gills

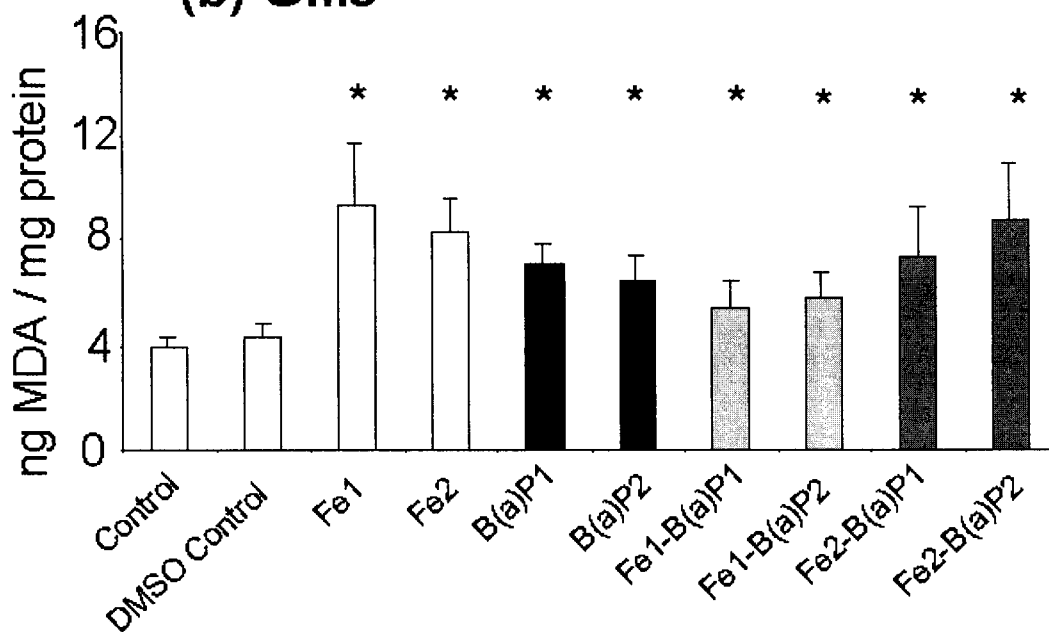


Figure 1 : Malondialdehyde (MDA) as lipid peroxidation index in the digestive gland (a) and the gills (b) of *Unio tumidus* exposed to benzo(a)pyrene (B(a)P1 = 50 $\mu\text{g/L}$; B(a)P2 = 100 $\mu\text{g/L}$) and/or ferric iron (Fe1 = 20 mg/L Fe^{3+} ; Fe2 = 40 mg/L Fe^{3+}) during 6 days (5 animals per treatment ; * significant difference with respective control ($p < 0.05$) ; DMSO : dimethylsulfoxide)

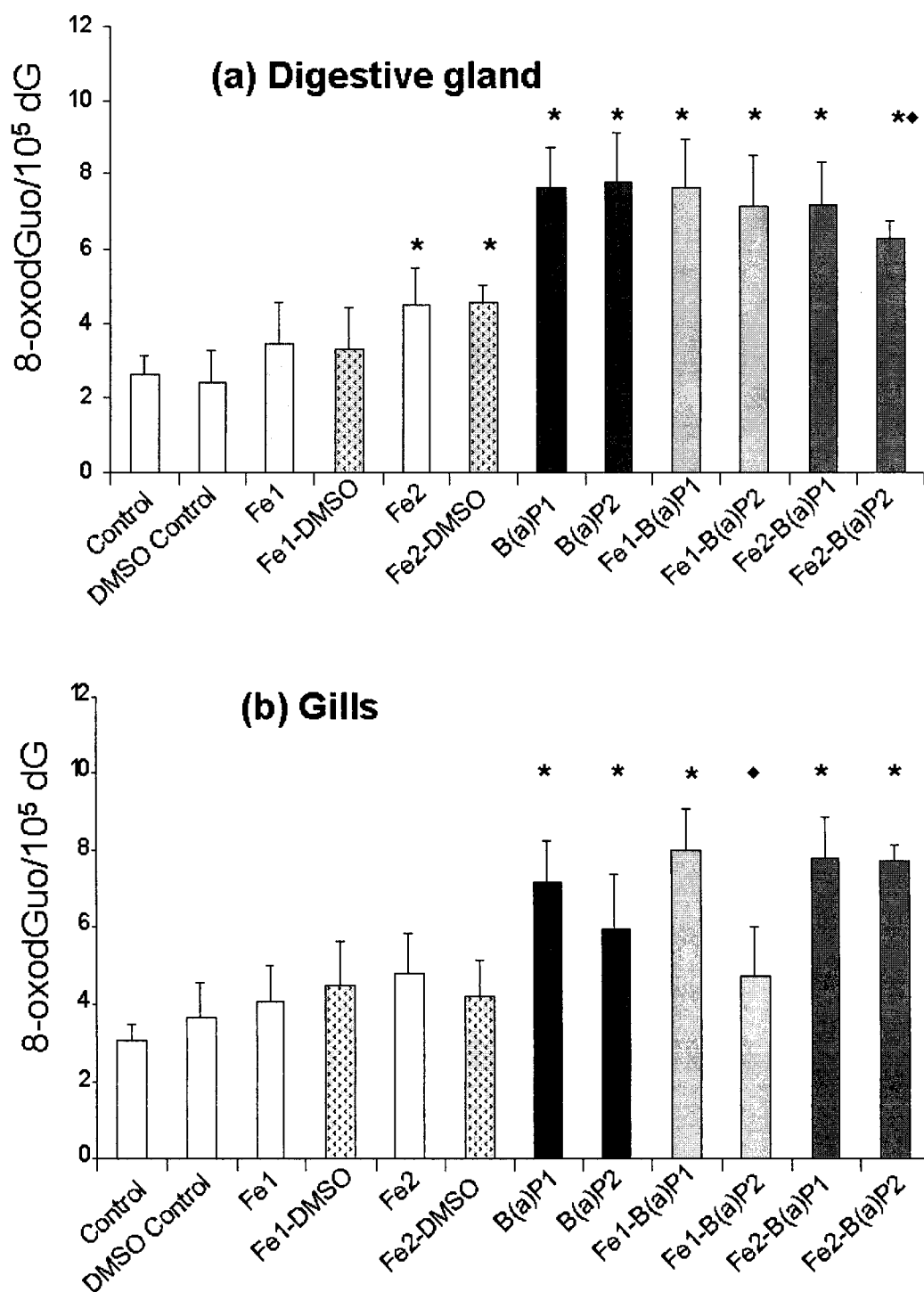


Figure 2 : 8-oxodGuo levels in the digestive gland (a) and the gills (b) of *Unio tumidus* exposed to benzo(a)pyrene (B(a)P1 = 50 µg/L ; B(a)P2 = 100 µg/L) and/or ferric iron (Fe1 = 20 mg/L Fe³⁺ ; Fe2 = 40 mg/L Fe³⁺) during 6 days (5 animals per treatment ; * significant difference with respective control (p < 0.05) ; ♦ significant decrease compared to B(a)P alone, applied at the same concentration (p < 0.05) ; 8-oxodGuo : 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine ; DMSO : dimethylsulfoxide)

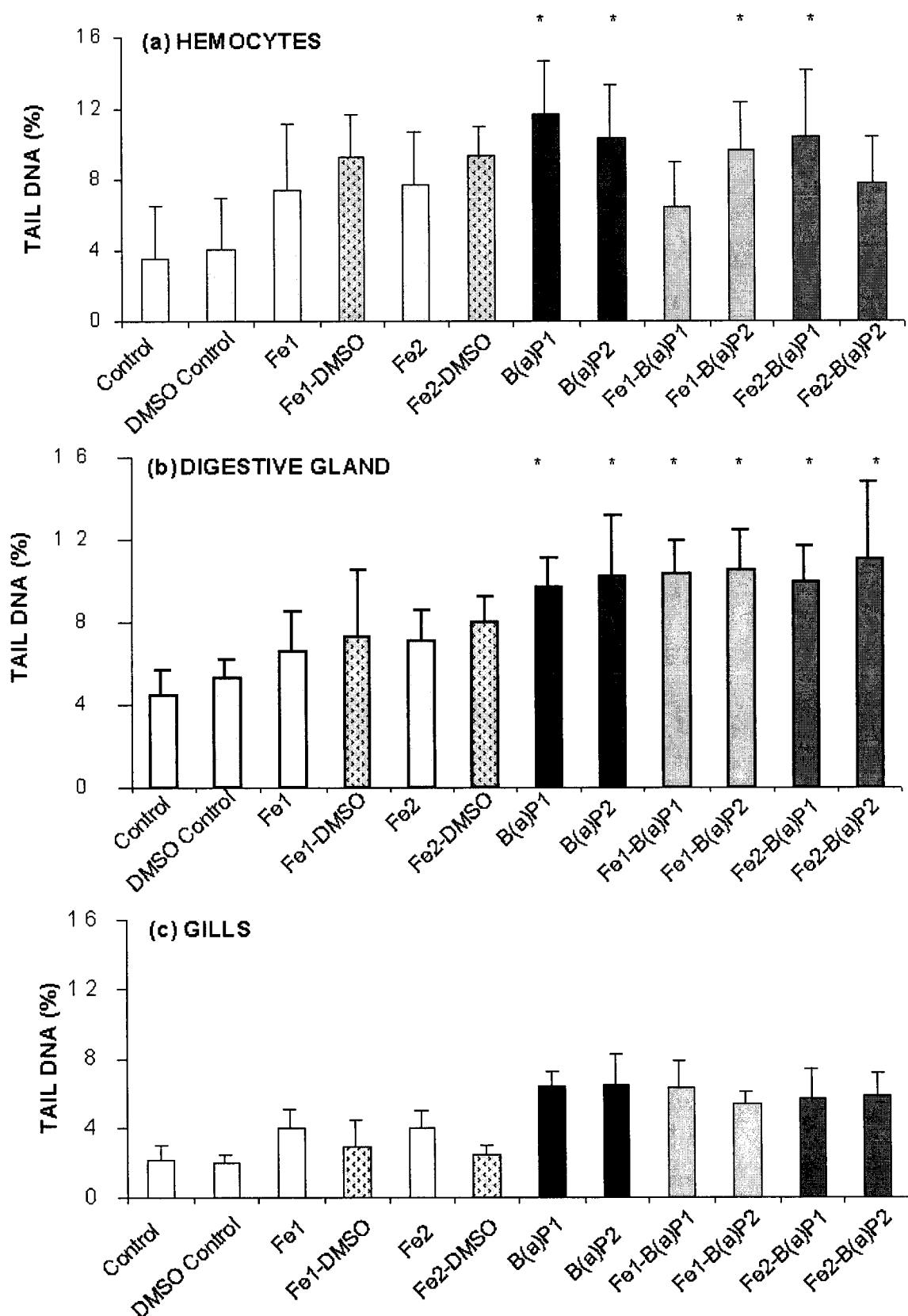


Figure 3 : DNA breaks (averaged Tail DNA (%) $\pm$ S.E.M.) in the three cell populations : (a) hemocytes, (b) digestive gland and (c) gills of *Unio tumidus* exposed to benzo(a)pyrene (B(a)P1 =50 μ g/L ; B(a)P2 =100 μ g/L) and/or ferric iron (Fe1 = 20 mg/L Fe³⁺ ; Fe2 = 40 mg/L Fe³⁺) during 6 days (* significant difference with respective control (p $\leq$ 0.05) ; DMSO : dimethylsulfoxide)

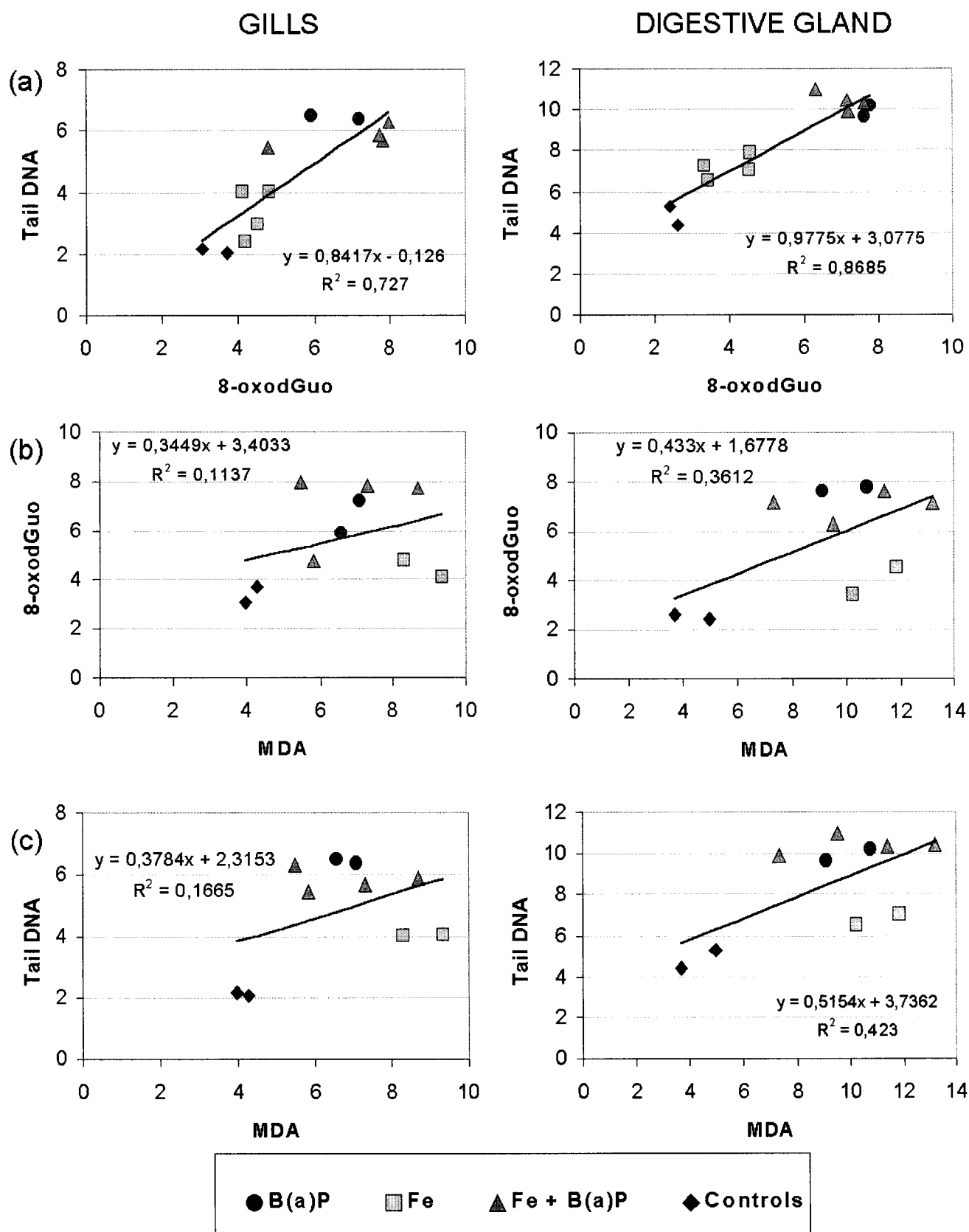


Figure 4 : Relationships between the responses of the three parameters -DNA breaks (Tail DNA), oxidative DNA damage (8-oxodGuo) and lipid peroxidation (MDA)- in the digestive gland and the gills of *Unio tumidus* after 6 days of exposure to benzo(a)pyrene (B(a)P : ● ; 0,50 and 100 µg/L) and ferric iron (Fe : ■ ; 0, 20 and 40 mg/L Fe³⁺) or to the mixtures of both compounds (Fe + B(a)P : ▲)

DISCUSSION

L'objectif général de ce travail était l'étude de l'intérêt du test des comètes en génotoxicité environnementale. Pour cela, notre étude s'est découpée en deux volets distincts que nous discuterons successivement, après quelques considérations d'ordre méthodologique. Dans une première partie, nous avons étudié les dommages à l'ADN chez des mammifères contaminés par la voie alimentaire. La nourriture contaminée consistait en des échantillons environnementaux, des moules, *Mytilus edulis*, échantillonnées sur des sites impactés par la marée noire de l'Erika. Dans le second volet, le test des comètes a été mis en œuvre chez un invertébré d'eau douce, *Unio tumidus*, suite à des expositions directes *in vivo*. De nombreux biomarqueurs ont été développés chez ce bivalve et nous avons souhaité étudier les complémentarités de cet essai, dans une approche multimarqueur, en vue d'applications ultérieures sur le terrain, en conditions environnementales.

Le protocole du test des comètes dans ces différents travaux, que nous avons choisi d'appliquer est sa version alcaline car nous souhaitons une évaluation globale de la génotoxicité. La conduite des étapes de déroulement de l'ADN et d'électrophorèse à pH 13,1 permet la détection d'une majorité de dommages à l'ADN. En utilisant des protocoles modifiés du test des comètes, la nature des dommages que nous avons observés dans les différentes études pourrait être approchée.

L'obtention des suspensions cellulaires est réalisée par un protocole de dissociation non enzymatique des tissus solides. Cette technique limite les dommages artefactuels à l'ADN lors de la préparation des échantillons. Il a été rapporté que l'utilisation d'enzymes comme la trypsine pour l'obtention des suspensions cellulaires pouvaient provoquer des dommages supplémentaires à l'ADN (Birmelin *et al.*, 1998). Notre protocole a été développé précédemment au laboratoire chez *Unio tumidus* et avait permis d'obtenir des suspensions cellulaires dont les taux de viabilité étaient supérieurs à 97 % (Lemière, 2000). Les conditions de conservation des tissus avaient également été optimisées.

L'application de ces protocoles aux tissus de rat a permis d'obtenir des suspensions cellulaires satisfaisantes avec une viabilité des cellules équivalentes. Dans les étapes de développement, l'influence de la nourriture témoin a également été étudiée. Deux types de croquettes et un régime constitué de pain et de salade ont été administrés pendant une semaine à des rats et aucune différence n'a été observée entre les différents individus. Nous avons donc choisi comme nourriture standard, les croquettes UAR (Epinay sur Orge, France).

Lors des différents tests, les lames ont été codées et lues indépendamment dans la partie centrale du gel sans connaissance de la valeur du code et nous avons utilisé un témoin d'électrophorèse pour nous assurer que les électrophorèses réalisées pour le traitement des nombreux échantillons étaient équivalentes et pouvoir valider nos résultats. Ce témoin consiste en une suspension du type cellulaire considéré, exposée au peroxyde d'hydrogène, aliquotée et analysée dans chaque test. Le traitement des échantillons a été réalisé aléatoirement.

Aucune cytotoxicité importante, consécutive aux différentes expositions n'a été observée dans les cellules de mammifères et de bivalves. Les différents taux de viabilité sont équivalents et s'échelonnent entre 92 et 100 %. Ils sont légèrement plus faibles dans les cellules de moelle osseuse, tissu qui subit le traitement le plus long pour l'obtention des cellules (entre 87 et 98 %). Cette absence de cytotoxicité est confirmée sur les lames par la rareté des observations de comètes très fragmentées (pourcentage d'ADN dans la queue > 80 %) qui sont parfois qualifiées dans la littérature de cellules fantômes (Hartmann *et al.*, 2003).

Dans nos études, les dommages à l'ADN ont été exprimés en terme de pourcentage à l'ADN dans la queue des comètes. Plusieurs raisons expliquent ce choix. C'est un paramètre qui permet la comparaison des niveaux de dommages entre différents types cellulaires (la quantité d'ADN peut varier entre les types cellulaires et les organismes) et avec les travaux publiés dans la littérature. Il est également de plus en plus utilisé et il présente une faible variation inter expérimentale et inter électrophorèse (De Boeck *et al.*, 2000). Enfin, l'utilisation d'un paramètre secondaire comme le *Tail Moment*, (produit du pourcentage d'ADN dans la queue par la distance de migration de l'ADN), peut entraîner une perte d'informations (Tice *et al.*, 2000). L'analyse statistique des distributions des cellules dans des classes de dommages présente l'avantage de mettre en évidence des différences dans les populations cellulaires, alors qu'une approche plus globale sur la moyenne ou la médiane s'est révélée moins discriminante, notamment dans l'étude sur la réversibilité. Tice *et al.* (2000) dans leurs recommandations sur le test des comètes, considèrent d'ailleurs cette approche comme intéressante, voire plus informative.

Les niveaux de base de dommages à l'ADN (entre 4 et 8 % d'ADN dans la queue) que nous observons dans les tissus étudiés sont similaires à ceux rapportées dans d'autres études exprimant les dommages par le pourcentage d'ADN dans la queue des comètes, avec les cellules de colon, les hépatocytes et les cellules pulmonaires de rat (Dybdahl *et al.*, 2003, Moller *et al.*, 2002, Müller *et al.*, 2004). Les niveaux de base observés chez *Unio tumidus* sont

du même ordre de grandeur (soit autour de 4 % d'ADN dans la queue des comètes). Ils sont plus bas que ceux observés chez des bivalves marins comme *Mytilus edulis* ou *Perna viridis* (Birmelin *et al.*, 1998 ; Mitchelmore *et al.*, 1998 a ; Siu *et al.*, 2004 ; Shaw *et al.*, 2004). Dans la littérature, les niveaux de base chez les organismes aquatiques varient entre 2 et 25 % d'ADN dans la queue des comètes pour les différents types cellulaires étudiés (hépatocytes, érythrocytes, hémocytes, cellules branchiales....). Les niveaux relevés chez *Unio* sont similaires à ceux observés dans des cellules de poissons : truite, turbot, poisson rouge, poisson-zèbre (Belpaeme *et al.*, 1998 ; Mitchelmore et Chipman, 1998 a et b ; Anitha *et al.*, 2000 ; Schnurstein et Braunbeck, 2001 ; Roy *et al.*, 2003) ou chez le xénope (Chemeris *et al.*, 2004). On peut expliquer ces niveaux très bas de dommages endogènes par la non contamination des sédiments de l'étang d'origine des *Unio*. En milieu naturel cet organisme vit en eau stagnante, enfoui dans le sédiment et n'est pas soumis comme les bivalves marins au brassage constant du milieu et des polluants éventuellement présents. L'utilisation du diméthylsulfoxyde comme cryoprotecteur lors de la congélation des tissus, et comme antioxydant dans l'étape de dissociation des tissus peut également contribuer aux niveaux de base faibles observés.

Les résultats des études sur le transfert, par la voie alimentaire des polluants de marée noire montrent l'apparition de dommages à l'ADN, principalement dans le foie, chez des rats nourris par des moules fortement contaminées suite à une marée noire. Des effets de plus faible intensité sont observés au niveau de la moelle osseuse et aucun dommage à l'ADN n'est jamais observé au niveau des leucocytes. Notre schéma expérimental était basé sur une consommation régulière de nourriture contaminée sur quinze et trente jours. Aucune augmentation des dommages n'est observée entre les deux durées d'exposition alors que l'apport de nourriture contaminée était doublé sur la période d'un mois dans la première étude. Dans la seconde étude, avec des apports quotidiens de moules contaminées, une légère augmentation des dommages a été observée entre les deux durées d'exposition.

Par ces études, les dommages à l'ADN mesurés par le test des comètes apparaissent comme un paramètre sensible pour évaluer la biodisponibilité et la génotoxicité des polluants alimentaires. L'étude complémentaire sur la réversibilité de la génotoxicité confirment les résultats des deux premières études. Elle souligne que ces effets sont transitoires et que la réparation est complète en deux semaines après la fin de l'exposition.

Notre objectif était d'approcher les effets à long terme de l'ingestion régulière de nourriture contaminée. Peu d'études sur des durées longues existent dans la littérature. Les

principales applications du test des comètes correspondent à des études aiguës, avec des doses uniques, où la génotoxicité est étudiée dans les quelques heures et au maximum dans les premiers jours suivant l'exposition. Nous avons choisi d'analyser les dommages à l'ADN, trois jours après la fin de l'exposition. Ce délai se justifiait, à nos yeux, car les maxima de dommages sont généralement observés dans les 24-48 heures qui suivent les expositions à des doses fortes et uniques. Le test des comètes donne une image instantanée de la génotoxicité dans la population cellulaire. Ce cliché résulte de l'équilibre entre la génération des dommages à l'ADN et la réparation, qui elle-même, génère des cassures à l'ADN observables par le test des comètes (mécanismes de réparation par excision-resynthèse ; Speit et Hartmann, 1995). Cet équilibre ne se déplace en faveur de la réparation que dans les 48-72 h dans le cas des expositions orales en aiguës (Dana Devi *et al.*, 2000, 2001, 2004 ; Grover *et al.*, 2001) et dans le cas d'une exposition chronique, nous pouvions supposer qu'ils intervenaient plus tardivement et qu'à 72 heures, nous nous situerions à un équilibre entre la réparation et la création des dommages. Un déclenchement rapide de la réparation est généralement observé *in vitro* et *in vivo* aux doses fortes. Et le délai pour le retour vers le niveau de base des dommages à l'ADN dans la population cellulaire, est généralement dépendant du type cellulaire étudié, de la durée d'exposition, du pas de temps utilisé dans l'étude, de l'agent génotoxique considéré et des niveaux de dommages observés (Dana Devi *et al.*, 2000, 2001, 2004 ; Grover *et al.*, 2001 ; Anderson *et al.*, 1996, Pandrangi *et al.*, 1995 ; Ralph *et al.*, 1996; Rajaguru *et al.*, 2001 ; Taddei *et al.*, 2001; Aoyama *et al.*, 2003 ; Hook et Lee, 2004 ; Russo *et al.*, 2004). *In vivo*, dans le cas d'une exposition régulière et répétée, l'intervention des systèmes de réparation pouvait être retardée par rapport à l'exposition compte tenu de la toxicocinétique du polluant, de l'activation métabolique éventuellement nécessaire, de la distribution dans les organes cibles et des effets toxiques cellulaires possibles.

Les comparaisons restent difficiles avec les travaux de la littérature, car les paramètres étudiés et les conditions expérimentales diffèrent. Rares sont les travaux qui ont étudié les dommages à l'ADN suite à l'exposition à des mélanges complexes de HAPs chez le rat. Les travaux de Fouchécourt *et al.* (1999) se basaient sur des expositions de rats à des sols contaminés par les HAPs pendant trois jours et les concentrations étudiées étaient comprises entre 100 et 700 mg de HAPs par kg de sol (matière sèche). La voie d'exposition majoritaire était l'inhalation et l'ingestion représentait une voie secondaire. De plus la génotoxicité avait été évaluée par la quantification des adduits à l'ADN. D'autres études relatives à l'ingestion de sols contaminés par les HAPs provenant de sites industriels ont montré des inductions des

activités enzymatiques des cytochromes P450 dans différents tissus de mammifères (foie, rein, poumon et rate de rats et de cochons), mais la génotoxicité n'a pas été étudiée (Roos, 2002 ; Roos *et al.*, 2002). La comparaison avec deux études avec de la nourriture contaminée par des particules de fumée de diesel (DEP) (Dybdahl *et al.*, 2003 ; Müller *et al.*, 2004) est plus intéressante, car ces travaux présentent des similarités avec notre travail. La durée des expositions est longue (études sur 21 jours), l'apport de nourriture quotidien et les polluants présents dans la nourriture sont des HAPs et des dérivés des HAPs. Les niveaux de contaminations finales (sommés des HAPs et des HAPs nitrosés recherchés) étaient très faibles soit de 71,9 ng/kg à 28,7 µg /kg de poids corporel quotidiennement dans la nourriture et des dommages à l'ADN ont été mis en évidence dans les cellules pulmonaires et les cellules du colon dès le premier niveau de contamination de la nourriture. Les dommages observés dans le foie sont plus modérés et n'apparaissent qu'aux plus forts niveaux de contamination de la nourriture : 2,87 et 28,7 µg (somme des HAPs totaux) par kg de poids corporel. Pour comparaison et même si les profils de contamination sont différents, les niveaux étudiés dans notre deuxième étude étaient compris entre 50 ng/kg et 1,55 µg/kg d'équivalents toxiques en B(a)P (soit de 0,55 à 7,35 µg de HAPs par kg de poids corporel). Il aurait été intéressant d'inclure les cellules du colon dans notre travail, car ce tissu apparaît sensible aux effets génotoxiques des polluants par la voie alimentaire.

Les différences dans les dommages à l'ADN entre les deux premières études avec expositions alimentaires sur des périodes longues peuvent être expliquées par les profils de contamination des moules différents et la fréquence quotidienne des apports dans la deuxième étude. Les ordres de grandeur des TEQs sont entre 2 et 15 µg/kg (matière sèche) dans la première étude alors qu'ils sont compris entre 6 et 180 µg de B(a)P par kg dans les deux suivantes. De plus, les concentrations en dérivés des HAPs se situent autour de 200 µg/kg dans les moules de la seconde expérience alors qu'elles atteignent des niveaux supérieurs à 2000 µg/kg dans les moules les plus contaminées de la première étude. Les résultats observés chez le rat avec les moules qui présentent une forte contamination par des dérivés substitués et des thiophènes soulignent que la génotoxicité pourrait résulter des HAPs présents et dosés dans les moules mais également d'autres polluants de la marée noire. La fraction des 16 HAPs classiquement analysés représentent 0,3 % (en poids) des fiouls lourds relargués dans le milieu marin lors du naufrage de l'Erika et plus de 190 HAPs et dérivés ont pu être identifiés dans ce fioul (Tronczynski *et al.*, 2002). Aucun facteur d'équivalent toxique n'a été défini pour la plupart de ces composés et il reste difficile de les prendre en considération dans les évaluations des risques. L'approche par les TEQs apparaît insuffisante pour décrire la

contamination des moules dans nos études. Le Comité Scientifique Européen de l'Alimentation (SCF, 2002) avait déjà souligné les limites de cette approche. C'est pourquoi, nous avons choisi d'inclure à l'analyse des 16 HAPs de l'US-EPA dans la nourriture, la quantification de HAPs méthylés et des benzothiophènes. Ces composés pourraient contribuer aux dommages à l'ADN observés dans la première étude, même si les potentialités toxiques de ces composés sont mal connues. Dans une revue récente sur les fumées de bitumes, Binet *et al.* (2002), soulignent le caractère suspecté cancérigène des thiophènes et recommandent leur analyse et leur prise en compte dans les évaluations de risques. Sinsheimer (1992) leur attribue un potentiel mutagène proche de celui du B(a)P et des anomalies néoplasiques ont été observées chez des rats ayant reçu pendant treize semaines, un régime alimentaire contaminé par ces composés (de 0,5 à 500 ppm) (Poon *et al.*, 1998). Les autres polluants que nous avons choisis d'inclure dans l'analyse chimique de la nourriture sont des représentants des HAPs méthylés. Dans une étude théorique, Boroski (1999) avait souligné qu'une méthylation pouvait augmenter la génotoxicité du composé parent. Ainsi le chrysène est classé par l'IARC en classe 3 alors que le 5-méthylchrysène est classifié en classe 2B. Enfin, les métabolites des HAPs dans les moules n'ont pas été recherchés et certains pourrait se révéler génotoxiques.

Nos résultats posent la question du potentiel prédictif, en terme de cancérogénicité, du test des comètes, dans des expositions chroniques. Des conclusions d'applications *in vivo*, avec des doses uniques et importantes d'agents cancérigènes, confirment les potentialités cancérigènes des composés étudiés (Miyamae *et al.*, 1997 ; Sasaki *et al.*, 1997 a et b, 2002 ; Henderson *et al.*, 1998 ; Sekihashi *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2003). Mais cet outil pourrait-il se révéler prédictif dans des conditions d'expositions chroniques ?

Dans les études de Müller *et al.* (2004) et de Dybdahl *et al.* (2003) sur les particules de fumée de diesel (DEP) avec les rats transgéniques Big Blue, les dommages à l'ADN n'étaient pas associés avec une augmentation de la fréquence des mutations chez les animaux dans les différents organes étudiés. La comparaison de nos résultats avec les études de cancérogenèse par voie orale avec le benzo(a)pyrène abonde dans ce sens (Kliesch *et al.*, 1982 ; Rigdon et Neal, 1966 ; Culp *et al.*, 1998 ; Brune *et al.*, 1981).

On se situe plus dans une étude de danger que dans une étude du risque. L'étude de la réversibilité des dommages, consécutifs à l'ingestion des moules, complète cette évaluation. Notre objectif était d'approcher par cette expérimentation les conséquences éventuelles sur le long-terme. Nous avons choisi d'appliquer un pas de temps d'une semaine entre les observations. Une étude fine de la cinétique de l'apparition et de la réparation des dommages après la dernière ingestion d'un repas de moules contaminées, aurait pu paraître préférable.

Il est cependant rassurant d'observer une réparation complète dans le foie en deux semaines. Dans la moelle osseuse, la situation est plus critique. Ce tissu se multiplie rapidement et la probabilité que les dommages se transforment en mutations est plus grande. La probabilité de dommages irréversibles à l'information génétique dans ce tissu pourrait être plus importante, d'autant plus que dans la première étude qui incluait la recherche de micronoyaux, une faible augmentation de leur fréquence avait été observée. Des observations histopathologiques pourraient nous informer sur l'éventuelle apparition de néoplasies dans ce tissu. L'absence de dommages à l'ADN dans les leucocytes du sang circulant pourrait s'expliquer par le temps de demi-vie court de ces cellules. Ainsi, la durée de vie moyenne des globules blancs humains varie de quelques heures à 200 jours mais la moyenne se situe entre 4 à 5 jours (Bernard *et al.*, 1990).

L'absence de risques inhérents à la consommation de fruits de mer contaminés ne peut être affirmée au vu des résultats enregistrés. En ne considérant que les seize HAPs, le seuil de 500 µg/kg fixé par l'AFSSA ne semble pas approprié. Certes la réparation des dommages observés est complète avec des moules contaminées par 570 µg/kg (soit 82 µg/kg d'équivalents toxiques en B(a)P), un niveau proche, mais seulement au bout de deux semaines. La valeur de 30 µg/kg d'équivalents toxiques en B(a)P (soit 230 µg/kg, somme des 16 HAPs dans la matière sèche) dans les moules pourrait être proposée car aucun dommage à l'ADN n'est observé à des taux inférieurs dans les cellules de moelle osseuse. Des compléments d'études, avec des niveaux de contamination de la nourriture compris entre 6 et 31 µg/kg (équivalents toxiques en B(a)P dans la matière sèche) seraient nécessaires pour définir ce seuil sans effet toxique pour les mammifères. Pour une meilleure protection des consommateurs, il faudrait également étudier la génotoxicité des HAPs substitués et des dérivés thiophènes, dont les potentialités toxiques sont mal connues et il apparaît nécessaire de les prendre en compte dans la définition d'un seuil.

Globalement, ces résultats soulignent l'intérêt du test des comètes pour l'étude de la génotoxicité environnementale. Dans le cas de ces expositions alimentaires, le test des comètes se révèle un outil intéressant pour l'évaluation du danger génotoxique d'échantillons de l'environnement. La biodisponibilité des polluants de marée noire dans les moules a pu être mise en évidence mais la prédictibilité de ce test en terme de cancérogénicité apparaît limitée.

L'application du test des comètes, dans une approche multimarqueur, suite aux expositions au fer ferrique et au benzo(a)pyrène *in vivo* d'*Unio tumidus*, dans la seconde partie

de ce travail, montre des résultats intéressants et souligne l'intérêt de ce type d'approche en écotoxicologie. De telles approches sont courantes avec le test des comètes, en milieu aquatique (Milowska *et al.*, 2003 ; Klobucar *et al.*, 2003 ; Devaux *et al.*, 1998 ; Larno *et al.*, 2001 ; Flammarion *et al.*, 2002 ; Akcha *et al.*, 2003 ; Roy *et al.*, 2003 b ; Brown et Steinert, 2004). Cela traduit l'intérêt de la mise en œuvre de l'approche multimarqueur et la complémentarité de chaque paramètre étudié.

Le test des comètes n'apparaît pas dans le cas de ces expositions, en conditions de stress oxydant, comme le paramètre le plus sensible et les dommages à l'ADN mesurés dans les cellules semblent consister majoritairement en des modifications de base que le test des comètes met difficilement en évidence. L'application de versions modifiées avec utilisation d'enzymes de réparation pourrait permettre d'évaluer ces dommages oxydatifs, en complément de la mesure de la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine par HPLC-EC qui reste une technique onéreuse, notamment dans l'achat des réactifs. Les réponses observées dans cette étude sont principalement consécutives à la toxicité du benzo(a)pyrène et aucun effet de synergie avec le fer ferrique n'a pu être mis en évidence. Des compléments d'études sont nécessaires pour évaluer les réponses suite aux co-expositions et les possibles effets d'antagonismes entre les deux composés dans les mélanges. La diminution des dommages oxydatifs et de la lipoperoxydation, observée pourrait être liée à une production accrue de mucus par les animaux exposés.

Lors d'études de terrain ultérieures, il apparaît nécessaire de mettre en œuvre ce marqueur de génotoxicité en compléments d'autres marqueurs, afin de disposer d'une évaluation globale du risque environnemental. Les relations entre les résultats du test des comètes et la recherche de la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine ont été étudiées au laboratoire, en conditions contrôlées. Une application *in situ* de ces deux paramètres pourrait permettre des observations différentes. L'application de la recherche de micronoyaux chez *Unio tumidus*, au laboratoire et en milieu naturel, en parallèle à l'étude de ces deux marqueurs serait un complément intéressant.

CONCLUSION

L'objectif général de ce travail était l'étude de l'intérêt du test des comètes en génotoxicité environnementale. Pour cela, il s'est découpé en deux volets distincts. Nous avons étudié, au moyen de cet essai, les dommages à l'ADN, chez des mammifères contaminés par la voie alimentaire dans un premier temps, puis chez un invertébré d'eau douce, *Unio tumidus*, suite à des expositions *in vivo*, en conditions contrôlées au laboratoire.

Les études avec les mammifères montrent l'apparition de dommages à l'ADN, principalement dans le foie, chez des rats nourris par des moules fortement contaminées suite à une marée noire et permet d'établir le transfert des polluants présents dans les moules vers le consommateur. Elles soulignent l'utilité du test des comètes, en tant qu'outil de surveillance de la réponse biologique consécutive au transfert alimentaire des HAPs. Les effets sont observés dans les hépatocytes et à un degré moindre dans les cellules de moelle osseuse. Aucun dommage à l'ADN n'est jamais observé au niveau des leucocytes. Les résultats de l'étude complémentaire sur la réversibilité montrent que les dommages à l'ADN observés sont transitoires, avec une réparation complète en deux semaines dans tous les cas.

Le test des comètes apparaît comme un outil privilégié pour étudier la biodisponibilité de composés génotoxiques dans la nourriture et dans des échantillons environnementaux mais sa prédictivité, en terme de cancérogénicité semble limitée dans le cas d'expositions chroniques. L'absence de risques inhérents à la consommation de fruits de mer contaminés ne peut être affirmée et des compléments d'études sont nécessaires pour définir les niveaux de contamination sans effet pour les mammifères. L'étude de la nature de dommages à l'ADN pourrait être envisagée chez le rat en utilisant des versions modifiées du test des comètes. Dans un premier temps, nous pourrions envisager de conduire le test à différents pH (à pH = 9,0 ; à pH = 12,1 et au pH de 13,1), ce qui permettrait la détection différentielle des cassures simple- et double-brin et des sites alcali labiles. L'utilisation d'enzymes de réparation, comme l'endonucléase III et la formamidopyrimidine glycosylase pourrait permettre une meilleure mise en évidence des dommages oxydatifs à l'ADN.

Dans le cas des expositions *in vivo* d'*Unio tumidus*, les dommages à l'ADN, mesurés par le test des comètes n'apparaissent pas comme le paramètre le plus sensible, mais leur étude, au sein d'une approche multiparamétrique pourrait se révéler intéressante *in situ*. Cette partie mettait en œuvre deux marqueurs de génotoxicité chez ce bivalve dulçaquicole : les cassures à l'ADN mesurées par le test des comètes et la recherche de la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine (8-oxodGuo) par HPLC-EC. Les réponses observées étaient principalement

consécutives à la toxicité du benzo(a)pyrène et aucun effet de synergie avec le fer ferrique n'a pu être mis en évidence. Des compléments d'études sont nécessaires pour évaluer les réponses des bivalves suite aux co-expositions et étudier la production de mucus associée. L'utilisation d'enzymes de réparation spécifiques pourrait permettre d'augmenter la sensibilité du test des comètes chez *Unio tumidus*, notamment en conditions de stress oxydant. L'étude fondamentale des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN chez ce bivalve serait également intéressante au même titre que la comparaison en terme de susceptibilité aux dommages génotoxiques avec d'autres espèces de bivalves et différents animaux aquatiques. La mise en œuvre *in situ* et *in vivo* au laboratoire, de la recherche de micronoyaux chez *Unio tumidus*, en complément du test des comètes et de la mesure de la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine permettrait de disposer d'une évaluation complète et intégrée de la génotoxicité chez cet invertébré benthique.

Références

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd-Allah G.A., El-Fayoumi R.I., Smith M.J. , Heckmann R.A. et O'Neill K.L., 1999, A comparative evaluation of aflatoxin B₁ genotoxicity in fish models using the Comet assay, *Mutation Research*, **446**, 181-188.
- Abdi S. et Ali A., 1999, Role of ROS modified human DNA in the pathogenesis and etiology of cancer, *Cancer Letters*, **142**(1), 1-9.
- Accomando R., Viarengo A., Moore M.N. et Marchi B., 1999, Effects of ageing on nuclear DNA integrity and metabolism in mussel cells (*Mytilus edulis* L.), *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **31**(3-4), 443-450.
- Adams J.D.Jr., Mei-Ling C. et Mei L. K., 2001, Parkinson's Disease – Redox Mechanisms, *Current Medicinal Chemistry*, **8**(7), 809-814.
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), 20 janvier 2003, Avis de l'Agence relatif à l'évaluation des risques sanitaires qui pourraient résulter de la contamination des produits de la mer destinés à la consommation humaine, suite au naufrage du pétrolier Prestige, Maisons-Alfort, France, 10 p.
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), 5 février 2000, Avis du groupe d'experts réunis par l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur les critères de toxicité alimentaire présentés par la pollution engendrée par le naufrage de l'ERIKA, Maisons-Alfort, France, 7 p.
- Ahnström G. et Edwardsson K.A., 1974, Letter: Radiation-induced single-strand breaks in DNA determined by rate of alkaline strand separation and hydroxylapatite chromatography: an alternative to velocity sedimentation, *International Journal Of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, **26**(5), 493-497.
- Ahnström G., 1988, Techniques to measure DNA single-strand breaks in cells: A review, *International Journal of Radiation Biology*, **54** (5), 695-707.
- Akcha F., Hubert V. et Pfhof-Leszkowicz A., 2003, Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds, *Mutation Research*, **534**(1-2), 21-32.
- Akcha F., Burgeot T., Leszkowicz A., Budzinski H. et Narbonne J.F. , 2000 b, Induction and elimination of bulky benzo[a]pyrene-related DNA adducts and 8-oxodGuo in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed *in vivo* to B[a]P-contaminated feed, *Marine Ecology Progress Series*, **205**, 195-206.
- Akcha F., Ruiz S., Zamperon C., Venier P., Burgeot T., Cadet J. et Narbonne J.F., 2000 a, Benzo(a)pyrene-induced DNA damage in *Mytilus galloprovincialis*: measurement of bulky DNA adducts and DNA oxidative damage in terms of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine formation, *Biomarkers*, **5**(5), 355-361.
- Aloisio Torres M., Pires Testa C., Gaspari C., Masutti M.B., Neves Panitz C.M., Curi--Pedrosa R., De Almeida E.A., Di Mascio P. et Fihlo D.W., 2002, Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil, *Marine Pollution Bulletin*, **44**, 923-932.

- Ames B.N., 1988, Measuring oxidative damage in humans : relation to cancer and ageing, *IARC Scientific Publications*, **89**, 407-416.
- Amiard J.C., 1994, Surveillance de la qualité des milieux aquatiques par les biomarqueurs, *IREPOLIA, la Chronique*, **9**, 2.
- Anderson D., Dhawan A., Yu T.W. et Plewa M.J., 1996, An investigation of bone marrow and testicular cells *in vivo* using the comet assay, *Mutation Research*, **370**(3-4), 159-174.
- Anderson D., Schmid T.E., Baumgartner A., Cemeli-Carratala E., Brinkworth M.H. et Wood J.M., 2003, Oestrogenic compounds and oxidative stress (in human sperm and lymphocytes in the Comet assay), *Mutation Research*, **544**(2-3), 173-178.
- Anderson D., Yu T.W. et McGregor, 1998, Comet assay responses as indicator of carcinogen exposure, *Mutagenesis*, **13**, 539-555.
- Anitha B., Chandra N., Gopinath P. M. et Durairaj G., 2000, Genotoxicity evaluation of heat shock in gold fish (*Carassius auratus*), *Mutation Research*, **469**(1), 1-8.
- Aoyama K., Iwahori K. et Miyata N., 2003, Application of *Euglena gracilis* cells to comet assay: evaluation of DNA damage and repair, *Mutation Research*, **538**(1-2), 155-162.
- Aquilina G., 1994, Endogenous DNA damage and spontaneous mutagenesis in cultured mammalian cells, *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanita*, **30**(2), 157-181.
- 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.
- Aso M., Kondo M., Suemune H. et Hecht S.M., 1999, Chemistry of the Bleomycin-Induced Alkali-Labile DNA Lesion, *Journal of the American Chemistry Society*, **121**(39), 9023-9033.
- Association Française de Normalisation (AFNOR), 1980, Qualité de l'eau - Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec *Scenedesmus subspicatus* et *Selenastrum capricornutum*, Norme T 90-304, AFNOR Ed, Paris, France, 12 p.
- Atamna H., Cheung I. et Ames B.N., 2000, A method for detecting abasic sites in living cells: Age-dependent changes in base excision repair, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**(2): 686-691.
- Atienzar F.A., Cheung V.V., Jha A.N. et Depledge M.H., 2001, Fitness parameters and DNA effects are sensitive indicators of copper-induced toxicity in *Daphnia magna*, *Toxicological Sciences*, **59**(2), 241-250.
- Avery E.L., Dunstan R.H. et Nell J.A., 1996, The detection of pollutant impact in marine environments : condition index, oxidative DNA damage, and their associations with metal bioaccumulation in the sidney rock oyster *Saccostrea commercialis*, *Archives Of Environmental Contamination and Toxicology*, **31**, 192-198.
- Avishai N., Rabinowitz C., Moiseeva E. et Rinkevich B., 2002, Genotoxicity of the Kishon River, Israel : the application of an *in vitro* cellular assay, *Mutation Research*, **518**(1), 21-37.
- Azevedo L., Gomes J.C., Stringheta P.C., Gontijo A. M. M.C., Padovani C.R., Ribeiro L. R. et Salvadori D.M.F., 2003, Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice, *Food And Chemical Toxicology*, **41**(12), 1671-1676.

- Barlienè J. et Lovejoy D., 2000, Peculiarities of environmental genotoxicity in Klaipeda port area, *International Review in Hydrobiology*, **85**(5-6), 663-672.
- Batel R., Jaksic Z., Bihari N., Hamer B., Fafandel M., Chauvin C., Schröder H.C., Müller W.E. et Zahn R.K., 1999, A microplate assay for DNA damage determination (*fast micromethod*), *Analytical Biochemistry*, **270**(2), 195-200.
- Belfiore N.M. et Anderson S.L., 2001, Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review, *Mutation Research*, **489**(2-3), 97-122.
- Belpaeme K., Cooreman K. et Kirsch-Volders M., 1998, Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish, *Mutation Research*, **415**, 167-184.
- Belpaeme K., Delbecke K., Zhu J.L. et Kirsch-Volders M., 1996, Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay, *Mutagenesis*, **11**(5), 485-492.
- Benhamou S. et Sarasin A., 2000, Variability in nucleotide excision repair and cancer risk : a review, *Mutation Research*, **462**, 149-158.
- Bergqvist M., Brattström D., Stalberg M., Vaghef H., Brodin O. et Hellman B., 1998, Evaluation of radiation-induced DNA damage and DNA repair in human lung cancer cell lines with different radiosensitivity using alkaline and neutral single cell gel electrophoresis, *Cancer Letters*, **133**(1), 9-18.
- Bernard J., Lévy J.P., Varet B., Clauvel J.P., Rain J.Y. et Sultan Y., 1990, Hématologie, septième édition, revue et corrigée, collection "Abrégés", Masson, Milan, 346p.
- Berwick M. et Vineis P., 2000, Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in Humans : an epidemiologic review, *Journal of the National Cancer Institute*, **92**(11), 874-897.
- Betti C. et Nigro M., 1996, The Comet assay for the evaluation of the genetic hazard of pollutants in Ceataceans : preliminary results on the genotoxic effects of methyl-mercury on the bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*) lymphocytes *in vitro*, *Marine Pollution Bulletin*, **32** (7), 545-548.
- Bihari N., Batel R., Jaksic Z., Müller W.E., Waldmann P. et Zahn R.K., 2002, Comparison between the Comet Assay and Fast Micromethod® for Measuring DNA Damage in HeLa Cells, *Croatica Chemica Acta*, **75**(3), 793-804.
- Binet S., Pfohl-Leszkowicz A., Brandt H., Lafontaine M. et Castegnaro M., 2002, Bitumen fumes: review of work on the potential risk to workers and the present knowledge on its origin, *Science of the Total Environment*, **300**(1-3), 37-49.
- Birmelin C., Mitchelmore C.L., Goldfarb P.S. et Livingstone D.R., 1998, Characterisation of biotransformation enzyme activities and DNA integrity in isolated cells of the digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis* L., *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A : Molecular and Integrative Physiology*, **120**(1), 51-56.
- Birnboim H.C. et Jevcak J.J., 1981, Fluorometric method for rapid detection of DNA strand breaks in human white blood cells produced by low doses of radiation, *Cancer Research*, **41**(5), 1889-1892.
- Black M.C., Ferrell J.R., Honning R.C. et Martin L.K., 1996, DNA strand breakage in freshwater mussel (*Anodonta grandis*) exposed to lead in the laboratory and field, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **15**(5), 802-808.

- Bock C., Dittmar H., Gemeinhardt H., Bauer E. et Greulich K.O., 1998, Comet assay detects cold repair of UV-A damages in a human B-lymphoblast cell line, *Mutation Research*, **408**(2), 111-120.
- Boller K. et Schmid W., 1970, Chemische mutagenese beim Saâger. Das Knochenmark des chinesischen Hamsters als *in vivo* Testsystem, *Human Genetik*, **11**, 35-54.
- Bolognesi C., Landini E., Roggieri P., Fabbri R. et Viarengo A., 1999, Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies, *Environmental And Molecular Mutagenesis*, **33**(4), 287-292.
- Bolognesi C., Rabboni R. et Roggieri P., 1996, Genotoxicity biomarkers in *M. galloprovincialis* as indicators of marine pollutants, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **113C**(2), 319-323.
- Bombail V., Aw D., Gordon E. et Batty J., 2001, Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland, *Chemosphere*, **44**(3), 383-392.
- Borosky G.L., 1999, Theoretical study related to the carcinogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives, *Journal of Organic Chemistry*, **64**, 7738-7744.
- Bouziane M., Miao F., Ye N., Holmquist G., Chyzak G. et O'Connor T.R., 1998, Repair of DNA alkylation damage, *Acta Biochimica Polonica*, **45** (1), 191-202.
- Breimer L.H. et Lindahl T., 1985, Thymine lesions produced by ionizing radiation in double-stranded DNA, *Biochemistry*, **24**(15), 4018-4022.
- Brown J.S. et Steinert S.A., 2004, DNA damage and biliary PAH metabolites in flatfish from Southern California bays and harbors, and the Channel Islands, *Ecological Indicators*, **3**(4), 263-274.
- Brune H., Deutsch-Wenzel R.P., Habs M., Ivankovic S. et Schmahl D., 1981, Investigation of the tumorigenic response to benzo(a)pyrene in aqueous caffeine solution applied orally to Sprague-Dawley rats, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **102**(2), 153-157.
- Brunetti R., Gabriele M., Valerio P. et Fumagalli O., 1992, The micronucleus test : temporal pattern of baseline frequency in *Mytilus galloprovincialis*, *Marine Ecology Progress Series*, **83**, 75-78.
- Brunetti R., Majone F., Gola I. et Beltrame C., 1998, The micronucleus test : examples of application to marine ecology, *Marine Ecology Progress Series*, **44**, 65-68.
- Burgeot T., Woll S. et Galgani F., 1996, Evaluation of the micronucleus test on *Mytilus galloprovincialis* for monitoring applications along french coasts, *Marine Pollution Bulletin*, **32**(1), 39-46.
- Burgi E. et Hershey A.D., 1963, Sedimentation rate as a measure of molecular weight of DNA, *Biophysical Journal*, **3**, 309-321.
- Buschini A.M., Carboni P., Martino A., Poli P. et Rossi C., 2003, Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*, *Mutation Research*, **537**(1), 81-92.
- Buschini A.M., Martino A., Gustavino B., Monfrinotti M., Poli P., Rossi C., Santoro M., Dörr A.J.M. et Rizzoni M., 2004, Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization, *Mutation Research*, **557**(2), Pages 119-129.

- Bustos-Obregon E. et Goicochea R.I., 2002, Pesticide soil contamination mainly affects earthworm male reproductive parameters, *Asian Journal Of Andrology*, **4**(3), 195-199.
- Cadet J., Delatour T., Douki T., Gasparutto D., Pouget J.P., Ravanat J.L. et Sauvaigo S., 1999, Hydroxyl radicals and DNA base damage, *Mutation Research*, **424**(1-2), 9-21.
- Cadet J., D'Ham C., Douki T., Pouget J.P., Ravanat J.L. et Sauvaigo S., 1998, Facts and artefacts in the measurement of oxidative base damage to DNA, *Free Radical Research*, **29**, 541-550.
- Canova S., Degan P., Peters L.D., Livingstone D.R., Voltan R. et Venier P., 1998, Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo(a)pyrene, *Mutation Research*, **399**, 17-30.
- Carr A. et Balz F., 1999, Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions ?, *The FASEB Journal*, **13**, 1007-1024.
- Carvalho Pinto-Silva C.R., Ferreira J.F., Costa R.H.R., Belli Filho P., Creppy E.E. and Matias W.G., 2003, Micronucleus induction in mussels exposed to okadaic acid, *Toxicon*, **41**(1), 93-97.
- Chamberland K., Lindroth B.A. et Whitaker B., 2002, Genotoxicity in Androscoggin River smallmouth bass, *Northeastern Naturalist Steuben*, **9**(2), 203-213.
- Charissou A.M., 2002, Etude des dommages oxydatifs chez *Unio tumidus* pour le biomonitoring des eaux douces et des relations entre la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine et le malondialdéhyde, Thèse de Doctorat en Toxicologie de l'Environnement, Ecotoxicité et Santé Environnementale, Université de Metz, 106 p.
- Charissou A.M., Cossu-Leguille C. et Vasseur P., 2004, Relationship between two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, in the freshwater bivalve *Unio tumidus*, *Science of the Total Environment*, **322**, 109-122.
- Chaty S., 2003, Effets d'inducteurs-types sur l'expression du cytochrome P450 chez les bivalves après exposition directe et chez les mammifères contaminés par la voie alimentaire, Thèse de Doctorat en Toxicologie de l'Environnement, Ecotoxicité et Santé Environnementale, Université de Metz, 96p.
- Chemeris N.K., Gapeyev A.B., Sirota N.P., Gudkova O.Y., Kornienko N.V., Tankanag A.V., Konovalov I.V., Buzoverya M.E., Suvorov V.G. et Logunov V.A., 2004, DNA damage in frog erythrocytes after *in vitro* exposure to a high peak-power pulsed electromagnetic field, *Mutation Research*, **558**(1-2), 27-34.
- Chen S.K., Hsieh W.A., Tsai M.H., Chen C.C., Hong A.I., Wei Y.H. et Chang W.P., 2003, Age-associated decrease of oxidative repair enzymes, human 8-oxoguanine DNA glycosylases (hOgg1), in human aging, *Journal of Radiation Research*, **44**(1), 31-35.
- 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, *Journal of biology and Chemistry*, **267**(1), 166-172.
- Chiu S.W., Wang Z.M., Leung T.M. et Moore D., 2000, Nutritional value of *Ganoderma* extract and assessment of its genotoxicity and anti-genotoxicity using comet assay of mouse lymphocytes, *Food and Chemical Toxicology*, **38**, 173-178.
- Choucroun P., Gillet D., Dorange G., Sawicki B. et Dewitte J.D., 2001, Comet assay and early apoptosis, *Mutation Research*, **478**(1-2), 89-96.

- Christmann M., Tomicic M.J., Roos W.P. et Kaina B., 2003, Mechanisms of human DNA repair: an update, *Toxicology*, **193**(1-2), 3-34.
- Clements C., Ralph S. et Petras M., 1997, Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **29**, 277-288.
- Colleu-Durel S., Guitton N., Nourgalieva K., Legue F., Lévêque J., Danic B. et Chenal C., 2004, Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay): a simple technique to show genomic instability in sporadic breast cancer, *European Journal of Cancer*, **40**(3), 445-451.
- Collins A.R., Ai-guo M. et Duthie S.J., 1995, The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells, *Mutation Research*, **336**(1), 69-77.
- Collins A.R., Cadet J., Möller L., Poulsen H.E. et Viña J., 2004, Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells?, *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, **423**(1), 57-65.
- Collins A.R., Dobson V.L., Dusinska M., Kennedy G. et Stetina R., 1997, The comet assay : what can it really tell us ?, *Mutation Research*, **375**, 183-193.
- Collins A.R., Dusinska M., Gedik C.M. et Stetina R., 1996, Oxidative damage to DNA : Do we have a reliable biomarker ?, *Environmental Health Perspectives*, **104**(3), 465-469.
- Cook P.R. et Brazell I.A., 1978, Spectrofluorometric measurement of the binding of ethidium to superhelical DNA from cell nuclei, *European Journal Of Biochemistry / FEBS*, **84**(2), 465-477.
- Cooke M.S., Mistry N., Ladapo A., Herbert K.E. et Lunec J., 2000, Immunochemical quantitation of UV-induced oxidative and dimeric DNA damage to human keratinocytes, *Free Radical Research*, **33**(4), 369-381.
- Cortés E., González C., Betancourt M. et Ortiz R., 2001, Assessment of DNA damage in spleen, bone marrow, and peripheral blood from malnourished rats by single cell gel electrophoresis assay, *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, **21**(3), 231-247.
- Cossu C., 1996, Activités de systèmes antioxydants chez *Unio tumidus*, bivalve dulçaquicole en conditions physiologiques et de stress chimique, Thèse de Doctorat en Toxicologie de l'Environnement, Centre des Sciences de l'Environnement, Université de Metz, 99p.
- Cossu C., Doyotte A., Babut M., Exinger A. et Vasseur P., 2000, Antioxidant biomarkers in freshwater bivalve, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **45**, 106-121.
- Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.-C., Babut M., Exinger A. et Vasseur P., 1997 b, Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **38**, 122-131.
- Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.-C. et Vasseur P., 1997 a, Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques, Chapitre 8, 149-163, In *Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux*, Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., Ramade F. (Eds), collection "Recherche en Biologie", Masson, Paris.

- Cotelle S. et Ferard J.F., 1999, Comet assay in genetic ecotoxicology : A Review, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **34**, 246-255.
- Coughlan B.M., Hartl M.G., O'Reilly S.J., Sheehan D., Morthersill C., van Pelt F.N., O'Halloran J. et O'Brien N.M., 2002, Detecting genotoxicity using the Comet assay following chronic exposure of Manila clam *Tapes semidecussatus* to polluted estuarine sediments, *Marine Pollution Bulletin*, **44**(12), 1359-1365.
- Countryman P. I. et Heddle J.A., 1976, The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes, *Mutation Research*, **41**(2-3), 321-331.
- Culp S.J., Gaylor D.W., Sheldon W.G., Goldstein L.S. et Beland F.A., 1998, A comparison of the tumours induced by coal tar and benzo[a]pyrene in a 2-year bioassay, *Carcinogenesis*, **19**, 117-124.
- Currie L.M., Livesey S.A., Harper J.R. et Connor J., 1998, Cryopreservation of single-donor platelets with a reduced dimethyl sulfoxide concentration by the addition of second-messenger effectors: enhanced retention of *in vitro* functional activity, *Transfusion*, **38**(2), 160-167.
- Da Silva J., De Freitas T.R.O., Heuser V., Marinho J.R. et Erdtmann B., 2000 a, Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by comet assay and micronucleus Test, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **35**, 270-278.
- Da Silva J., De Freitas T.R.O., Heuser V., Marinho J.R., Speit G. et Erdtmann B., 2000 b, An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for enviromental biomonitoring with native rodents, *Genetics and Molecular Biology*, **23**(1), 241-245.
- Dana Devi K., Rozati R., Saleha Banu B. et Grover P., 2004, *In vivo* genotoxic effect of nickel chloride in mice leukocytes using comet assay, *Food And Chemical Toxicology*, **42**(5), 751-757.
- Dana Devi K., Rozati R., Saleha Banu B., Jamil K. et Grover P., 2001, *In vivo* genotoxic effect of potassium dichromate in mice leukocytes using comet assay, *Food and Chemical Toxicology*, **39**(8), 859-865.
- Dana Devi K., Saleha Banu B., Grover P. et Jamil K., 2000, Genotoxic effect of lead nitrate on mice using SCGE (comet assay), *Toxicology*, **145**(2-3), 195-201.
- Davidson P., Freifelder D. et Holloway B.W., 1964, Interruptions in the polynucleotide strands in bacteriophage DNA, *Journal of Molecular Biology*, **8**, 1-10.
- de Almeida E.A., Bainay A.C.D., Loureiro A.P.M., Meideros M.G.H. et Di Mascio P., 2003 b, DNA and lipid damage in the brown mussel *Perna perna* from a contaminated site, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **71**, 270-275.
- de Almeida E.A., de Almeida Marquez S., Klitze C.F., Bainy A.C.D., Meideros M.H.G., Di Mascio P. et Loureirvo A.P.M., 2003 a, DNA Damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **135**, 295-303.
- De Boeck M., Touil N., De Visscher G., Aka Vande P. et Kirsch-Volders M., 2000, Validation and implementation of an internal standard in Comet assay analysis, *Mutation Research*, **469**(2), 181-197.
- De Boeck M. et Kirsch-Volders M., 1997, *Nereis virens* (Annelida Polychaeta) is not an adequate sentinel species to assess the genotoxic risk (Comet assay) of PAH exposure to the environment, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **30**, 82-90.

- de Kok T.M.C.M., Moonen H.J.J., van Delft J. et van Schooten F.J., 2002, Methodologies for bulky DNA adduct analysis and biomonitoring of environmental and occupational exposures, *Journal of Chromatography B*, **778**(1-2), 345-355.
- de Miranda Cabral Gontijo A.M., Barreto R.E., Speit G., Valenzuela Reyes V.A., Volpato G.L. et Favero Salvadori D.M., 2003, Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results, *Mutation Research*, **534**(1-2), 165-172.
- de Souza-Pinto N.C., Eide L., Hogue B.A., Thybo T., Stevnsner T., Seeberg E., Klungland A. et Bohr V.A., 2001, Repair of 8-oxodeoxyguanosine lesions in mitochondrial DNA depends on the oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) gene and 8-oxoguanine accumulates in the mitochondrial DNA of OGG1-defective mice, *Cancer Research*, **61**, 5378-5381.
- Degan P., Shigenaga M.K., Park E.M. et Dragsted L.O., 1991, Immunoaffinity isolation of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 8-hydroxyguanine and quantitation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by polyclonal antibodies, *Carcinogenesis*, **12**, 865-871.
- Deneke S.M. et Fanburg B.L., 1989, Regulation of cellular glutathione, *American Journal of Physiology*, **257**, L163-L173.
- Depledge M.H., 1998, The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates, *Mutation Research*, **399**(1), 109-122.
- Devasagayam T.P.A., Steenken 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.
- Devaux A., Flammarion P., Bernardon V., Garric J. et Monod G., 1998, Monitoring of the chemical pollution of the river Rhône through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A Induction in Chub (*Leuciscus cephalus*), *Marine Environmental Research*, **46**(1-5), 257-262.
- Devaux A., Pesonen M. et Monod G., 1997, Alkaline Comet assay in Rainbow Trout hepatocytes, *Toxicology in Vitro*, **11**, 71-79.
- Deventer, 1996, Detection of genotoxic effects on cells of liver and gills of *B. rerio* by means of single cell gel electrophoresis, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **56**, 911-918.
- Dizdaroglu M., 1994, Chemical determination of oxidative DNA damage by gas-chromatography-mass-spectrometry, *Methods in Enzymology*, **234**, 3-16.
- Dizdaroglu M., Rao G., Halliwell B. et Gajewski E., 1991, Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions, *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, **285**(2), 317-324.
- Djordjevic B. et Tolmach L.J., 1967, Responses of synchronous populations of HeLa cells to ultraviolet irradiation at selected stages of the generation cycle, *Radiation Research*, **32**, 327-346.
- Dmitriev L.F. et Ivanova M.V., 1994, Interaction of tocopherol with peroxy radicals does not lead to the formation of lipid hydroperoxides in liposomes, *Chemistry and Physiology of Lipids*, **69**, 35-39.
- Dopp E., Barker C.M., Schiffman D. et Reinish C.L., 1996, Detection of micronuclei in hemocytes of *Mya arenaria* : association with leukemia and induction with an alkylating agent, *Aquatic Toxicology*, **34**, 31-45.

- Doyotte A., 1998, Etude de la lipoperoxydation et de la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine en tant que biomarqueurs de toxicité chez *Unio tumidus*, bivalve dulçaquicole exposés à des sédiments contaminés et en conditions de stress chimique, Thèse de Doctorat en Toxicologie de l'Environnement, Centre des Sciences de l'Environnement, Université de Metz, 121p.
- 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*, *Aquatic Toxicology*, **39**, 93-110.
- Drake I.M., Davies M.J., Mapstone N.P., Dixon M.F., Schorah C.J., White K.L.M., Chalmers D.M. et Axon A.T.R., 1996, Ascorbic acid may protect against human gastric cancer by scavenging mucosal oxygen radicals, *Carcinogenesis*, **17**(3), 559-562.
- Dybdahl M., Rison L., Moller P., Autrup H., Wallin H., Vogel U., Bornholdt J., Daneshvar B., Dragsted L.O., Weimann A., Poulsen H.E. et Loft S., 2003, DNA adduct formation and oxidative stress in colon and liver of Big Blue rats after dietary exposure to diesel particles, *Carcinogenesis*, **24**(11), 1759-1766.
- Earampamoorthy S. et Koff R.S., 1975, Health hazards of bivalve-mollusk ingestion, *Annals of Internal Medicine*, **83**(1), 107-110.
- Eastmann A. et Barry M.A., 1992, The origins of DNA breaks : a consequence of DNA damage, DNA repair, or Apoptosis ?, *Cancer investigation*, **10**(3), 229-240.
- Edwards A.A., Moissenko V.V. et Nikjoo H., 1994, Modelling of DNA breaks and the formation of chromosome aberrations, *International Journal of Radiation Biology*, **66**(5), 633-637.
- Ehrlich M., 2002, DNA methylation in cancer : too much, but also too little, *Oncogene*, **21**(35), 5400-5413.
- Epe B., 1993, DNA damage induced by photosensitization, 41-65, In *DNA and free radicals*, Halliwell B. et Aruoma O.I., (Eds), Ellis Horwood Limited, England.
- Erbes M., Wessler A., Obst U. et Wild A., 1997, Detection of primary DNA damage in *Chlamydomonas reinhardtii* by means of modified microgel electrophoresis, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **30**(4), 448-458.
- Esaka Y., Inagaki S. et Goto M., 2003, Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage, *Toxicology*, **181-182**, 219-222.
- Etienne J., 1996, Biochimie génétique, Biologie moléculaire, Troisième édition, collection "les Abrégés", Masson, Paris, 495p.
- Evans M.D. et Cooke M.S., 2004, Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids, *Bioessays*, **26**(5), 533-542.
- Fahrig R., Rupp M., Steinkamp-Zucht A. et Bader A., 1998, Use of primary rat and human hepatocyte sandwich cultures for activation of indirect carcinogens: monitoring of DNA strand breaks and gene mutations in co-cultured cells, *Toxicology in vitro*, **12**(4), 431-444.
- Fairbairn D.W., Olive P.L. et O'Neill K.L., 1995 a, The comet assay : a comprehensive review, *Mutation Research*, **399**, 37-59.

- Fairbairn J.J., Khan M.W., Ward K.J., Loveridge B.W., Fairbairn D.W. et O'Neill K.L., 1995 b, Induction of apoptotic cell DNA fragmentation in human cells after treatment with hyperthermia, *Cancer Letters*, **89**(2), 183-188.
- Farmer P.B., 2004, DNA and protein adducts as markers of genotoxicity, *Toxicology Letters*, **149**(1-3), 3-9.
- Faux S.P., Francis J.E., Smith A.G. et Chipman J.K., 1992, Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine in Ah-responsive mouse liver by iron and Aroclor 1254, *Carcinogenesis*, **13**, 247-250.
- Fedeli D., Fedeli A., Luciani F., Massi M., Falcioni F. et Polidori C., 2003, Lymphocyte DNA alteration by sub-chronic ethanol intake in alcohol-preferring rats, *Clinica Chimica Acta*, **337**, 43-48.
- Fenech M., 1997, The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus test method, *Mutation Research*, **392**, 11-18.
- Festa F., Cristaldi M., Ieradi L.A., Moreno S., Cozzi R., 2003, The Comet assay for the detection of DNA damage in *Mus spretus* from Doñana National Park, *Environmental Research*, **91**(1), 54-61.
- Flammarion P., Devaux A., Nehls S., Migeon B., Noury P. et Garric J., 2002, Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France), *Ecotoxicology And Environmental Safety*, **51**(2), 145-153.
- Flohe L., Güntzler W.A. et Schlock H.H., 1973, Glutathione peroxidase : a selenoenzyme, *European Journal Of Biochemistry / FEBS*, **32**, 132-134.
- Floyd R.A., Watson J.J., Wong P.K., Atmiller D.H. et Rickard R.C., 1986, Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine : sensitive detection and mechanisms of formation, *Free Radical Research Communications*, **1**(3), 163-172.
- Fouchécourt M.O., Arnold M., Berny P., Videmann B., Rether B. et Rivière J.L., 1999, Assessment of the bioavailability of PAHs in rats exposed to a polluted soil by natural routes: induction of EROD activity and DNA adducts and PAH burden in both liver and lung, *Environmental Research*, **80**(4), 330-339.
- Frelon S., 2001, Influence de métaux de transition sur la dégradation radicalaire de l'ADN, Thèse de Doctorat en Chimie, Université Joseph Fournier-Grenoble I, 154 p.
- Frenzilli G., Nigro M., Scarcelli V., Gorbi S. et Regoli F., 2001, DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon, *Aquatic Toxicology*, **53**(1), 19-32.
- Friedberg E.C., 1985, Nucleotide excision repair of DNA in eukaryotes : comparisons between human cells and yeast, *Cancer Surveys*, **4**(3), 529-555.
- Friedberg E.C., 1995 a, Editorial, *Methods*, **7**(2), 131-132.
- Friedberg E.C., 1995 b, Out of the shadows and into the light : the emergence of DNA repair, *Trends in Biochemical Sciences*, **20**(10), 381.
- Fung H., Kow Y.W., Van Houten B. 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 crocidolite asbestos, *Carcinogenesis*, **18**, 825-832.

- Gabbianelli R., Lupidi G., Villarini M. et Falcioni G., 2003, DNA damage induced by copper on erythrocytes of gilthead sea bream *Sparus aurata* and mollusk *Scapharca inaequivalvis*, *Archives Of Environmental Contamination And Toxicology*, **45**(3), 350-356.
- Gabbianelli R., Villarini M., Falcioni G. et Lupidi G., 2002, Effect of different organotin compounds on DNA of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) erythrocytes assessed by the comet assay, *Applied organometallic Chemistry*, **16**, 163-168.
- Gagné F., Trottier S., Blaise C., Sproull J. et Ernst B., 1995, Genotoxicity of sediment extracts obtained in the vicinity of a creosote-treated wharf to rainbow trout hepatocytes, *Toxicology Letters*, **78**, 175-182.
- Garaj-Vrhovac V. et Kopjar N., 2003, The alkaline Comet assay as biomarker in assessment of DNA damage in medical personnel occupationally exposed to ionizing radiation, *Mutagenesis*, **18**(3) 265-271.
- Garçon G., Garry S., Gosset P., Zerimech F., Martin A., Hannotiaux M. et Shirali P., 2001, Benzo(a)pyrene-coated onto Fe(2)O(3) particles-induced lung tissue injury : role of free radicals, *Cancer Letters*, **167**(1), 7-15.
- Garry S., Nesslany F., Aliouat E.M., Haguenoer J.M. et Marzin D., 2003 b, Assessment of genotoxic effect of benzo[a]pyrene in endotracheally treated rat using the comet assay, *Mutation Research*, **534**, 33-43.
- Garry S., Nesslany F., Aliouat E.M., Haguenoer J.M. et Marzin D., 2003 a, Hematite (Fe₂O₃) enhances benzo[a]pyrene genotoxicity in endotracheally treated rat, as determined by Comet Assay, *Mutation Research*, **538**(1-2), 19-29.
- Gedik C.M., Ewen S.W.B. et Collins A.R., 1992, Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C and its repair in human cells, *International Journal of Radiation Biology*, **62**, 313-320.
- Gedik C.M., Wood S.G. et Collins A.R., 1998, Measuring oxidative damage to DNA; HPLC and the comet assay compared, *Free Radical Research*, **29**, 609-615.
- Gielazyn M. L., Ringwood A.H., Piegorsch W.W. et Stanczyk S.E., 2003, Detection of oxidative DNA damage in isolated marine bivalve hemocytes using the comet assay and formamidopyrimidine glycosylase (Fpg), *Mutation Research*, **542**(1-2), 15-22.
- Godard T., Deslandes E., Sichel F., Poul J.M. et Gauduchon P., 2002, Detection of topoisomerase inhibitor-induced DNA strand breaks and apoptosis by the alkaline comet assay, *Mutation Research*, **520**(1-2), 47-56.
- Godard T., Fessard V., Huet S., Mourot A., Deslandes E., Pottier D., Hyrien O., Sichel F., Gauduchon P. et Poul J.M., 1999, Comparative *in vitro* and *in vivo* assessment of genotoxic effects of etoposide and chlorothalonil by the comet assay, *Mutation Research*, **444**, 103-116.
- Griffiths H.R., Møller L., Bartosz G., Bast A., Bertoni-Freddari C., Collins A., Cooke M., Coolen S., Haenen G., Hoberg A.M. et al., 2002, Biomarkers, *Molecular Aspects of Medicine*, **23**(1-3), 101-208.
- Grover P., Saleha Banu B., Dana Devi K. et Begum S., 2001, *In vivo* genotoxic effects of mercuric chloride in rat peripheral blood leucocytes using comet assay, *Toxicology*, **167**(3), 2001, 191-197.
- Guecheva T., Henriques J.A., Erdtmann B., 2001, Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian *in vivo*, studied with the single-cell gel test (comet assay), *Mutation Research*, **497**(1-2), 19-27.

- Guetens G., De Boeck G., Highley M., van Oosterom A.T. et de Bruijn E.A., 2001, Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **39**(4-5), 331-457.
- Halliwell B. et Dizdaroglu M., 1992, The measurement of oxidative DNA damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques, *Free Radical Research Communications*, **16**, 75-87.
- Halliwell B. et Gutteridge J.M.C., 1984, oxygen toxicity, oxygens radical, transition metals and disease, *Biochemistry Journal*, **219**, 1-14.
- Hamoutene D., Payne J.F., Rahimtula A. et Lee K., 2002, Use of the Comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons, *Marine Environmental Research*, **54**(3-5), 471-474.
- Hartl M.G., Coughlan B.M., Sheehan D., Mothersill C., van Pelt F.N., O'Reilly S.J., Heffron J.J., O'Halloran J. et O'Brien N.M., 2004, Implications of seasonal priming and reproductive activity on the interpretation of Comet assay data derived from the clam, *Tapes semidecussatus* Reeves 1864, exposed to contaminated sediments, *Marine Environmental Research*, **57**(4), 295-310.
- Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V. et Tice R.R., 2003, Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, **18**(1), 45-51.
- Harvey J.S., Lyons B.P., Page T.S., Stewart C. and Parry J.M., 1999, An assessment of the genotoxic impact of the Sea Empress oil spill by the measurement of DNA adduct levels in selected invertebrate and vertebrate species, *Mutation Research*, **441**(1), 103-114.
- Helbock H.J., Beckman K.B., Shigenaga M.K., Walter P.B., Woodall A.A., Yeo H.C. et Ames B.N., 1998, DNA oxidation matters : the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 288-293.
- Henderson L., Wolfreys A., Fedyk J., Bournier C. et Windebank S., 1998, The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins, *Mutagenesis*, **13**(1), 89-94.
- Higurashi M., Ohtsuki T., Inase A., Kusumoto R., Masutani C., Hanaoka F. et Iwai S., 2003, Identification and characterization of an intermediate in the alkali degradation of (6-4) photoproduct-containing DNA, *Journal of Biology and Chemistry*, **278**(51), 51968-51973.
- Hook S.E. et Lee R.F., 2004, Genotoxicant induced DNA damage and repair in early and late developmental stages of the grass Shrimp *Palaemonetes pugio* embryo as measured by the comet assay, *Aquatic Toxicology*, **66**, 1-14.
- Horvathova E., Slamenova D., Hlicikova L., Mandal T.K., Gabelova A. et Collins A.R., 1998, The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay, *Mutation Research*, **409**, 163-171.
- Hose J.E., 1994, Large-scale genotoxicity assessments in the marine environment, *Environmental Health Perspectives*, **102**(12), 29-32.
- Institut de Recherches Hydrobiologiques (IRH), 2003, Approche des risques sanitaires par étude du transfert de la contamination et de la toxicité des polluants de l'Erika par la voie alimentaire, rapport final, Nancy, 42 p.

International Agency for Research on Cancer (IARC), 1973, Monograph on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Overall evaluations of carcinogenicity : Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds, 3, Lyon, France, 127 p.

International Agency for Research on Cancer (IARC), 1987, Monograph on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Overall evaluations of carcinogenicity : An updating of IARC Monographs volumes 1 to 42, Lyon, France, 440 p.

Jacobson P.J., Farris J.L., Neves R.J. et Cherry D.S., 1993, Use of neutral red to assess survival of juvenile freshwaters mussels (*Bivalvia : Unionidae*) in bioassays, *Transactions of the American Microscopical Society*, **112**(1), 78-80.

Janssens B.J., Le Gall R.B. et Rees J.F., 2002 a, Peroxide-triggered erythrocytes haemolysis as a model for the study of oxidative damage in marine fishes, *Journal of Fish Biology*, **61**(1), 71-84.

Janssens B.J., Marchand-Brynaert J. et Rees J.F., 2002 b, Protection of peroxide-treated fish erythrocytes by coelenterazine and coelenteramine, *Free Radical Research*, **36**(9), 967-974.

Jarvis R.B. et Knowles J.F., 2003, DNA damage in zebrafish larvae induced by exposure to low-dose rate γ -radiation : detection by the alkaline comet assay, *Mutation Research*, 541, 63-69.

Kadhim M. et Parry J.M., 1984, The detection of mutagenic chemicals in the tissues of shellfish exposed to oil pollution, *Mutation Research*, **136**(2), 93-105.

Kamer I. et Rinkevich B., 2002, *In vitro* application of the comet assay for aquatic genotoxicity: considering a primary culture versus a cell line, *Toxicology in Vitro*, **16**(2), 177-184.

Kammann U., Bunke M., Steinhart H. et Theobald N., 2001, A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay, *Mutation Research*, **498**(1-2), 67-77.

Kammann U., Riggers J.V., Theobald N. et Steinhart H., 2000, Genotoxic potential of marine sediments from the North Sea, *Mutation Research*, **467**(2), 161-168.

Kasai H., 1997, Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis, *Mutation Research*, **387**(3), 147-163.

Kasprzak K.S., 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

Kassie F., Parzefall W. et Knasmüller S., 2000, Single cell gel electrophoresis assay : a new technique for human biomonitoring studies, *Mutation Research*, **463**, 13-31.

Kato J., Kobune M., Nakamura T., Kuroiwa G., Takada K., Takimoto R., Sato Y., Fujikawa K., Takahashi M., Takayama S. *et al.*, 2001, Normalization of elevated hepatic 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in chronic hepatitis C patients by phlebotomy and low iron diet, *Cancer Research*, **61**(24), 8697-8702.

Kehrer J.P., 1993, Free radicals as mediators of tissue injury and disease, *Critical Reviews in Toxicology*, **23**(1), 21-48.

Kim G.B. et Lee R.F., 2004, Effects of genotoxic compounds on DNA and development of early and late grass shrimp embryo stages, *Marine Environmental Research*, **57**(5), 329-338.

- Kirsch-Volders M., Sofuni T., Aardema M., Albertini S., Eastmond D., Fenech M., Ishidate M.Jr., Kirchner S., Lorge E. *et al.*, 2003, Report from the *in vitro* micronucleus assay working group, *Mutation Research*, **540**(2), 153-163.
- Kliesch U., Roupova I. et Adler I.D., 1982, Induction of chromosome damage in mouse bone marrow by benzo[a]pyrene, *Mutation Research*, **102**(3), 265-273.
- Klobucar G.I.V., Pavlica M., Erben R. et Papes D., 2003, Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments, *Aquatic Toxicology*, **64**(1), 15-23.
- Kohn K.W. et Grimeg-Ewig R.A., 1973, Alkaline elution analysis, a new approach to the study of DNA single-strand interruptions in cells, *Cancer Research*, **33**, 1849-1853.
- Kopjar N. et Garaj-Vrhovac V., 2001, Application of the alkaline comet assay in human biomonitoring for genotoxicity: a study on Croatian medical personnel handling antineoplastic drugs, *Mutagenesis*, **16**(1), 71-78.
- Koppen G. et Angelis K.J., 1998, Repair of X-ray induced DNA damage measured by the comet assay in roots of *Vicia faba*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **32**(3), 281-285.
- Kow Y.W. et Dare A., 2000, Detection of abasic sites and oxidative DNA base damage using an ELISA-like assay, *Methods*, **22**(2), 164-169.
- Kriek E., Rojas M., Alexandrov K. et Bartsch H., 1998 Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in humans: relevance as biomarkers for exposure and cancer risk, *Mutation Research*, **400**(1-2), 215-231.
- Krys S. et Frémy J.M., 2002, Phycotoxines et produits de la mer: risques sanitaires associés et mesures de prévention, *Revue Française des Laboratoires*, **348**, 29-38.
- Kubo K., Ide H., Wallace S.S. et Kow Y.W., 1992, A novel, sensitive, and specific assay for abasic sites, the most commonly produced DNA lesion, *Biochemistry*, **31**(14), 3703-3708.
- Kurelec B., 1993, The genotoxic disease syndrome, *Marine Environmental Research*, **35**(4), 341-348.
- La D.K. et Swenberg J.A., 1996, DNA adducts : biological markers of exposure and potential applications to risk assessment, *Mutation Research*, **365**(1-3), 129-146.
- Labbé C., Martoriati A., Devaux A. et Maisse G., 2001, Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout, *Molecular Reproduction and Development*, **60**, 397-404.
- Labieniec M., Gabryelak T. et Falcioni G., 2003, Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*, *Mutation Research*, **539**(1-2), 19-28.
- Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. et Ramade F. (Eds), 1997, Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux, collection "Recherche en Biologie", Masson, Paris, 419p.
- Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. et Ramade F. (Eds), 1998, Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement, collection "Technique et documentation", Lavoisier, Paris, 320p.
- Large T., Shaw J.P., Peters L.D., McIntosh A.D., Webster L., Mally A. et Chipman J.K., 2002, Different levels of mussel (*Mytilus edulis*) DNA strand breaks following chronic field and acute

- laboratory exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Marine Environmental Research*, **54**(3-5), 493-497.
- Larno V., Laroche J., Launey S., Flammarion P. et Devaux A., 2001, Responses of chub (*Leuciscus cephalus*) populations to chemical stress, assessed by genetic markers, DNA damage and cytochrome P4501A induction, *Ecotoxicology*, **10**(3), 145-158.
- Lawrence R.A. et Burk R.F., 1976, Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **71**(4), 952-958.
- Le Pennec G. et Le Pennec M., 2001, Evaluation of the toxicity of chemical compounds using digestive *acini* of the bivalve mollusc *Pecten maximus* L. maintained alive *in vitro*, *Aquatic Toxicology*, **53**(1), 1-7.
- Lebailly P., Vigreux C., Lechevrel C., Ledemeney D., Godard T., Sichel F., Letalaer J.Y., Henry-Amar M. et Gauduchon P., 1998, DNA damage in mononuclear leucocytes of farmers measured using the alkaline Comet assay : modifications of DNA damage levels after one-day field spraying period with selected pesticides, *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, **7**, 929-940.
- Lee M., Kwon J. et Chung M.K., 2003, Enhanced prediction of potential rodent carcinogenicity by utilizing comet assay and apoptotic assay in combination, *Mutation Research*, **541**(1-2), 9-19.
- Lee R. et Kim G.B., 2002, Comet assays to assess DNA damage and repair in grass shrimp embryos exposed to phototoxicants, *Marine Environmental Research*, **54**(3-5), 465-469.
- Lee R., Kim G.B., Maruya K.A., Steinert S.A. et Oshima Y., 2000, DNA strand breaks (comet assay) and embryo development effects in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) embryos after exposure to genotoxicants, *Marine Environmental Research*, **50**(1-5), 553-557.
- Lee R.F. et Steinert S., 2003, Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals, *Mutation Research*, **544**(1), 43-64.
- Lemière S., 2000, Etude des dommages à l'ADN chez les bivalves dulçaquicoles (*Unio tumidus*), par le test des comètes pour la mise en évidence d'effets génotoxiques des polluants hydriques, DEA Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz, 42 p.
- Léonard A., 1990, Les Mutagènes de l'environnement et leurs effets biologiques, Masson, Paris, 306p.
- Leroy T., Van Hummelen P., Anard D., Castelain P., Kirsch-Volders M., Lauwerys R. et Lison D., 1996, Evaluation of three methods for the detection of DNA single-strand breaks in human lymphocytes : alkaline elution, nick translation, and single-cell gel electrophoresis, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **47**(5), 409-422.
- Lindahl T. et Karlström O., 1973, Heat-induced depyrimidination of deoxyribonucleic acid in neutral solution, *Biochemistry*, **12**(25), 5151-5154.
- Lindahl T. et Nyberg B., 1972, Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid, *Biochemistry*, **11**(19), 3610-3618.
- Lo S.S., Wang H.C., Shyr Y.M., Lai C.R. et Lui W.Y., 1994, DNA flow cytometric analysis of primary breast cancer in Chinese women: the relationship of DNA aneuploidy to clinical characteristics, *European Journal of Surgery and Oncology*, **20**(5), 553-556.
- Loeb L.A. et Preston B.D., 1986, Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites, *Annual Review of Genetic*, **20**, 201-230.

- Lutsenko E. et Bhagwat A.S., 1999, Principal causes of hot spots for cytosine to thymine mutations at sites of cytosine methylation in growing cells : A model, its experimental support and implications, *Mutation Research*, **437**(1), 11-20.
- Lutz W.k., 1979, *In vivo* covalent binding of organic chemicals to DNA as a quantitative indicator in the process of chemical carcinogenesis, *Mutation Research*, **65**(4), 289-356.
- Malyarchuk S., Youngblood R., Landry A.M., Quillin E. et Harrison L., 2003, The mutation frequency of 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxodG) situated in a multiply damaged site: comparison of a single and two closely opposed 8-oxodG in *Escherichia coli*, *DNA Repair*, **2**(6), 695-705.
- Maniatis T., Fritsch E.F. et Sambrook, J., 1982, Molecularcloning a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New-York.
- Marnett L.J., 2003, Separation procedures capable of revealing DNA adducts, *Journal of Chromatography B*, **797**(1-2), 321-329.
- Martin F.L., Cole K.J., Harvey D., Weaver G., Williams J.A., Millar B.C., PHillips D.H et Grover P.L., 2000, DNA damage in human breast milk cells and its induction by "early" and "late" milk extracts, *Carcinogenesis*, **21**(4), 799-804.
- Martin F.L., Cole K.J., Wheat L.M.C., Grover P.L. et Phillips D.H., 1999, New approaches to determining the aetiology of sporadic breast cancer, *Recent Research Developments in Cancer*, **1**, 13-21.
- Marzin D., 1999, New approaches to estimating the mutagenic potential of chemicals, *Cell Biology and Toxicology*, **15**, 339-365.
- Matsumoto Y., Kim K. et Bogenhagen D.F., 1994, Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes : an alternative pathway of base excision DNA repair, *Molecular and Cellular Biology*, **14**(9), 6187-6197.
- McCord J.M. et Fridovich I., 1969, Superoxide Dismutase: an Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocytin), *Journal of Biology and Chemistry*, **244**, 6049-6055.
- McGrath R.A. et Williams R., 1966, Reconstruction in vivo of irradiated *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid ; the rejoining of broken pieces, *Nature*, **212**, 534-535.
- McHugh P.J., Spanswick V.J. et Hartley J.A., 2001, Repair of DNA interstrand crosslinks : molecular mechanisms and clinical relevance, *The Lancet Oncology*, **2**(8), 483-490.
- McKelvey-Martin V.J., Green M.H.L., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., De Meo M.P. et Collins A., 1993, The single cell gel electrophoresis assay (comet assay) : a European review, *Mutation Research*, **288**, 93-104.
- McKelvey-Martin V.J., Melia N., Walsh I.K., Johnston S.R., Hughes C.M., Lewis S.E.M. et Thompson W., 1997, Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay : (1) human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder; and (2) human sperm and male infertility, *Mutation Research*, **375**, 93-104.
- Meador J.P., Stein J.E., Reichert W.L. et Varanasi U., 1995, Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms, *Reviews in Environmental Contamination and Toxicology*, **143**, 79-165.

- Meehan K.A., Truter E.J., Slabbert J.P. et Parker M.I., 2004, Evaluation of DNA damage in a population of bats (*Chiroptera*) residing in an abandoned monazite mine, *Mutation Research*, **557**(2), 183-190.
- Mei S., Xu G., Xing J. et Wu C., 2001, Method for the analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in urine by gas chromatography, *Analytical Sciences*, **17**(6), 779-781.
- Mei S.R., Yao Q.H., Cai L.S., Xing J., Xu G.W. et Wu C.Y., 2003, Capillary electrophoresis with end-column amperometric detection of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, *Electrophoresis*, **24**(9), 1411-1415.
- Meintières S., Nessler F., Pallardy M. et Marzin D., 2003, Detection of ghost cells in the standard alkaline comet assay is not a good measure of apoptosis, *Environmental And Molecular Mutagenesis*, **41**(4), 260-269.
- Memisoglu A. et Samson L., 2000, Base excision repair in yeast and mammals, *Mutation Research*, **451**(1-2), 39-51.
- Menke M., Angelis K.J. et Schubert I., 2000, Detection of specific DNA lesions by a combination of comet assay and FISH in plants, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **35**(2), 132-138.
- Menke M., Chen I.P., Angelis K.J. et Schubert I., 2001, DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins, *Mutation Research*, **493**(1-2), 87-93.
- Mersch J. et Beauvais M.-N., 1997, The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to *in situ* monitoring genotoxicity in freshwater environments, *Mutation Research*, **393**, 141-149.
- Michel X.R., Beasse J.F. et Narbonne J.F., 1995, *In vivo* metabolism of benzo(a)pyrene in the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **28**(2), 215-222.
- Mikhailov I., Russev G. et Anachkova B., 2000, Treatment of mammalian cells with mimosine generates DNA breaks, *Mutation Research*, **459**(4), 299-306.
- Milowska K., Gabryelak T., Dudala J., Labieniec M. et Slobozhanina E., 2003, Biological activity of pentachlorophenol on the digestive gland cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*, *Zeitschrift Fur Naturforschung C, Journal Of Biosciences*, **58**(11-12), 867-872.
- Mitchelmore C.L. et Chipman J.K., 1998 a, DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring, *Mutation Research*, **399**, 135-147.
- Mitchelmore C.L., Birmelin C., Chipman J.K. et Livingstone D.R., 1998 b, Evidence for cytochrome P-450 catalysis and free radical involvement in the production of DNA strand breaks by benzo[a]pyrene and nitroaromatics in mussel (*Mytilus edulis* L) digestive gland cell, *Aquatic Toxicology*, **41**(3), 193-212.
- Mitchelmore C.L., Birmelin C., Livingstone D.R. et Chipman K.J., 1998 a, Detection of DNA strand breaks in isolated mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells using the "Comet" assay, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **41**, 51-58.
- Mitchelmore C.L., Chipman J.K., Garcia-Martinez P., Lemaire P., Peters L.D. et Livingstone D.R., 1996, Normal status of hepatic 7-ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) activity, antioxidant enzymes and DNA oxidation in Turbot (*Scophthalmus maximus*) and other Flatfish species following exposure to nitroaromatic compounds, *Marine Environmental Research*, **42**(1-4), 329-333.

- Mitchelmore L. et Chipman J. K., 1998 b, Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay, *Aquatic Toxicology*, **4**(1-2), 161-182.
- Miyamae Y., Iwasaki K., Kinae N., Tsuda S., Murakami M., Tanaka M. et Sasaki Y.F., 1997, Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition, *Mutation Research*, **393**, 107-113
- Miyata M., Takano H., Takahashi K., Sasaki Y.F. et Yamazoe Y., 2002, Suppression of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced DNA damage in rat colon after grapefruit juice intake, *Cancer Letters*, **183**(1), 17-22.
- Molecular Probes, 2004, (Eugene, USA), Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, [en ligne], adresse URL : <http://www.probes.com/handbook/>
- Møller P. et Wallin H., 1998, Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product, *Mutation Research*, **410**(3), 271-290.
- Møller P., Wallin H., Vogel U., Autrup H., Risom L., Hald M.T., Daneshvar, B., Dragsted L.O., Poulsen H.E., Henrik E. et Loft S., 2002, Mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in colon and liver of Big Blue rats: role of DNA adducts, strand breaks, DNA repair and oxidative stress, *Carcinogenesis*, **23**(8), 1379-1385.
- Moretti M., Villarini M., Scassellati-Sforzolini G., Sanstroni A.M., Fedeli D. et Falcioni G., 1998, Extent of DNA damage in density separated trout erythrocytes assessed by the "comet" assay, *Mutation research*, **397**, 353-360.
- Moss T., Dimitrov S.I. et Houde D., 1997, UV-Laser Crosslinking of Proteins to DNA, *Methods*, **11**(2), 225-234.
- Moustacchi E, 2000, DNA damage and repair: consequences on dose-responses, *Mutation Research*, **464**(1), 35-40.
- Mouthon J. et Charvet S., 1999, Compared sensitivity of species, genera and families of molluscs to biodegradable pollution. *Annals of Limnology*, **35**, 31-39.
- Müller AK., Farombi E.O., Moller P., Autrup H.N., Vogel U., Wallin H., Dragsted L.O., Loft S. et Binderup M.L., 2004, DNA damage in lung after oral exposure to diesel exhaust particles in Big Blue rats, *Mutation Research*, **550**, 123-132.
- Müller W.E.G., Batel E., Lacorn M., Steinhart H., Simat T., Lauenroth S., Hassanein H. et Shröder H.C., 1998, Accumulation of cadmium and zinc in the marine sponge *Suberites domuncula* and its potential consequences on single-strand breaks and on expression of heat-shock protein : a natural field study, *Marine Ecology Progress Series*, **167**, 127-135.
- Mustonen R., Bouvier G., Wolber G., Stöhr M., Peschke P. et Bartsch H., 1999, A comparison of gamma and neutron irradiation on Raji cells: effects on DNA damage, repair, cell cycle distribution and lethality, *Mutation Research*, **429**(2), 169-179.
- Nacci D.E., Cayuala S. et Jackim E., 1996, Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay, *Aquatic toxicology*, **35**, 197-210.

- Navarrete M.H., Carrera P., de Miguel M., de la Torre C.A., 1997, Fast comet assay variant for solid tissue cells, The assessment of DNA damage in higher plants, *Mutation Research*, **389**(2-3), 271-277.
- Nehls S. et Segner H., 2001, Detection of DNA damage in two cell lines from rainbow trout, RTG-2 and RTL-W1, using the comet assay, *Environmental Toxicology*, **16**(4), 321-329.
- Nestmann E.R., Bryant D.W. et Carr C.J., 1996, Toxicological significance of DNA adducts : summary of discussions with an expert panel, *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, **24**, 9-18.
- Nigro M., Frenzilli G., Scarcelli V., Gorbi S. et Regoli F., 2002, Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*, *Marine Environmental Research*, **54**(3-5), 517-520.
- Nisbet I.C. et LaGoy P.K., 1992, Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, **16**(3), 290-300.
- Nishimoto M., Roubal W.T., Stein J.E. et Varanasi U., 1991, Oxidative DNA damage in tissues of English sole (*Parophrys vetulus*) exposed to nitrofurantoin, *Chemico-Biological Interactions*, **80**(3), 317-326.
- Nozawa H., Tazumi K., Sato K., Yoshida A., Takata J., Arimoto-Kobayashi S. et Kondo K., 2004, Inhibitory effects of beer on heterocyclic amine-induced mutagenesis and PhIP-induced aberrant crypt foci in rat colon, *Mutation Research*, **559**(1-2), 177-187.
- Nunn J.W., Livingstone D.R. et Chipman J.K., 1996, Effect of genetic toxicants in aquatic organisms, 225-251, In *Toxicology and Aquatic Pollution : Physiological Molecular and Cellular Approaches*, *Society for Experimental Biology Seminar Series*, **57**, Taylor E.W. (Ed), Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- OCDE 486, 1997, Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *in vivo*.
- Office of the Federal Register (OFR), 1982, Appendix A : Priority Pollutants, Fed Reg 47:52309.
- Ogawa Y., Kobayashi T., Nishioka A., Kariya S., Hamasato S., Seguchi H. et Yoshida S., 2003, Radiation-induced oxidative DNA damage, 8-oxoguanine, in human peripheral T cells, *International Journal of Molecular Medicine*, **11**(1), 27-32.
- Olive P.L., 1988, DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **11**(4), 487-495.
- Olive P.L., Banath J.P. et Durand R.E., 1990, Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual Chinese hamster cells, *Journal of the National Cancer Institute*, **82**(9), 779-783.
- Olive P.L., Frazer G. et Banath J.P., 1993, Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay, *Radiation Research*, **136**, 130-136.
- Olive P.L., Trotter T., Banath J.P., Jackson S.M. et Le Riche J., 1996, Heterogeneity in human tumour hypoxic fraction using the comet assay, *British Journal of Cancer*, **74** (S. XXVII), S191-S195.
- Östling O. et Johanson K.J., 1984, Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **123**(1), 291-298.
- Otteneider M. et Lutz W.K., 1999, Correlation of DNA adduct levels with tumor incidence: carcinogenic potency of DNA adducts, *Mutation Research*, **424**, 237-247.

Pagano G., de Biase A., Deeva I.B., Degan P., Doronin Y.K., Iaccarino M., Oral R., Trieff N.M., Warnau M. et Korkina L.G., 2001 a, The role of oxidative stress in developmental and reproductive toxicity of Tamoxifen, *Life Sciences*, **68**, 1735-1749.

Pagano G., Degan P., de Biase A., Iaccarino M. et Warnau M., 2001 b, Diepoxybutane and mitomycin C toxicity is associated with the induction of oxidative DNA damage in sea urchin embryos, *Human and Experimental Toxicology*, **20**, 651-655.

Palazzetti S., Richard M.J., Favier A. et Margaritis I., 2003, Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage, *Cancer Journal of Applied Physiology*, **28** (4), 588-604.

Palus J., Rydzynski K., Dziubaltowska E., Wyszynska K., Natarajan A.T. et Nilsson R., 2003, Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium, *Mutation Research*, **540**(1), 19-28.

Pandurangi R., Petras M., Ralph S. et Vrzoc M., 1995, Alkaline single cell gel (Comet) assay and genotoxicity monitoring using Bullheads and Carps, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **26**, 345-356.

Pastor N., López-Lázaro M., Tella J.L., Baos R., Hiraldo F. et Cortés F., 2001 a, Assessment of genotoxic damage by the comet assay in white storks (*Ciconia ciconia*) after the Doñana Ecological Disaster, *Mutagenesis*, **16**(3), 219-223.

Pastor N., Baos R., López-Lázaro M., Jovani R., Tella J.L., Hajji N., Hiraldo F., et Cortés F., 2004, A 4 year follow-up analysis of genotoxic damage in birds of the Doñana area (south west Spain) in the wake of the 1998 mining waste spill, *Mutagenesis*, **19**(1), 61-65.

Pastor N., López-Lázaro M., Tella J.L., Baos R., Forrero M.G., Hiraldo F. et Cortés, F., 2001 b, DNA damage in birds after the mining waste spill in southwestern Spain: a Comet assay evaluation, *Journal Of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, **20**(4), 317-324.

Pavlica M., Klobucar G.I., Mojas N., Erben R., Papes D., 2001, Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay, *Mutation Research*, **490**(2) 209-214.

Payne J.F., Malins D.C. , Gunselman S., Rahimtula A. et Yeats P.A., 1998, DNA oxidative damage et vitamin A reduction in fish from a large lake system in Labrador, Newfoundland, contaminated with Iron-ore mine tailings, *Marine Environmental Research*, **46**(1-5), 289-294.

Penning T.M., 1993, Dihydrodiol dehydrogenase and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism, *Chemical and Biological Interactions*, **89**(1), 1-34.

Pföhler S. et Wolf H.U., 1996, Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **27**(3), 196-201.

Picco S.J., De Luca J.C., Mattioli G. et Dulout F.N., 2001, DNA damage induced by copper deficiency in cattle assessed by the Comet assay, *Mutation Research*, **498**(1-2), 1-6.

Ploch S.A., Lee Y.P., Maclean E. et Di Giulio R., 1999, Oxidative stress in liver of brown bullhead and channel catfish following exposure to tert-butyl hydroperoxide, *Aquatic Toxicology*, **46**, 231-240.

Poli P., de Mello M.A., Buschini A., de Castro V.L.S.S., Restivo F.M., Rossi C. et Zucchi T.M.A.D., 2003, Evaluation of the genotoxicity induced by the fungicide fenarimol in mammalian and plant cells by use of the single-cell gel electrophoresis assay, *Mutation Research*, **540**(1), 57-66.

- Pool-Zobel B.L., Bub A., Müller H., Wollowski I. et Rechkemmer G., 1997, Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods, *Carcinogenesis*, **18**(9), 1847-1850.
- Poon R., Davis H., Park G., Lecavalier P., Yagminas A., Elwin J., Chu I. et Valli V.E., 1998, Subchronic toxicity of Benzo(b)thiophene on rats following dietary exposure, *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, **55**(2), 133-150.
- Pouget J.P., Douki T., Richard M.J. et Cadet J., 2000, DNA damage induced in cells by gamma and UVA radiation as measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and Comet assay, *Chemical Research in Toxicology*, **13**, 541-549.
- Pruski A.M. et Dixon D.R., 2002, Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L, *Aquatic Toxicology*, **57**(3), 127-137.
- Pruski A.M. et Dixon D.R., 2003, Toxic vents and DNA damage: first evidence from a naturally contaminated deep-sea environment, *Aquatic Toxicology*, **64**(1), 1-13.
- Radak Z., Pucsek J., Boros S., Jöszai L. et Taylor A.W., 2000, Changes in urine 8-hydroxydeoxyguanosine levels of super-marathon runners during a four-day race period. *Life Sciences*, **66**(18):1763-1767.
- Rajaguru P., Kalpana R., Hema A., Suba S., Baskaraseethupathi B., Kumar P.A. et Kalaiselvi K., 2001, Genotoxicity of some sulfur dyes on tadpoles (*Rana hexadactyla*) measured using the comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **38**(4), 316-22.
- Rajaguru P., Suba S., Palanivel M. et Kalaiselvi K., 2003, Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues, *Environmental And Molecular Mutagenesis*, **41**(2), 85-91.
- Rajski SR, Jackson BA et Barton J.K., 2000, DNA repair: models for damage and mismatch recognition, *Mutation Research*, **447**(1), 49-72.
- Ralph S. et Petras M., 1997, Genotoxicity monitoring of small bodies of water using two species of tadpoles and the alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **31**, 374-382.
- Ralph S. et Petras M., 1998 a, Comparison of sensitivity to methyl methanesulphonate among tadpole developmental stages using the alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **29**, 418-430.
- Ralph S. et Petras M., 1998 b, Caged amphibian tadpoles and in situ genotoxicity monitoring of aquatic environments with the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay, *Mutation Research*, **413**, 235-250.
- Ralph S., Petras M., Pandrangi R. et Vrzoc M., 1996, Alkaline single-cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **28**(2), 112-120.
- Rank J. et Jensen K., 2003, Comet assay on gill cells and hemocytes from the blue mussel *Mytilus edulis*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **54**(3), 323-329.
- Rank J., 1999, Use of comet assay on the blue mussel, *Mytilus edulis*, from coastal waters in Denmark, *Neoplasma*, **46**(S), 9-10.

- Ravanat J.C., Douki T. et Cadet J., 2001, Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components, *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*, **63**, 88-102.
- Reichert W.L., French B.L. et Stien J.E., 1999, exposure of marine mammals to genotoxic environmental contaminants : application of ^{32}P -postlabeling assay for measuring DNA-xenobiotic adducts, *Environmental Monitoring and assessment*, **56**, 225-239.
- Reifferscheid G. et Grummt T., 2000, Genotoxicity in german surfac waters - Results of a collaborative study, *Water, Air, and Soil Pollution*, **123**, 67-79.
- Reiter R.J., 1996, Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals, *European Journal Of Endocrinology*, **134**(4), 412-420.
- Rigdon R.H. et Neal J., 1966, Effect of feeding benzo(a)pyrene on growth of young mice, *Texas Reports on Biology and Medecine*, **24**(3), 473-478.
- Risso-de Faverney C., Devaux A., Lafaurie M., Girard J. P., Bailly B. et Rahmani R., 2001 a, Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygene species, *Aquatic Toxicology*, **53**(1), 65-76.
- Risso-de Faverney C., Devaux A., Lafaurie M., Girard J.P. et Rahmani R., 2001 b, Toxic effects of wastewaters collected at upstream and downstream sites of a purification station in cultures of rainbow trout hepatocytes, *Archives Of Environmental Contamination and Toxicology*, **41**(2), 129-141.
- Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO), 2002, Surveillance du milieu marin, travaux du RNO. IFREMER, Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, Paris, France, 48p.
- Rodius F., Hammer C. et Vasseur P., 2002, Use of RNA arbitrarily primed PCR to identify genomic alterations in the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus* at a contaminated site. *Environmental Toxicology*, **17**(6), 538-546.
- Rodriguez-Ariza A., Alham J., Diaz-Mendez F.M. et Lopez-Barea J., 1999, Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of *Sparus aurata* fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution, *Mutation Research*, **438**, 97-107.
- Rojas E., Lopez M.C. et Valverde M., 1999, .Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications, *Journal of Chromatography B*, **722**(1-2), 225-254.
- Roser S., Pool-Zobel B.L. et Rechkemmer G., 2001, Contribution of apoptosis to responses in the comet assay, *Mutation Research*, **497**(1-2), 169-175.
- Roos P.H., 2002, Differential induction of CYP1A1 in duodenum, liver and kidney of rats after oral intake of soil containing polycyclic aromatic hydrocarbons, *Archives of Toxicology*, **76**, 75-82.
- Roos P.H., Tschirbs S., Welge P., Hack A., Theegarten D., Mogilevski G. et Wilhelm M., 2002, Induction of cytochrome P450 1A1 in multiple organs of minipigs after oral exposure to soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), *Archives of Toxicology*, **76**, 326-334.
- Roy L.A., Armstrong J.L., Sakamoto K., Steinert S., Perkins E., Lomax D.P., Johnson, L.L. et Schlenk D., 2003 b, The relationships of biochemical endpoints to histopathology and population metrics in feral flatfish species collected near the municipal wastewater outfall of Orange County, California, USA, *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, **22**(6), 1309-1317.

- Roy L.A., Steinert S., Bay S.M., Greenstein D., Sapozhnikova Y., Bawardi O., Leifer I. et Schlenk D., 2003 a, Biochemical effects of petroleum exposure in hornyhead turbot (*Pleuronichthys verticalis*) exposed to a gradient of sediments collected from a natural petroleum seep in CA, USA, *Aquatic Toxicology*, **65**(2), 159-169.
- Rundell M.S., Wagner E.D. et Plewa M.J., 2003, The comet assay: genotoxic damage or nuclear fragmentation ? , *Environmental And Molecular Mutagenesis*, **42**(2), 61-67.
- Russo C., Rocco L., Morescalchi M.A. et Stingo V., 2004, Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **57**(2), 168-174.
- Rydberg B. et Johanson K.J., 1978, Estimation of single strand breaks in single mammalian cells. In *DNA repair mechanisms*, 465-468, Hanawalt P.C. , Friedberg E.F. et Fox C.F. (Eds), Academic press, New York.
- Salagovic J., Gilles J., Verschaeve L. et Kalina I., 1996, The Comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms : a promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites, *Folia Biologica*, **42**, 17-21.
- Saleha Banu B., Dana Devi., K., Rahman M.F., Ahuja Y.R., Kaiser J., 2001, Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using comet assay, *Food and Chemical Toxicology*, **39**(4), 361-366.
- Salles B., Provot C., Calsou P., Hennebelle I., Gosset I. et Fournie G.J., 1995, A chemiluminescent microplate assay to detect DNA damage induced by genotoxic treatments, *Analytical Biochemistry*, **231**, 37-42.
- Samson L.D., 1992, The repair of DNA alkylation damage by methyltransferases and glycosylases, *Essays In Biochemistry*, **27**, 69-7
- Santos S.J., Singh N.P. et Natarajan A.T., 1997, Fluorescence in situ hybridization with Comets, *Experimental Cell Research*, **232**, 407-411.
- Sarasin A., 2003, An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis, *Mutation Research*, **544**(2-3), 99-106.
- Sasaki Y.F., Izumiyama F., Nishidate E., Ishibashi S., Tsuda S., Matsusaka N., Asano N., Saotome K., Sofuni T. et Hayashi M., 1997 c, Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay : a preliminary study, *Mutation Research*, **393**, 133-139.
- Sasaki Y.F., Izumiyama F., Nishidate E., Ohta T., Ono T., Matsusaka N. et Tsuda S., 1997 b, Simple detection of *in vivo* genotoxicity of pyrimethamine in rodents by the modified alkaline single-cell gel electrophoresis assay, *Mutation Research*, **392**(3), 251-259.
- Sasaki Y.F., Kawaguchi S., Kamaya A., Ohshita M., Kabasawa K., Iwama K., Taniguchi K. et Tsuda S., 2002, The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives, *Mutation Research*, **519**(1-2), 103-119.
- Sasaki Y.F., Sekihashi K., Izumiyama F., Nishidate E., Saga A., Ishida K. et Tsuda S., 2000, The Comet Assay with Multiple Mouse Organs: Comparison of Comet Assay Results and Carcinogenicity with 208 Chemicals Selected from the IARC Monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, **30**(6), 629-799.

- Sasaki Y.F., Tsuda S., Izumiyama F. et Nishidate E., 1997 a, Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay, *Mutation Research*, **388**(1), 33-44.
- Sastre M.P., Vernet M. et Steinert S., 2001, Single-cell gel/comet assay applied to the analysis of UV radiation-induced DNA damage in *Rhodomonas sp.* (Cryptophyta), *Photochemistry and Photobiology*, **74**(1), 55-60.
- Scarpato R., Migliore L., Alfinito-Cogneti G. et Barale R., 1990, Induction of micronuclei in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters, *Marine Pollution Bulletin.*, **21**(2), 74-80.
- Scassellati-Sforzolini G., Pasquini R., Moretti M., Villarini M., Fatigoni C., Dolara P., Monarca S., Caderni G., Kuchenmeister F., Schmezer P. et Pool-Zobel B.L., 1997, *In vivo* studies on genotoxicity of pure and commercial Linuron, *Mutation Research*, **390**, 207-221.
- Schaaper R.M., Glickman R.M. et Loeb L.A., 1982, Mutagenesis resulting from depurination is an SOS process, *Mutation Research*, **106**(1), 1-9.
- Schaaper R.M., Kunkel T.A. et Loeb L.A., 1983, Infidelity of DNA synthesis associated with bypass of apurinic sites, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **80**(2), 487-491.
- Schneider K., Roller M., Kalberlah F. et Schuhmacher-Wolz U., 2002, Cancer Risk assessment for oral exposure to PAH mixtures, *Journal of Applied Toxicology*, **22**, 73-83.
- Schnurstein A. et Braunbeck T., 2001, Tail Moment versus Tail Length-Application of an *in vitro* version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from Zebrafish (*Danio rerio*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **49**, 187-196.
- Schwartz, D.C. et Cantor C.R., 1984, Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis, *Cell*, **37**, 67-75.
- Scientific Committee on Food (SCF), 2002, Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food, SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final, Bruxelles, 84p.
- Seino T., Saito H., Kaneko T., Takahashi T., Kawachiya S. et Kurachi H., 2002, Eight-hydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an *in vitro* fertilization-embryo transfer program, *Fertility and Sterility*, **77**(6), 1184-1190.
- Sekihashi K., Yamamoto A., Matsumura Y., Ueno S., Watanabe-Akanuma M., Kassie F., Knasmüller S., Tsuda S., Sasaki Y.F., 2002, Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay, *Mutation Research*, **517**(1-2), 53-75.
- Selden J.R., Dolbeare F., Clair J.H., Miller J.E., McGettigan K., DiJohn J.A., Dysart G.R., DeLuca J.G., 1994, Validation of a flow cytometric *in vitro* DNA repair (UDS) assay in rat hepatocytes. *Mutation Research*, **315**(2), 147-167.
- Shaw J. P., Large A.T., Donkin P., Evans S.V., Staff F.J., Livingstone D.R., Chipman J.K. et Peters L.D., 2004, Seasonal variation in cytochrome P450 immunopositive protein levels, lipid peroxidation and genetic toxicity in digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*, *Aquatic Toxicology*, **67**(4), 325-336.

- Shaw J.P., Large A.T., Livingstone D.R., Doyotte A., Renger J., Chipman J.K. et Peters L.D., 2002, Elevation of cytochrome P450-immunopositive protein and DNA damage in mussels (*Mytilus edulis*) transplanted to a contaminated site, *Marine Environmental Research*, **54**, 505-509.
- Shaw J.P.A., Large T., Chipman J.K., Livingstone D.R. et Peters L.D., 2000, Seasonal variation in mussel *Mytilus edulis* digestive gland cytochrome P4501A- and 2E-immunoidentified protein levels and DNA strand breaks (Comet assay), *Marine Environmental Research*, **50**(1-5), 405-409.
- Shen H.M., Ong C.N. et Shi C.Y., 1995, Involvement of reactive oxygen species in aflatoxin B1-induced cell injury in cultured rat hepatocytes, *Toxicology*, **99**(1-2), 115-123.
- Shen S., Cooley D.M., Glickman L.T., Glickman N., Waters D.J., 2001, Reduction in DNA damage in brain and peripheral blood lymphocytes of elderly dogs after treatment with dehydroepiandrosterone (DHEA), *Mutation Research*, **480-481**, 153-162.
- Shigenaga M.K., Park J.W., Cundy K.C., Gimeno C.J. 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 in Enzymology*, **186**, 521-530.
- Shigenaga M.K., Aboujaoude E.N., Chen Q., et Ames B.N., 1994, Assays of oxidative damage biomarkers 8-OHdG and 8-oxoguanine in nuclear DNA and biological fluids by HPLC with ED, *Methods in Enzymology*, **234**, 16-33.
- Shugart L., 1990, Biological monitoring : testing for genotoxicity, 217-227, In *Biomarkers of Environmental Contamination*, McCarthy J.F. et Shugart L.R. (Eds.), Lewis Publishers, Chelsea.
- Sies H., 1991, Oxidative stress: from basic research to clinical application, *American Journal of Medicine*, **91**, 31S-38S.
- Sims P., Grover P.L., Swaisland A., Pal K. et Hewer A., 1974, Metabolic activation of benzo[a]pyrene proceeds by a diol-epoxide, *Nature*, **252**, 326-328.
- Singh N.P., Danner D.B., Tice R.R., Brant L.J. et Schneider E.L., 1990, DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes, *Mutation Research*, **237**, 123-130.
- Singh N.P., Danner D.B., Tice R.R., McCoy M.T., Collins G.D. et Schneider E.L., 1989, Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm, *Experimental Cell Research*, **184**, 461-470.
- Singh N.P., Danner D.B., Tice R.R., Pearson J.D., Brant L.J., Morell C.H. et Schneider E.L., 1991 b, Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age, *Mutation Research*, **256**, 1-6.
- Singh N.P., Lai H. et Khan A., 1995, Ethanol-induced single strand breaks in rat brain cells, *Mutation Research*, **345**, 191-196.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. et Schneider E.L., 1988, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, **175**, 184-191.
- Singh N.P., Muller C.H. et Berger R.E., 2003, Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm, *Fertility and Sterility*, **80**(6), 1420-1430.
- Singh N.P., Tice R.R., Stephens R.E. et Schneider E.L., 1991 a, A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides, *Mutation Research*, **252**, 289-296.

- Sinsheimer J.E., Hooberman B.H., Das S.K., Savla P.M. et Ashe A.J., 1992, Genotoxicity of chryseno[4,5-bcd]thiophene and its sulfone derivative, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **19**(3), 259-264.
- Siu W.H.L., Cao J., Jack R.W., Wu R.S.S., Richardson B.J., Xu L. et Lam P.K.S., 2004, Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*), *Aquatic Toxicology*, **66**(4), 381-392.
- Slamenova D., Gabelova A., Ruzekova L., Chalupa I., Horvathova E., Farkasova T., Bozsakyova E. et Stetina R., 1997, Detection of MNNG-induced DNA lesions in mammalian cells ; validation of comet assay against DNA unwinding technique, alkaline elution of DNA and chromosomal aberrations, *Mutation Research*, **383**(3), 243-252.
- Snyder R.D. et Matheson D.W., 1985, Nick translation -- a new assay for monitoring DNA damage and repair in cultured human fibroblasts, *Environmental Mutagenesis*, **7**, 267-279.
- Solé M., Porte C., Biosca X., Mitchelmore C.L., Chipman J.K., Livingstone D.R. et Albaiges J., 1996, Effects of the "Aegean Sea" Oil Spill on biotransformation enzymes, oxydative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.), *Comparative Biochemistry and Physiology*, **113C**(2), 257-265.
- Speit G. et Hartmann A., 1995, The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay), *Mutagenesis*, **10**(6), 555-559.
- Stacey M., Stickley J., Fox P., Statler V., Schoenbach K., Beebe S.J. et Buescher S., 2003, Differential effects in cells exposed to ultra-short, high intensity electric fields: cell survival, DNA damage, and cell cycle analysis, *Mutation Research*, **542**(1-2), 65-75.
- Stahl W. et Sies H., 2002, Introduction : Reactive Oxygen species, *Research Monograph : Reactive Oxygen Species*, Institut für Physiologische Chemie I, Heinrich Heine Universität Düsseldorf, 2 p.
- Stegeman J.J. et, Lech J.J., 1991, Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species : carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure, *Environmental Health Perspectives*, **90**, 101-109.
- Steinert S. A., Streib Montee R. et Sastre M.P., 1998 b, Influence of sunlight on DNA damage in mussels exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Marine Environmental Research*, **46**(1-5), 355-358.
- Steinert S.A., 1996, Contribution of Apoptosis to observed DNA damage in mussel cells, *Marine Environmental Research*, **42**(1-4), 253-259.
- Steinert S.A., Streib-Montee R., Leather J.M. et Chadwick D.B., 1998 a, DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay, *Mutation Research*, **399**, 65-85.
- Sumathi M., Kalaiselvi K., Palanivel M., Rajaguru P., 2001, Genotoxicity of textile dye effluent on fish (*Cyprinus carpio*) measured using the comet assay, *Bulletin Of Environmental Contamination and Toxicology*, **66**(3), 407-414.
- Swenberg J.A., La D.K., Scheller N.A. et Wu K., 1995, Dose-response relationships for carcinogens, *Toxicology Letters*, **82-83**, 751-756.
- Système d'évaluation de la qualité de l'eau (SEQ EAU), 1997, Seuils de qualité pour les micropolluants organiques et minéraux dans les eaux superficielles, Synthèse, Agences de l'Eau et Ministère de l'Environnement, 19p.

- Taddei F., Scarcelli V., Frenzilli G. et Nigro M., 2001, Genotoxic hazard of pollutants in cetaceans : DNA damage and repair evaluated in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) by the comet assay, *Marine Pollution Bulletin*, **42**(4), 324-328.
- Takahashi M., Saka N., Takahashi H., Kanal Y., Schultz R.M. et Okano A., 1999, Assessment of DNA damage in individual hamster embryos by Comet assay, *Molecular Reproduction and Development*, **54**, 1-7.
- Tanzarella C., Degrassi F., Cristaldi M., Moreno S., Lascialfari A., Chiuchiarelli G. et Ieradi L.A., 2001, Genotoxic damage in free-living Algerian mouse (*Mus spretus*) after the Coto Doñana ecological disaster, *Environmental Pollution*, **115**(1), 43-48.
- Tiano L., Fedeli D., Sanstroni A.M., Villarini M., Engman L. et Falcioni G., 2000, Effect of three diaryl tellurides, and an organoselenium compound in trout erythrocytes exposed to oxidative stress *in vitro*, *Mutation Research*, **464**, 269-277.
- Tiano L., Fedeli D., Moretti M. et Falcioni G., 2001, DNA damage induced by organotin on trout-nucleated erythrocytes, *Applied Organometallic Chemistry*, **15**, 575-580.
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas S E., Ryu J.C et Sasaki Y.F., 2000, Single cell gel / Comet assay : guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **35**, 206-221.
- Tronczynski J., Moisan K., Munshy C., Truquet I., Dugrais L. et Guiot N., 2002, Etude des empreintes chimiques du fuel de l'Erika et caractérisation de la contamination par les HAPs dans le Golfe de Gascogne, *Actes du colloque SAFERSEAS : les leçons techniques de l'Erika et des autres accidents*, Brest, 13-16 march 2002, CEDRE, Brest, 15 p.
- Tsuda S., Matsusaka N., Madarame H., Miyamae Y., Ishida K., Satoh M., Sekihashi K. et Sasaki Y.F., 2000, The alkaline single cell electrophoresis assay with eight mouse organs: results with 22 mono-functional alkylating agents (including 9 dialkyl N-nitrosoamines) and 10 DNA crosslinkers, *Mutation Research*, **467**(1), 83-98.
- Tsurudome Y., Hirano T., Yamato H., Tanaka I., Sagai M., Hirano H., Nagata N., Itoh H. et Kasai H., 1999, Changes in levels of 8-hydroxyguanine in DNA, its repair and OGG1 mRNA in rat lungs after intratracheal administration of diesel exhaust particles, *Carcinogenesis*, **20**(8), 1573-1576.
- Ullrich O. et Grune T., 1997, Detection of 8-hydroxyguanosine in K562 human hematopoietic cells by high-performance capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography B*, **697**, 243-249.
- Vaghef H., Wisen A.C. et Hellman B., 1996, Demonstration of Benzo(a)pyrene-induced DNA damage in mice by alkaline single cell gel electrophoresis : evidence for strand breaks in liver but not in lymphocytes and bone marrow, *Pharmacology and Toxicology*, **78**, 37-43.
- van Delft J.H.M., Baan R.A. et Roza L.A., 1998, Biological Effect Markers for Exposure to Carcinogenic Compound and Their Relevance for Risk Assessment, *Critical Reviews in Toxicology*, **28**(5), 477-510.
- Van Goethem F., Lison D. et Kirsch-Volders, 1997, Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents : effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide, *Mutation Research*, **392**, 31-43.

- Vasseur P. et Cossu-Leguille C., 2003, Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety, *Environment International*, **28**, 711-717.
- Vasseur P., Garric J., Pihan J.C., Exinger A., Slommianny C. *et al.*, 1999, Validation d'indicateurs biologiques de la contamination des écosystèmes hydriques dulçaquicoles et de ses effets toxiques, Résumé de rapport de contrat, Programme PNETOX, EBSE, 16p.
- Venier P., Maron S. et Canova S., 1997, Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[a]pyrene, *Mutation Research*, **390**, 33-44.
- Verschaeve L. et Gilles J., 1995, Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils, *Bulletin Of Environmental Contamination and Toxicology*, **54**(1), 112-119.
- Villarini M., Moretti M., Damiani E., Greci E., Santroni A.M., Fedeli D. et Falcioni G., 1998, Detection of DNA damage in stressed trout nucleated erythrocytes using the comet assay : protection by nitroxide radicals, *Free Radical Biology & Medicine*, **24**(7-8), 1310-1315.
- von Sonntag, 1987, The Chemical Basis of Radiation Biology, Taylor et Francis, New York.
- Waldmann P., Pivcecic B., Müller W.E.G., Zahn R.K. et Kurelec B., 1995, Increased genotoxicity of acetylaminofluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism : studies with the fresh water clam *Corbicula fluminea*, *Mutation Research*, **342**, 113-123.
- Walker C.H., 1995, Biochemical biomarkers in ecotoxicology -- some recent developments, *The Science of The Total Environment*, **171**(1-3), 189-195.
- Wallace S.S., 2002, Biological consequences of free radical-damages DNA bases, *Free Radical Biology & Medicine*, **33**(1), 1-14.
- Watanabe M. et Susuki T., 2002, Involvement of reactive oxygen stress in cadmium-induced cellular damage in *Euglena gracilis*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Pharmacology and Toxicology*, **131**(4), 491-500.
- White P.A., Blaise C. et Rasmussen J.B., 1997, Detection of genotoxic substances in bivalve molluscs from the Saguenay Fjord (Canada), using the SOS chromotest, *Mutation Research*, **392**(3), 277-300.
- Wilson J.T., Pascoe P.L., Parry J.M. et Dixon D.R., 1998, Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (*Mollusca : Pelecypoda*), *Mutation Research*, **399**, 87-95.
- Witting PK, Upston JM et Stocker R., 1998, The molecular action of alpha-tocopherol in lipoprotein lipid peroxidation. Pro- and antioxidant activity of vitamin E in complex heterogeneous lipid emulsions, 345-390, In *Subcellular Biochemistry : Fat-Soluble Vitamins*, Quinn P.J. et Kagan V.E. (Eds), Plenum Press, London.
- Wojewodzka M., Kruszewzki M., Iwanensko T., Collins A.R. et Szumiel I., 1998 a, Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation I. Strand breakage, *Mutation Research*, **416**, 21-35.
- Wojewodzka M., Kruszewzki M., Iwanensko T., Collins A.R. et Szumiel I., 1998 b, Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation II. Base damage, *Mutation Research*, **416**, 37-57.

- Wojewodzka M., Zaim J., Van der Schans G. P., Kruszewski M. et Szumiel I., 1997, DNA repair in radioadapted human lymphocytes, *Mutation Research*, **379**(1), S57.
- 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**(30), 7024-7032.
- Woollons A., Clingen P.H., Price M.L., Arlett C.F. et Green M.H., 1997, Induction of mutagenic DNA damage in human fibroblasts after exposure to artificial tanning lamps, *The British Journal Of Dermatology*, **137**(5), 687-692.
- Wozniak K. et Blasiak J., 2003, *In vitro* genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA-protein cross-links, *Mutation Research*, **535**(2), 127-139.
- Yen G.W. et Liao C.M., 2002, Effects of Maillard reaction products on DNA damage in human cells and their possible mechanisms, *International Congress Series*, **1245**, 321-325.
- Yin B., Whyatt R.M., Perera F.P., Randall R.C., Cooper T. et Santella R.M., 1995, Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA. *Free Radical Biology & Medicine*, **18**, 1023-1032.
- Zakharov A., et Egorina N., 1968, Asynchrony of DNA replication and mitotic spiralization along heterochromatic portions of Chinese hamster chromosomes, *Chromosoma*, **23**, 365-385.
- Zang Y., Zhong Y., Luo Y. et Kong Z.M., 2000, Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*, *Environmental Pollution*, **108**(2), 271-278.
- Zilli L., Schiavone R., Zonno V., Storelli C., Vilella S., 2003, Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation, *Cryobiology*, **47**(3), 227-235.

ANNEXE I. : Tableau de synthèse des principaux domaines d'applications du test des comètes et références d'études s'y rapportant dans la littérature

DOMAINES D'APPLICATIONS	REFERENCES
Toxicologie génétique	<i>Choucroun et al., 2001</i> <i>Sasaki et al., 2000</i> <i>Anderson et al., 1998</i> <i>Marzin, 1999</i> <i>Speit et Hartmann, 1995</i> <i>Fahrig et al., 1998</i>
Mécanismes de réparation de l'ADN	<i>Bergqvist et al., 1998</i> <i>Bock et al., 1998</i> <i>Wojewodzka et al., 1997</i>
Cycle cellulaire et Apoptose	<i>Mustonen et al., 1999</i> <i>Roser et al., 2001</i> <i>Godard et al., 2002</i> <i>Stacey et al., 2003</i> <i>Singh et al., 2003</i>
Radicaux libres	<i>Anderson et al., 2003</i> <i>Guetens et al., 2001</i> <i>Yen et Liao, 2002</i> <i>Collins et al., 1996, 1997, 2004</i> <i>Cadet et al., 1999</i> <i>Gedik et al., 1998</i> <i>Griffiths et al., 2002</i>
Nutrition (régimes, compléments, additifs, antoxydants...)	<i>Pool-Zobel et al., 1997</i> <i>Chiu et al., 2000</i> <i>Azevedo et al., 2003</i>
Epidémiologie (expositions professionnelles, stérilité...)	<i>Lebailly et al., 1998</i> <i>Mc Kelvey-Martin et al., 1997</i> <i>Wojewodzka et al., 1998 a et b</i> <i>Kassie et al., 2000</i> <i>Kopjar et Garaj-Vrhovac, 2001</i> <i>Garaj-Vrhovac et Kopjar 2003</i> <i>Palus et al., 2003</i>
Recherche médicale et clinique (embryologie, pathologies : diabète, <i>Xeroderma pigmentosum</i> , oncologie, essais thérapeutiques...)	<i>Olive et al., 1996</i> <i>Takahashi et al., 1999</i> <i>Benhamou et Sarrasin, 2000</i> <i>Martin et al., 1999, 2000</i> <i>Berwick et Vineis, 2000</i> <i>Collet-Durel et al., 2004</i>
Ecotoxicologie	<i>Cotelle et Férard, 1999</i> <i>Mitchelmore et Chipman, 1998 a</i> <i>Lee et Steinert ; 2003</i>

ANNEXE II. : Applications du test des comètes pour l'étude des dommages à l'ADN avec des cellules de poissons marins et dulçaquicoles exposées au laboratoire, en conditions contrôlées *in vitro*

¹ analogue hydrophile de la vitamine E : acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxylique ; les facteurs de variations (x) sont donnés à titre indicatif car ils ont parfois été calculés sur les figures lors de l'absence des tableaux de données ; + : dommages à l'ADN significatifs ; - : absence de dommages à l'ADN significatifs ; ↗ : augmentation des dommages à l'ADN ; ↘ : diminution des dommages à l'ADN ; = équivalence des dommages à l'ADN ; > niveaux de dommages à l'ADN supérieurs ; < niveaux de dommages à l'ADN inférieurs ; 4-NQO : 4-nitroquinoline-N-oxide ; AAF : N-acétyl-2-aminofluorène ; NDMA : N-Nitrosodiméthylamine ; 1-NP : 1-nitropyrene ; ASB : albumine sérique bovine ; B(a)P : Benzo(a)pyrène ; CLM coélenteramine ; CLZn : coélenterazine ; DBT : dibutyl étain ; IAL : 1,2-dihydro-2-éthyl-2-phényl-3H-indole-3-phénylimino-1-oxyl ; MBT : monobutyl étain ; mCLM : méthyl-coélenteramine ; MMS : méthylméthane sulfonate ; MNNG : N-méthyl-N'-nitrosoguanidine ; MX : chloro-3 dichlorométhyl-4 hydroxy-5(5H)-furanone-2 ; NF : nitrofurantoïne ; QAL : 1,2-dihydro-2,2-diphényl-4-éthoxy-quinoline-1-oxyl ; TBT : tributyl étain ; TEMPO 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-oxyl ; BZ : benzocaïne ; tBOOH : tert-butyl hydroperoxide.

Organismes	Types cellulaires utilisés	Conditions expérimentales				Observations : dommages à l'ADN	Références	
		Agents (substances) testés		Gammes de concentrations testées et durée d'exposition				Expression des dommages
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (truite arc-en-ciel)	hépatocytes	H ₂ O ₂		0-53-132-265-2650 µM sur lames puis 0-3,35-6,63-13,25-53 µM (2 h à 4°C)		Tail moment Longueur de la queue % de comètes sur les lames	H ₂ O ₂ ➔ dès 53 µM soit en TM : x 2,8 x 3,8 x 4,8 et x 5,6 ou en % de comètes x 10 x 11,8 x 12,5 et x 12,5 H ₂ O ₂ ➔ dès 3,35 µM soit en % de comètes x 12 x 14 et x 20 B(a)P : en % de comètes 0,1 µM + à 4 h x 2 - à 24 h et + à 48 h x 1,65 1 µM + à 4 h x 2,5 + à 24 h x 1,2 et ➔ à 48 h x 0,87 10 µM + à 4 h x 3 + à 24 h x 2 et ➔ à 48 h x 0,4	Devaux <i>et al.</i> , 1997
		B(a)P		0-0,1-1-10 µM (4-24-48 h)			Extraits organiques de sédiments : en % de comètes 0,5 % + x 2 à 48 h et x 6,2 à 72 h 1 % + x 9,5 à 48 h et x 8 à 72 h	
		Extraits organiques de sédiments de rivières		0-0,5-1 % (72 h à 16°C)				
<i>Sparus aurata</i> (Daurade royale)	érythrocytes	TBT DBT MBT		0-10 µM 0-10 µM 0-10 µM (0-30 min à 27°C)		Longueur de la queue Tail Moment Intensité de fluorescence dans la queue	Classement des paramètres : Longueur de la queue > Tail Moment > Intensité de la queue à 0 min témoin = TBT = DBT < MBT (x 1,1) à 30 min témoin < MBT (x 1,1) < DBT (x 1,17) < TBT (x 1,25)	Gabbianelli <i>et al.</i> , 2002
<i>Dicentrarchus labrax</i> (bar, loup ou perche de mer)	érythrocytes	tBOOH	± Trolox C® ¹	0,5 mM	± 0-62,5-125-250-500 µM		tBOOH + x 4.5 Trolox C® ➔ dose dépendante des dommages dus au tBOOH x 2,9 x 2 x 1,8 et x 1,2	Janssens <i>et al.</i> , 2002 a
		tBOOH	± CLZn ou ± CLM ou ± mCLM ou ± Trolox C®	0,5 mM	± 10-20 µM ou ± 10-20 µM ou ± 10-20 µM ou ± 10-20 µM 5 min	% d'ADN dans la queue	tBOOH + x 3 mêmes effets pour 10 et 20 µM de chaque composé tBOOH + CLZn ➔ x 1,25 tBOOH seul tBOOH + CLM = tBOOH seul tBOOH + mCLM ➔ x 3,5 tBOOH seul tBOOH + Trolox C® = tBOOH seul	Janssens <i>et al.</i> , 2002 b
<i>Cyprinus carpio</i> (carpe commune)	érythrocytes	H ₂ O ₂ Extraits organiques de sédiments de Mer du Nord		0-1-10-100-1000 nM (10 min à 8°C) 0,2 à 50 mg/L (24 h à 8°C)		classement empirique	H ₂ O ₂ ➔ dès 10 nM Extraits organiques de sédiments ➔ entre 1 et 40 mg/L de x 1,4 à x 10	Kamman <i>et al.</i> , 2000
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (truite arc-en-ciel)	spermatozoïdes	Cryoconservation / décongélation		-		% de comètes	Effet de la cryoconservation du sperme : ➔ x 1,2	Labbé <i>et al.</i> , 2001
<i>Oreochromis niloticus</i> (Tilapia du Nil)	érythrocytes	BZ MMS H ₂ O ₂	± BZ	0-80-160-600 mg/L (10 min) 0-0,001-0,01-0, 1µM 0-2-10 µM (10 min à 37°C)		± 80 mg/L (5min à 4°C)	Tail Moment BZ = témoin MMS ➔ dès 0,01 µM x 2,6 puis x 11,7 MMS + BZ = MMS seul H ₂ O ₂ ➔ dès 2 µM x 3,1 puis x 6,6 H ₂ O ₂ + BZ = H ₂ O ₂ seul	de Miranda Cabral Gontijo <i>et al.</i> , 2003

										% d'ADN dans la queue = % d'ADN dans la tête = Tail Moment > longueur de la queue	
<i>Salmo trutta</i> (truite commune)	hépatocytes érythrocytes	H ₂ O ₂ MNNG MX B(a)P 1-NP NF	0-20-50-100-200 µM 0-1-10-25-50 µM 0-10-50-100-200 µM 0-10-50-100-200 µM 0-1-10-50-100 µM 0-10-50-100-500 µM (1 h à 25°C)			% d'ADN dans la queue % d'ADN dans la tête Tail Moment Longueur de la queue	Hépatocytes :		Mitchelmore et Chipman, 1998 b		
							Sang :				
										H ₂ O ₂ ⚡ dès 20 µM de x 1,8 à x 7,1 MNNG ⚡ dès 1 µM de x 1,8 à x 15,8 MX ⚡ dès 50 µM de x 6 à x 10 B(a)P ⚡ dès 50 µM x 2,8 x 2,8 et x 2,1 1-NP ⚡ dès 10 µM x 3,6 x 4,4 et x 4,6 NF ⚡ dès 50 µM de x 5,3 x 3,2 et x 11,1 H ₂ O ₂ ⚡ dès 100 µM x 5,1 puis x 12,8 MNNG ⚡ dès 10 µM de x 4,2 à x 15,8 MX ⚡ dès 10 µM de x 5,1 à x 15 B(a)P = témoin 1-NP = témoin NF = témoin	
<i>Salmo irideus</i> (truite arc-en ciel, souche native)	érythrocytes	-	-			% d'ADN dans la queue % d'ADN dans la tête Tail Moment Longueur de la queue	Séparation des cellules par gradient de densité ⚡ des dommages avec l'âge des cellules		Moretti <i>et al.</i> , 1998		
							les cellules les plus âgées sédimentent plus vite et expriment les plus fort taux de dommages à l'ADN + 110 % (accumulation des dommages oxydatifs)				
<i>Pleuronectes americanus</i> (Plie rouge)	érythrocytes	H ₂ O ₂ MNNG	0-1-10-100 µM 0-0,01-0,1 µM (15 min ± 4- 24 h de délai)			Longueur de la queue	Optimisation de l'essai Aux plus fortes doses x 6 pour les deux A 4 h encore x 2 pour > 1 µM H ₂ O ₂ A 24 h MNNG = témoin		Nacci <i>et al.</i> , 1996		
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (truite arc-en-ciel)	hépatocytes	Cd(II)	± TEMPO	0-1-2-10 µM	± 100 µM (3-24-48 h à 15°C)	Tail Moment	Cd + à 24 h dès 1 µM de x 1,2 à x 2,2 effet protecteur du TEMPO sauf à 10 µM Cd + à 48 h dès 1 µM x 2,33 x 2,9 et ⚡ x 2 effet protecteur du TEMPO mais + x 1,33 x 2,4 et x 2,1		Risso de Faverney <i>et al.</i> , 2001 (a)		
		Eaux de station d'épuration (entrée et sortie)	0-25-50-75-100 % (6-24-48-72 h à 15°C)			Tail moment	+ pour les 2 échantillons au maximum x 2 pour les 100 % à 6h Echantillons = témoin à 24 h pour toutes les dilutions sauf pour les 100% (encore x 1,3 à 72 h)		Risso de Faverney <i>et al.</i> , 2001 (b)		
<i>Brachydanio rerio</i> (poisson zèbre)	hépatocytes cellules branchiales	Eaux de l'Elbe et du Rhin (Allemagne) (± préincubation avec S9 (1h))	0-70 % 20 h			Longueur de la queue % d'ADN dans la queue Tail Moment	Classement des différents paramètres Longueur de la queue > Tail Moment > % ADN dans la queue + 100 % d'échantillons positifs avec la longueur de la queue		Schnurstein et Braunbeck, 2001		

<i>Brachydanio rerio</i> (poisson zèbre) <i>Oncorhynchus mykiss</i> (truite arc-en-ciel)	hépatocytes	4-NQO NF B(a)P NDMA AAF Eaux (Rhin et Elbe, Allemagne)	± préincubation avec S9	non communiqué (Synthèse de programme de recherche)	LOEC (low observed effect concentration)	Hépatocytes + NF (2,38 µg/L) et 4-NQO (1,9 µg/L) Hépatocytes + S9 + AAF (2,23 µg/L), NDMA (74 g/L) B(a)P (252 µg/L) et échantillons d'eaux (4 positif sur 34 testés)	Reifferscheid et Grummt, 2000
<i>Salmo irideus</i> (truite arc-en ciel, souche native)	érythrocytes	TBT DBT MBT		0-10 µM 0-10 µM 0-10 µM (tampon phosphate) 0-30 min à 27°C	Longueur de la queue Intensité de fluorescence	Longueur de la queue < intensité de fluorescence à t0 TBT = DBT = MBT = témoin à 30 min TBT (x 1,44) > DBT (x 1,2) > MBT = témoin	Tiano <i>et al.</i> , 2001
		Stress oxydatif (tampon isotonique pH 6,8)	± diaryl tellurides (3) ou ebselen	30 min à 35°C	Longueur de la queue Intensité de fluorescence de la queue Tail Moment	< 10 µM ↘ (effet antioxydant) > 10 µM 2 composés très génotoxiques 1 moyennement génotoxique ebselen faible effet protecteur	Tiano <i>et al.</i> , 2000
<i>Salmo irideus</i> (truite arc-en ciel, souche native)	érythrocytes	Stress oxydatif (tampon isotonique pH 6,8)	± CO ± IAL ± QAL ± Trolox®	0-30-60 min à 35°C	Longueur de la queue	à 0 min IAL (x 0,9) < CO = QAL < Trolox® (x 1,05) à 30 min IAL (x 0,9) < CO = QAL = Trolox® à 60 min Trolox® = CO (x 0,7) < IAL = QAL (x 0,6)	Villarini <i>et al.</i> , 1998
<i>Dicentrarchus labrax</i> (bar, loup ou perche de mer)	spermatozoïdes	Cryoconservation et décongélation	± ASB et Me ₂ SO	-	% d'ADN dans la queue Tail moment	En % ADN dans la queue Témoin < Préservé (x 1,16) < non protégé (x 2) En Tail moment Témoin < Préservé (x 1,3) < non protégé (6,25)	Zilli <i>et al.</i> , 2003

ANNEXE III. : Applications du test des comètes pour l'étude des dommages à l'ADN avec des cellules de poissons exposés au laboratoire, en conditions contrôlées, *in vivo*

Les facteurs de variations (x) sont donnés à titre indicatif car ils ont parfois été calculés sur les figures lors de l'absence des tableaux de données ; + : dommages à l'ADN significatifs ; - : absence de dommages à l'ADN significatifs ; ↗ : augmentation des dommages à l'ADN ; ↘ : diminution des dommages à l'ADN ; = équivalence des dommages à l'ADN ; > niveaux de dommages à l'ADN supérieurs ; < niveaux de dommages à l'ADN inférieurs ; // parallèle ; B(a)P : Benzo(a)pyrène ; EMS : éthylméthane sulfonate ; BZ : benzocaïne ; CP : cyclophosphamide ; HAPs : Hydrocarbures aromatiques polycycliques ; MMS : méthylméthane sulfonate ; PCB 77 : 3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle ; TCDD : 2,3,7,8-tétrachloro-p-dioxine ; 4-NQO : 4-nitroquinoline-N-oxide ; AAF : N-acétyl-2-aminofluorène ; NDMA : N-Nitrosodiméthylamine ; 1-NP : 1-nitropyrène ; NF : nitrofurantoïne.

Organismes	Types cellulaires utilisés	Conditions expérimentales			Observations (dommages à l'ADN)	Références
		Agents (substances) testés	Gammes de concentrations testées		Expression des dommages	
<i>Ictalurus punctatus</i> (poisson-chat) <i>Oncorhynchus mykiss</i> (truite arc-en-ciel)	leucocytes hépatocytes cellules rénales	Aflatoxine B1	0,5 mg/kg (intrapéritonéale) 4-24 h	Tail Moment	<i>I. punctatus</i> - pas d'effets <i>O. mykiss</i> + mais ≠ intertissulaires leucocytes ➤ à 4 h x 3,5 et ➤ à 24 h x 2,5 hépatocytes ➤ à 4 h x 3 et ➤ à 24 h x 8 rein ➤ à 4 h x 5 et ➤ à 24 h = témoins	Abd-Allah <i>et al.</i> , 1999
<i>Carassius auratus</i> (poisson rouge)	cellules rénales	Chocs thermiques	34-36-38° C 3 h ± 24 h de délai	Longueur de la queue	+ x 1,1 à 34° C x 1,12 à 36° C et x 1,3 à 38° C ➤ retour au niveau de base à + 24 h	Anitha <i>et al.</i> , 2000
<i>Scophthalmus maximus</i> (turbot)	érythrocytes cellules branchiales hépatocytes cellules rénales	EMS	50 mg/L (eau de mer filtrée) 3-7 jours à 15°C	Tail Moment	+ dans tous les tissus aux 2 temps développement du test effet sur les niveaux de bases : = dissociation dans PBS + β-naphtoflavone + cryogénisation (-196 °C) = conservation dans solution de lyse ± étape de neutralisation et fixation - voltage faible/temps long < + haut voltage/temps court <i>Variabilité interindividuelle et intraindividuelle importante</i>	Belpaeme <i>et al.</i> , 1998
<i>Salmo trutta fario</i> (truite fario)	érythrocytes	EMS (contrôle positif) PCB77	0-25-50-100-200 mg/L 0-343-397-429-780-918-1027 pg/mL (concentrations réelles) 3-9-14 jours à 11°C	Longueur de la queue	EMS 3 j + 50 mg/L x 4 EMS 9 j + 25 et 50 mg/L x 4,2 et x 4,4 EMS 14 j + 25 et 50 mg/L x 4,4 et x 7,5 PCB 77 = témoin	Belpaeme <i>et al.</i> , 1996
<i>Brachydanio rerio</i> (poisson zèbre)	hépatocytes cellules branchiales	MMS	0-0,8-80 µM 3 jours 4-8-12-18-24-48-72 h ± 24-72 h de délai	Longueur totale de la comète	à 0,8 µM MMS = témoin à 80 µM hépatocytes + dès 8h de x 2 à x 7 ➤ dès fin de l'exposition à +24 h x 6 et à +72h x 5 encore cellules branchiales + dès 8h x 4 en moyenne sur le temps ➤ dès fin de l'exposition : à +24 h x 3,75 et à +72h x 3 encore	Deventer, 1996
<i>Sparus aurata</i> (daurade royale)	érythrocytes	CuSO ₄	0-0,1 mg/L 14 jours à 12°C	Longueur de la queue Tail moment Intensité	+ x 1,1 en longueur de la queue ou x 1,41 en intensité de fluorescence de la queue ou x 1,5 en tail moment	Gabbianelli <i>et al.</i> , 2003
<i>Brachydanio rerio</i> (poisson zèbre)	Cellules larvaires (2 jours)	rayonnements γ	0-0,4-1,2-7,2 mGy/h 1-24 h	% d'ADN dans la queue	à 1 h ➤ à 0,4 mGy/h x 2,1 puis x 2,55 à 24 h ➤ à 1,2 mGy/h x 1,2 puis x 2,1	Jarvis et Knowles, 2003
<i>Oreochromis niloticus</i> (Tilapia du Nil)	érythrocytes	BZ MMS	80 mg/L 3 min 7,5 mg/L 24 h	Tail Moment	BZ = témoin MMS + x 16 MMS + BZ = MMS seul	de Miranda Cabral Gontijo <i>et al.</i> , 2003
<i>Pleuronectes americanus</i> (Plie rouge)	érythrocytes hépatocytes cellules intestinales	B(a)P	0-5-25 µg/kg (nourriture) ± 5 µg/kg (sédiment) 30 j	% d'ADN dans la queue	+ dans l'intestin 25 µg/kg (nourriture) + 25 % grande variabilité dans les témoins foie sang - niveaux de base - par sédiment	Nacci <i>et al.</i> , 1996

<i>Anguilla anguilla</i> (anguille européenne)	érythrocytes	B(a)P Aroclor 1254 TCDD β-naphtoflavone	0-0,1-1-10-50 mg/kg 0-0,1-1-10-20 mg/kg 0-0,01-0,1-1-2 µg/kg 0-0,1-1-10-50 mg/kg intrapéritonéale 7 j	% d'ADN dans la queue	B(a)P ➤ à 1 mg/kg x 2,8 x 2,6 x 3,9 Aroclor 1254 ➤ à 0,1 et 1 mg/kg x 2,5 et x 3,7 TCDD ➤ à 0,01 µg/kg x 3,8 x 4,35 x 3,4 x 3,9 β-naphtoflavone ➤ à 10 et 50 mg/kg x 3,7 et x 3,1	Nigro <i>et al.</i> , 2002
<i>Ameiurus nebulosus</i> (poisson-chat)	érythrocytes	CP	0-20-40-80 mg/kg 6-24-48-72 h 0-1,25-2,5-5-10-20 mg/kg 48 h intrapéritonéale	Ratio longueur / intensité	➤ dose dépendante de x 1,7 à x 3,3 ➤ des effets avec le temps	Pandurangi <i>et al.</i> , 1995
<i>Cyprinus carpio</i> (carpe commune)	érythrocytes hépatocytes cellules rénales	6 échantillons d'eaux de rivière (Noyval, Inde) CP (contrôle positif)	0-100 % 2 mg/L 24-48-72 h	Longueur de la queue intensité	Sang + sauf échantillon 1 (de x 1,2 à x 2,3) CP + x 2 en moyenne Rein + sauf échantillon 1 (de x 1,3 à x 2) CP + x 1,9 en moyenne Foie + sauf échantillon 1 (de x 1,1 à 2,1) CP x 1,9 en moyenne // aux résultats test comètes sédiments des mêmes sites avec ver de terre	Rajaguru <i>et al.</i> , 2003
<i>Brachydanio rerio</i> (poisson zèbre) <i>Oncorhynchus mykiss</i> (truite arc-en-ciel)	hépatocytes cellules branchiales	4-NQO NF B(a)P NDMA AAF	non communiqué (Synthèse de programme de recherche)	LOEC (low observed effect concentration)	Hépatocytes + NDMA (7,4 µg/L) et 4-NQO (9,5 µg/L) Branchies + 4-NQO (9,5 µg/L)	Reifferscheid et Grummt, 2000
<i>Pleurogythys verticalis</i> (turbot « tête de boule »)	érythrocytes hépatocytes	Sédiment d'affleurement de pétrole	0-33-66-100 % 7 j à 13.8 °C	Tail Moment % d'ADN dans la queue	Sang - jamais d'effet Foie : de x 1,1 à x 2,3 pour les ≠ % // concentrations en PAHs haut poids moléculaire dans le sédiment	Roy <i>et al.</i> , 2003 a
<i>Tilapia mossambica</i> (Tilapia du Mozambique)	érythrocytes	monocrotophos	0,313-0,625-1,25-1,875-2,5-3,125-3,75- 4,375 mg/kg oral 24-48-72-96 h à 26°C	Longueur de la queue	➤ à toutes les doses de x 1,55 à x 2,2 effet maximal à 24 h puis ➡ entre 48 et 72 h et = à 96 h	Saleha Banu <i>et al.</i> , 2001
<i>Cyprinus carpio</i> (carpe commune)	érythrocytes hépatocytes	Effluents d'usine textile CP (contrôle positif)	0-1-2-5-10 % 2mg/L 3-9-15-21-28 j	Ratio longueur / profondeur	Foie : ➤ dès 1 % dose-dépendante de 3 à 21 j (de x 1,1 à x 2,1) - à 28 j CP + x 1,1 en moyenne Sang : ➤ // au foie légèrement > et + à 28 j (de 1,1 à 2,5) CP + x 1,2 en moyenne	Sumathi <i>et al.</i> , 2001

ANNEXE IV. : Applications du test des comètes pour l'étude des dommages à l'ADN avec des cellules de poissons exposés *in situ*

Les facteurs de variations (x) sont donnés à titre indicatif car ils ont parfois été calculés sur les figures lors de l'absence des tableaux de données ; + : dommages à l'ADN significatifs ; - : absence de dommages à l'ADN significatifs ; ↗ : augmentation des dommages à l'ADN ; ↘ : diminution des dommages à l'ADN ; = équivalence des niveaux de dommages ; > niveaux de dommages supérieurs ; // parallèle ; ≠ différence ; Log : transformation logarithmique ; Fpg : Formamidopyrimidine glycosylase ; PAA : acide peracétique ; B(a)P : benzo(a)pyrène ; HAPs : hydrocarbures aromatiques polycycliques ; PCBs : polychlorobiphényles ; UK : Royaume Uni ; USA : Etats-Unis d'Amérique ; NaClO : hypochlorite de sodium ; ClO₂ : dioxyde de chlore.

Organismes	Types cellulaires utilisés	Localisation	Suivi/Exposition	Expression des résultats	Observations : dommages à l'ADN	Références
<i>Limanda limanda</i> (limande)	érythrocytes	4 sites en baie de Seine 2 sites en baie de Somme (France) <i>Pollution plus ou moins marquée</i>	Prélèvements (mars 2001)	% d'ADN dans la queue Olive Tail Moment	Données brutes : pas de ≠ Transformation des données (Log) : ≠ entre les sites mais variance interindividuelle (70%) > variance entre les sites (30 %) ≠ entre les stades adulte > juvénile comètes + Fpg : ➤ des dommages de +33 à + 119 %	Akcha <i>et al.</i> , 2003
<i>Pholis gunnellus</i> (gonnelle)	érythrocytes	2 sites non pollués en aval de l'estuaire 2 sites pollués en amont de l'estuaire (Firth of Forth, Ecosse, UK)	Prélèvements (pêche à pied)	% d'ADN dans la queue	Sites de référence = sites pollués malgré un gradient de pollution industrielle	Bombail <i>et al.</i> , 2001
<i>Paralichthys californicus</i> (Flétan californien)	érythrocytes	baies ou ports dans le sud de la Californie	Prélèvements (été 1998 et 1999) (filet)	Tail Moment	Sites californiens été 1998 : pas de ≠ mais variabilité d'un facteur x 5	Brown et Steinert, 2004
<i>Citharichthys sordidus</i> (Limande du pacifique)		Sites autour des « Channel Islands », Californie (USA)			Été 1999 : seulement 4 sites ont pu être évalués 1 site > aux autres (x 4) <i>Problèmes de conservation des échantillons</i>	
<i>Cyprinus carpio</i> (carpe commune)	érythrocytes (prélèvement non invasif)	Bassins expérimentaux dans la station de potabilisation des eaux du lac Trasimeno (Castiglione del Lago, Italie) Etude des effets génotoxiques de désinfectants NaClO : 1,25 mg/L ClO ₂ : 0,2 mg/L acide peracétique (PAA) : 1 mg/L	3 campagnes : automne hiver été prélèvements : à 0-3 h et 20 j	Tail Moment	≠ entre les campagnes dues à l'influence de la température de l'eau ➤ des dommages à l'ADN en été à 20 jours pour les 3 produits de x 1,5 à x 3,7 Autres campagnes : NaClO : + à 3 h x 1,6 en moyenne et + à 20 jours x 3,55 en hiver seulement ClO ₂ : + à 3 h x 1,4 en moyenne et - à 20 jours PAA : - à 3 h et + à 20 jours x 2 en hiver seulement	Buschini <i>et al.</i> , 2004
<i>Micropterus dolomieu</i> (black-bass à petite bouche)	érythrocytes	1 site de référence lac Umbagog 5 sites sur la rivière Androscoggin (Maine, USA)	Prélèvements	Aire de la comète	// au gradient de pollution amont-aval (équivalent PCBs et dioxines) : Lishon Falls (x 2,6) > Durham = Gulf Island = Riley Station (x 2,2) > Rumford (x 1,2) > référence	Chamberland <i>et al.</i> , 2002

<i>Leusiscus cephalus</i> (chevaine)	érythrocytes	1 site sur l'Ain (amont) (référence) 2 sites sur le Rhône (aval) (France)	2 campagnes : printemps automne (pêche électrique)	Tail Moment	Gradient de pollution amont-aval (pollutions industrielles) Rhône 1 : + (automne) x 7 Rhône 2 : + (printemps) x2,1 (automne) x 1,9 ➡ des dommages au bout de 2 mois chez juvénile en stabulation au laboratoire	Devaux <i>et al.</i> , 1998
<i>Leusiscus cephalus</i> (chevaine)	érythrocytes	2 sites de référence en Moselle amont 3 sites en Moselle aval (France)	2 campagnes été 1998 été 1999 (pêche électrique)	Tail Moment	≠ entre les campagnes + : 1 des 2 sites amont et 2 des 3 sites aval ➡ des dommages // ➡ des concentrations en B(a)P dans le sédiment	Flammarion <i>et al.</i> , 2002
<i>Leusiscus cephalus</i> (chevaine)	érythrocytes	1 site de référence sur la Drôme 1 site pollué sur la Turdine 1 site pollué sur le Rhône (France)	Prélèvements (été) (pêche électrique)	Tail Moment	Pollutions typées (teintureries, industries pétrochimiques). Turdine = Drôme < Rhône (x 1,3)	Larno <i>et al.</i> , 2001
<i>Ameiurus nebulosus</i> (poisson-chat)	érythrocytes	5 sites (rivière Détroit, Grands lacs) 3 sites (Grands lacs) et 1 ferme d'élevage (Canada)	-	Longueur totale profondeur	+ : 5 des sites (dont 2 sur lacs et 3 sur rivières) ➡ entre x 3 et x 3,4 ➡ des dommages au bout de 3 mois de stabulation au laboratoire	Pandrangi <i>et al.</i> , 1995
<i>Cyprinus carpio</i> (carpe)						
<i>Ganbusia Holbrooki</i> (poisson moustique)	érythrocytes	site de référence : Réserve naturelle des Astronies 1 site pollué sur la rivière Sarno (Italie)	Prélèvements (avril 2001)	Longueur de la queue	Site pollué > site de référence (x 3,4) ➡ des dommages au bout de 100 j de stabulation au laboratoire	Russo <i>et al.</i> , 2004
<i>Pleuronectes verticalis</i> (turbot « tête de boule »)						
<i>Pleuronectes vetulus</i> (sole anglaise)	hépatocytes	2 sites de référence 9 stations autour de points de déversement d'égouts (Orange County, Californie, USA)	Prélèvement (2000)	Tail moment % d'ADN dans la queue Intensité de fluorescence	= sur tous les sites	Roy <i>et al.</i> , 2003 b
<i>Hippoglossina stomata</i> (sole bigmouth)						

ANNEXE V. : Travaux rapportés dans la littérature d'étude des dommages à l'ADN, par le test des comètes, chez des organismes aquatiques exposés *in situ* ou au laboratoire, en conditions contrôlées, à des substances organiques et minérales et à des rayonnements

¹ matière active : atrazine ; ² matière active : métalochlore ; ³ matière active : glyphosate ; ⁴ matière active : métribuzine ; ⁵ matière active : 2,4-D ; ⁶ low observed effect concentration ; les facteurs de variations (x) sont donnés à titre indicatif car ils ont parfois été calculés sur les figures lors de l'absence des tableaux de données ; + : dommages à l'ADN significatifs ; - : absence de dommages à l'ADN significatifs ; † : mort des individus ; ↗ : augmentation des dommages à l'ADN ; ↘ : diminution des dommages à l'ADN ; = équivalence des dommages à l'ADN ; > niveaux de dommages à l'ADN supérieurs ; 4-NQO : 4-nitroquinoline-*N*-oxide ; AAF : *N*-acétyl-2-aminofluorène ; T : température ; CEP : champ électromagnétique pulsé : 8,8 GHz pulsation 180 ns pic de 65 kW fréquence de 50 Hz ; EMS : éthyméthane sulfonate ; MMS : méthylméthane sulfonate ; B(a)P : Benzo(a)pyrène ; MNNG : *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine ; NDMA : *N*-nitrosodiméthylamine ; NF : nitrofurantoïne ; MNQ : 2-méthyl-1,4-naphthoquinone

Organismes		Conditions expérimentales				Expression des résultats	Observations : dommages à l'ADN	Références
		Type cellulaire	Agents (substances) testés	Type et durée d'exposition	Gammes de concentrations (valeurs) testées			
Cétacés	Grand dauphin <i>Tursiops truncatus</i>	érythrocytes	CH ₃ Hg	<i>in vitro</i> 1 h à 37° C	0-1-2-4-8 µg/L	Longueur de la comète	↗ dès 1 µg/ L x 1,3 x 1,35 x 1,4 et x 1,6	Betti et Nigro, 1996
			H ₂ O ₂ Aroclor 1254 CH ₃ Hg	<i>in vitro</i> 1 h à 37° C	0-50-100-150-200 µM 0-0,02-0,1-0,5-2,5-12,5 µg/mL 4 µg/L (± 0-30-60 min de délai)	Longueur de la queue	H ₂ O ₂ ↗ dès 50 µM x 1,2 x 1,4 x 2 et ↘ à 200 µM x 1,4 Aroclor 1254 + x 1,25 en moyenne pour toutes les doses CH ₃ Hg + x 1,5 réparation complète en 30 min	Taddei <i>et al.</i> , 2001
	Grenouille taureau : <i>Rana catesbeiana</i>	Aatrex 9.0® ¹ Dual 960-E® ²	<i>in vivo</i> 24 h stade larvaire	0-4,813-19,25-77-3008 mg/L 0-0,272-1,086-4,344-17,376 mg/L 0-1,687-6,75-27-108 mg/L 0-13,375-53,5-214-856 mg/L 0-4,063-16,25-65-260 mg/L 0-3,125 mg/L		Classement selon la génotoxicité : Roundup® > Dual 960-E® > Aatrex 9.0® > Sencor 500F® > Amsol® = témoin Aatrex 9.0® ↗ dès 4,813 mg/L x 1,4 x 1,4 et x 1,6 et † à 308 mg/L Dual 960-E® ↗ dès 0,272 mg/L x 1,2 x 1,3 et x 1,6 et † à 17,376 mg/L Roundup® ↗ dès 6,75 mg/L x 1,2 x 1,4 et † à 108 mg/L Sencor 500F® ↗ dès 13,375 mg/L x 1,07 x 1,08 x 1,08 et † à 856 mg/L Amsol® = témoin mais † à 260 mg/L MMS + x 1,6 en moyenne	Clements <i>et al.</i> , 1997	
		Roundup® ³ Sencor 500F® ⁴ Amsol® ⁵ MMS						
Amphibiens	Grenouille verte indienne : <i>Rana hexadactyla</i>		EMS Teintures (sulfures) : <i>Sandopel Basic Black</i> ® <i>Negrosine</i> ® <i>Dermapel Black</i> ® <i>Turquoise blue</i> ®	<i>in vivo</i> 24 h stade larvaire (± 24-48-72 h de délai)	0-5,85 mg/L 0-10-12-17-25 mg/L 0-40-75-150-300 mg/L 0-150-200-300-600 mg/L 0-40-75-150-300 mg/L	Ratio longueur de la queue : profondeur	<i>Sandopel Basic Black</i> ® ↗ dès 10 mg/L de x 1,5 à x 4,7 réparation complète à + 48 h <i>Negrosine</i> ® ↗ dès 75 mg/L de x 2 à x 4 réparation complète à + 48 h <i>Dermapel Black</i> ® ↗ dès 150 mg/L de x 1,6 à x 4,75 réparation complète à + 48 h <i>Turquoise blue</i> ® ↗ dès 75 mg/L de x 2 à x 4,1 réparation complète à + 48 h EMS + x 2,3 réparation complète à + 24 h	Rajaguru <i>et al.</i> , 2001
	Grenouille verte : <i>Rana clamitans</i>	érythrocytes	MMS	<i>in vivo</i> 24 h stades larvaires	0-1,56-3,125-6,25 mg/L		<i>Stade I</i> ↗ dès 1,56 mg/L x 2,1 x 1,4 et x 4,2 <i>Stade II-III</i> ↗ dès 1,56 mg/L x 2,4 x 4,5 et x 7,5 <i>Stade X-XVIII</i> ↗ dès 1,56 mg/L x 3,7 x 7,5 et x 11,5 <i>Stade XXII-XXIII</i> - MMS = témoin	
	<i>Rana clamitans</i> Grenouille léopard : <i>Rana pipiens</i>	-	-	<i>in situ</i> stade larvaire	-		18 sites (Canada), étangs et petites étendues d'eaux, pollutions industrielles et agricoles, populations autochtones sites régions industrielles (de x 1,6 à x 2) > sites régions cultures (de x 1,1 à 1,5) > sites régions élevage (prairies)	Ralph et Petras, 1997
	Grenouille verte : <i>Rana clamitans</i> Crapaud d'Amérique : <i>Bufo americanus</i>	-	-	<i>in situ</i> stade larvaire 7-11 j	-		11 sites dans l'Ontario (Canada), lacs et rivières pollutions industrielles, domestiques et agricoles, étude de transfert (encagement) sensibilité : <i>R. clamitans</i> > <i>B. americanus</i> + sur 6 sites ↗ de x 1,22 à x 1,85 et - 5 sites = témoin laboratoire	Ralph et Petras, 1998 b
			MMS	<i>in vivo</i> 24 h stades larvaires	0-0,39-0,78-1,56-3,125-6,25-12,5-25-50 mg/L 0-6,25 mg/L (± 0-12-24-36-42-48-54 h de délai)		Stabulation au laboratoire 4 mois ↘ des niveaux de base de x -1,4 à x - 2,1 MMS ↗ dès 0,78 mg/L de x 1,2 à x 2,4 mais † à 25 et 50 mg/L MMS 6,25 mg/L ↗ jusqu'à +42 h de x 2 à 2,6 puis ↘ à partir de + 54 h mais x 2,4 encore	Ralph <i>et al.</i> , 1996
		Dactylère du cap : <i>Xenopus laevis</i>		T CEP rayons γ	<i>In vitro</i> 40 min 25 °C <i>Adulte</i>	20-25-30 °C - 0-50-100-200 cGy	% d'ADN dans la queue	CEP + x 2 mais ↗ due à ↗ de la température de 25° à 30° C consécutive au CEP ↗ dès 100 cGy x 4 et x 6,8

Crustacés	Crevette : <i>Paleomonetes pugio</i>	Cellules embryonnaires à différents stades de développement	B(a)P Cr (VI) H ₂ O ₂	<i>in vivo</i>	0-37,5-75-225 nM (2 h) 0-0,5-1-2-5-10 µM (4 h) 0-8,8-17,7-44,2 µM (2 h)	± 2-8- 20-24 h de délai	% d'ADN dans la queue	B(a)P(stade IV) + à 225 nM x 1,2 réparation incomplète à + 24 h B(a)P(stade VIII) ⚡ dès 37,5 nM x 1,1 x 5 et x 8 réparation complète à + 8 h Cr (VI) (stade IV) = témoin ⚡ entre +2 et +8 h réparation complète à + 20 h et Cr (VI) (stade VIII) + à 0,5 µM x 2 et à 2 µM x 1,7 réparation incomplète à + 24 h H ₂ O ₂ (stade IV) + à 44,2 µM x 10 réparation incomplète à + 20 h et H ₂ O ₂ (stade VIII) ⚡ dès 8,8 µM de x 10 à x 38 réparation complète à + 8 h Test comètes + endonucléases ⚡ de + 34 % à + 1800 % par rapport à test comètes classique Classement selon dommages oxydatifs : H ₂ O ₂ > Cr (VI) > B(a)P	Hook et Lee, 2004
			MNQ 4-NQO	<i>in vivo</i> 24 h à 28° C	0-1-2-3-4-5 µM 0-1-5-10-20-50 µM			MNQ (stade IV) = témoin MNQ (stade VIII) ⚡ dès 5 µM x 5 x 12,5 x 14 et x 22 4-NQO (stade VIII) ⚡ dès 2 µM x 3 x 3 x 3,1 et x 3,8	Kim et Lee, 2004
			Anthracène Bleu de méthylène α-terthiényl Pyrène	stade VIII <i>in vivo</i> 3 h (obscurité) ± 1 h lumière ± 2-3-24 h obscurité	0-3 µg/L 0-1000 µg/L 0-50 µg/L 0-10 µg/L		Tail Moment	Anthracène + après exposition lumière sans retour à l'obscurité x 8,2 Bleu de méthylène = témoin dans tous les cas α-terthiényl + après exposition lumière sans retour à l'obscurité x 8,6 Lumière seul x 4,8 Pyrène + après + 1h exposition à la lumière x 16,7 + après exposition + 1h à la lumière et + 2h à l'obscurité x 16,3 + après exposition + 1h à la lumière et + 3h à l'obscurité x 23,2 et - après exposition + 1h à la lumière et + 24h à l'obscurité	Lee et Kim, 2002
			CrCl ₃ CrNa ₂ O ₄ Hg ₂ Cl ₂ MNQ	<i>in vivo</i> 24 h à 28° C	0-1000 µg/L 0-1000 µg/L 0-1-10 µg/L 0-86-172-430 µg/L			CrCl ₃ (stade VII) + x 20,8 CrNa ₂ O ₄ (stade VII) + x 13,4 Hg ₂ Cl ₂ (stade VII) ⚡ dès 1 µg/L x 10,8 et x 25,6 MNQ (stade VII) ⚡ dès 86 µg/L x 2,2 x 8,8 et x 23 MNQ (stade IV) ⚡ dès 86 µg/L x 2,2 et x 5,7 (non testé à 430 µg/L)	Lee et al., 2000
Annélides polychètes	Ver de sable : <i>Nereis virens</i>	coélomocytes	B(a)P EMS	<i>in vivo</i> injection 1 h	0-0,3-0,6-10-20-35-45 mg/mL 12,1 mg/mL (0,25-0,5-1-2-3-7-15-25- 30-46 h)		longueur de la queue Tail Moment	B(a)P + à 45 mg/L x 2 en longueur de la queue et x 3 en Tail Moment EMS + dès 30 min et maximum à 1 h après injection x 2,6	De Boeck et Kirsh- Volders, 1997
Plathelminthes	Planaire dulçaquicole : <i>Dugesia schubarti</i>	suspension cellulaire de l'organisme entier	CuSO ₄ MMS ± CuSO ₄	2 h 7 j <i>in vivo</i> 2 h	0-10-20-30-40-50 µM 0-10-25-50-100 µM 0-40-80-160 µM ± 0-20 µM (2h) 0-80 µM ± 0-20 µM (2-4-24 h)		longueur de la queue	CuSO ₄ 2 h ⚡ dès 30 µM x 1,75 x 2,2 et x 3,25 CuSO ₄ 7 j + à 25 µM x 2, 4 et à 50 µM x 2,3 et - à 100 µM MMS ⚡ dès 40 µM x 2,7 x 3,75 et x 5 pas d'effet apparent du cuivre sur la réparation MMS 80 µM + CuSO ₄ à + 2 h retard dans la réparation ensuite =	Guecheva et al., 2001
Tuniciers	Ascidie botrylle : <i>Botryllus schlosseri</i>	Cellules circulantes	H ₂ O ₂	<i>in vitro</i> 2 h	0-53-130-2650 µM		% de comètes longueur de la queue	+ x 4, 2 dès 53 µM en % de comètes + x 1,2 en moyenne mais seulement dès 130 µM	Kamer et Rinkevich, 2002
Protozoaires	Amibe : <i>Acanthamoeba castellanii</i>	-	4-NQO, NF, B(a)P, NDMA, AAF, Eaux	non communiqué (Synthèse de programme de recherche)			LOEC ⁶	+ 4-NQO (10 µg/L), NF (1 µg/L) et NDMA (10 µg/L) et échantillons d'eaux du Rhin et de l'Elbe (Allemagne) (13 positifs sur 34 testés) - B(a)P et AAF	Reifferschemid et Grummt, 2000

ANNEXE VI. : Travaux rapportés dans la littérature d'études des dommages à l'ADN, par le test des comètes, chez des algues unicellulaires aquatiques exposées au laboratoire, en conditions contrôlées, à des substances organiques et minérales, ou à des rayonnements

Les facteurs de variations (x) sont donnés à titre indicatif car ils ont parfois été calculés sur les figures lors de l'absence des tableaux de données ; + : dommages à l'ADN significatifs ; - : absence de dommages à l'ADN significatifs ; ↗ : augmentation des dommages à l'ADN ; ↘ : diminution des dommages à l'ADN ; = équivalence des niveaux de dommages ; 4-NQO : 4-nitroquinoline-*N*-oxide ; AAF : *N*-acétyl-2-aminofluorène ; B(a)P : Benzo(a)pyrène ; MNNG : *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine ; NDMA : *N*-nitrosodiméthylamine ; NF : nitrofurantoïne ; ROS : espèces réactives de l'oxygène

Organismes	Conditions expérimentales				Expression des résultats	Observations : dommages à l'ADN	Références	
	Agents (substances) testés		Durée d'exposition	Gammes de concentrations (valeurs) testées				
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	4-NQO NDMA H ₂ O ₂ (± lumière)		2 h à 18° C	0-5-25-50-100 nM 0-0,014-0,14-1,4-14-140 mM 0-0,25-0,5-0,75-1 mM	Tail Moment (TM) % ADN dans la tête Longueur de la queue	4-NQO ➤ dès 5 nM x 1,25 x 2 x 3,75 et x 4 NDMA ➤ dès 0,014 mM x 2 x 2,15 x 2,9 x 3,2 et x 4,2 H ₂ O ₂ ➤ dès 0,25 mM de x 1,25 à x 3 et H ₂ O ₂ + lumière ➤ de 66 % par rapport à H ₂ O ₂ seul	Erbes <i>et al.</i> , 1997	
	4-NQO NF B(a)P NDMA AAF Eaux (Rhin et Elbe, Allemagne)		-	non communiqué (Synthèse de programme de recherche)	LOEC (low observed effect concentration)	+ : 4-NQO (1 µg/L), NF (5 µg/L) et NDMA (1 µg/L) et échantillons d'eaux (10 positifs sur 34 testés) - : B(a)P et AAF	Reifferscheid et Grummt, 2000	
<i>Euglena gracilis</i>	MNNG rayonnements γ		2 h à 20° C 20 min	0-0,5-1-5-10-50 µM 5 Gy	± 1 à 16 h de délai	MNNG ➤ à partir de 5 µM de x 5 à x 7 (TM) mais ➤ dès 0,5 µM (longueur) soit de x 1,2 à x 2,1 Jamais de relation effet-dose et réparation complète en 1 h à 5 µM		
	B(a)P		2 h à 20° C	0-0,5-1-5-10-50 µM (± S9)		Tail Moment (TM) Longueur de la queue	rayons γ + x 2 et réparation complète en 1 h B(a)P ➤ à partir de 5 µM x 1,2 et x 1,75 (TM) B(a)P+ S9 ➤ à partir de 5 µM x 2,8 et x 3,4 (TM) mais ➤ dès 1 µM (longueur) soit x 1,3 x 1,4 et x 1,9 (par rapport aux témoins) - mitomycine C et actinomycine D	Aoyama <i>et al.</i> , 2003
	mitomycine C actinomycine D		3 h à 20° C 2 h à 20° C	0-0,5-1-5-10-50 µM 0-0,5-1-5-10-50 µM				
<i>Rhodomonas sp.</i>	CdCl ₂		1 h	0-100 µM		Longueur de la queue	+ x 5 (implication des ROS)	Watanabe et Susuki, 2002
	Lumière visible	± UVA ± UVB	3-6-9-12 h	7,12 10 ⁻⁴ W/cm ²	9,47 10 ⁻⁵ W/cm ² 3,89 10 ⁻⁶ W/cm ²	Tail Moment (TM) Longueur de la queue Olive Tail Moment	Développement du test des comètes avec la T4 endonucléase V / paramètre le plus discriminant = longueur de la queue Visible – et = sur le temps Visible + UVA + x 2 mais = sur le temps Visible + UVA + UVB + x 5 mais ➤ avec le temps H ₂ O ₂ ➤ dès 10 µM de x 1,8 à x 5 Avec T4 endonucléase V Visible + UVA + UVB : + 200 % de dommages	Sastre <i>et al.</i> , 2001
	H ₂ O ₂		30-60 min	0-10-25-50-100 µM				

ANNEXE VII. : Protocole de l'IRH pour la quantification des HAPs dans les tissus des moules et des rats

La quantification des teneurs en HAPs des différents tissus animaux est réalisée en 4 étapes :

- pré-traitement des échantillons,
- extraction des HAPs par solvant dans un extracteur ASE,
- traitement de l'extrait,
- quantification des HAPs dans les extraits obtenus par HPLC.

Préparation des échantillons

Les différents tissus sont séchés à l'étuve à 40°C¹ jusqu'à masse constante (environ 2 à 7 jours suivant l'humidité initiale des échantillons) avant d'être broyés finement (broyeur à couteaux).

Extraction des HAPs

L'extraction des HAPs a été réalisée par un extracteur de type ASE (Accelerated Solvent Extractor 200, DIONEX) permettant une extraction solide/liquide à chaud et sous pression (solvant d'extraction dichlorométhane/hexane 50/50), sur une masse d'échantillon comprise entre 0,7 et 1,6 g suivant la quantité de tissu disponible.

Préparation de l'extrait

L'extrait obtenu est évaporé sous un faible courant d'azote avant d'être repris dans de l'acétonitrile. Cette phase d'évaporation entraîne des pertes variables pour les HAPs de masse moléculaires les plus faibles (naphtalène, acénaphthylène et acénaphène).

Analyse des HAPs

La séparation et la détection des HAPs sont réalisées par chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à un spectrofluorimètre et un détecteur UV/barrette de diodes. Les chromatogrammes obtenus sont ensuite intégrés manuellement en hauteur et quantifiés par rapport à 5 étalons dans la gamme de linéarité des détecteurs. Les résultats obtenus peuvent être présentés en détaillant les 16 HAP identifiés ou en regroupant les 16 HAPs sous forme de leur somme.

¹ Le séchage est limité à 40°C afin de limiter la perte des polluants volatiles.

ANNEXE VIII. : Analyse physico-chimique des sédiments du site de référence de la Maxe.

CONTAMINANTS	Unité	Concentrations dans les sédiments
<u>METAUX</u>		
	mg/kg m.s.	
Cadmium		<0,01
Chrome		12,0
Cuivre		5,0
Nickel		7,0
Plomb		6,0
Zinc		19,0
Etain		<0,1
<u>HAPs</u>		
	µg/kg m.s.	
Fluoranthène		10,0
Benzo(b)fluoranthène		4,0
Benzo(k)fluoranthène		< 3
Benzo(a)pyrène		3
Benzo(ghi)perylène		<10
Indeno(1,2,3-cd)pyrène		13,0
<u>PCBs</u>		
	µg/kg m.s.	
PCB 28		< 5
PCB 52		9,0
PCB 101		< 5
PCB 118		< 5
PCB 138		< 5
PCB 153		< 5
PCB 180		< 5
<u>Pesticides organochlorés</u>		
	µg/kg m.s.	
Hexachlorobutadiène		< 5
Hexachlorobenzène		< 5
Aldrine		< 5
Diéldrine		< 5
o,p-DDD		< 5
p,p-DDD		< 5
o,p-DDE		< 5
o,p-DDT		< 5
p,p-DDT		< 5
<u>Chlorobenzènes</u>		
	µg/kg m.s.	
1,2-dichlorobenzène		< 5
1,3-dichlorobenzène		< 5
1,4-dichlorobenzène		< 5
1,2,3-trichlorobenzène		< 5
1,2,4-trichlorobenzène		< 5
1,2,5-trichlorobenzène		< 5

(PCB : polychlorobiphényl ; HAPs : hydrocarbures aromatiques polycycliques ; m.s. : matière sèche)

ANNEXE IX. : Composition du tampon PBS (Phosphate buffered saline) sans Ca^{++} ni Mg^{++}

Pour un litre de tampon à 0,01 M, dissoudre successivement les sels suivants dans de l'eau ultrapure stérile :

- | | |
|--|---------|
| • Chlorure de sodium (NaCl) | 8 g |
| • Chlorure de potassium (KCl) | 200 mg |
| • Monohydrogénophosphate de sodium anhydre (Na_2HPO_4) | 1150 mg |
| • Phosphate de potassium anhydre (KH_2PO_4) | 200 mg |

Vérifier que le pH du tampon avoisine 7,4.
Conserver à température ambiante.

ANNEXE X. : Références des produits et du matériel et Composition des différents tampons et solutions-mères utilisés pour le test de comètes.

Références des produits chimiques et du matériel utilisés.

-Agarose normal	018052	Eurobio
-Agarose LMP (Low Melting Point ou bas point de fusion)	018055	Eurobio
-HCl 36%	20 252-290	Prolabo
-NaCl	20 810.364	Prolabo
-Na ₂ EDTA	20 302.236	Prolabo
-Na ₂ HPO ₄	1.06580.0500	Merck
-NaOH	28 245.298	Prolabo
-KCl	1.04936.0500	Merck
-KH ₂ PO ₄	28 245.298	Prolabo
-N-laurylsarcosinate (C ₁₅ H ₂₈ NO ₃ Na)	L 9150	Sigma
-TRITON X100 (<i>t</i> -octylphénoxy polyéthoxy éthanol)	H 0421	Sigma
-TRIS (Tris(hydroxyméthyl)-aminoéthane C ₄ H ₁₁ NO ₃)	26-128-3034B	Euromedex
-DMSO (diméthyl sulfoxyde ((CH ₃) ₂ SO))	23 500.297	Prolabo
-Ethanol absolu (C ₂ H ₅ OH)	20 821.296	Prolabo
-BeT (Bromure d'éthidium)	17588	Eurobio
-Lames lavées, dégraissées, bords rodés 76 x 22	05 633.933	Prolabo
-Lamelles 24 x 50	05 642.284	Prolabo
-Polystat I	33194	Bioblock Scientific
-Cuve d'électrophorèse	BM 200	Boehringer-Ingelheim
-Générateur	PowerPac 200	Bio-rad
-Microscope à épifluorescence	BX60	Olympus
-Caméra CDD monochrome		Hitachi
-Analyseur d'image	Komet 3 :1	Kinetic Imaging Limited
-cuves en porcelaine pour bain de lames, micropipettes (P20, P200 et P1000 Pipetman), verrerie (pipettes, fioles, béchers...) courante de laboratoire.		

Solution de lyse

Pour un litre de solution de lyse :

2,5 M	NaCl	146,1 g
100 mM	Na ₂ EDTA	37,2 g
10 mM	Tris	1,2 g
Ajuster le pH à 10 avec des sels de soude		
1%	N-lauryl sarcosinate	10 g

Ajuster à 890 mL avec de l'eau ultrapure et stérile. Conserver à température ambiante 1 mois. Mettre 30 minutes à 4°C avant l'étape de lyse. Extemporaneément ajouter 1% de Triton X100 et 10% de DMSO. (soit 1 mL de Triton et 10 mL de DMSO dans 89 mL de la solution précédente.).

Tampon d'électrophorèse (300 mM NaOH / 1 mM Na₂EDTA)

Préparer des solutions-stocks :

S ₁ :	10 N	NaOH	200 g	dans 500 mL d'eau ultrapure
S ₂ :	200 mM	Na ₂ EDTA	14,89 g	dans 250 mL d'eau ultrapure (pH 10)

Conserver à température ambiante au maximum 15 jours. Pour du tampon 1X, extemporaneément mélanger 30 mL de S₁ et 5 mL de S₂. Ajuster le volume à 1 litre avec de l'eau ultrapure. Bien homogénéiser.

Tampon de neutralisation

Préparer un tampon Tris (0,4 M) à pH 7,5. Pour cela, dissoudre 48,5 g de Tris dans 1 litre d'eau ultrapure et ajuster le pH à 7,5 avec de l'acide chlorhydrique HCl 36%. Conserver à température ambiante.

ANNEXE XI. : Composition de l'eau reconstituée utilisée dans les expositions *in vivo* des bivalves dulçaquicoles

Pour un litre d'eau reconstituée, ajouter successivement les solutions suivantes :

- 12,5 mL d'une solution à 9,86 g/L de $\text{MgSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$
- 12,5 mL d'une solution à 23,5 g/L de $\text{CaCl}_2, 2 \text{ H}_2\text{O}$
- 12,5 mL d'une solution à 5,18 g/L de $\text{NaHCO}_3, 7 \text{ H}_2\text{O}$
- 12,5 mL d'une solution à 0,46 g/L de KCl

Compléter à un litre avec de l'eau déminéralisée. Vérifier que le pH avoisine 7,5 et laisser sous aération continue (bullage) pendant 24 heures (au minimum) à température ambiante.

RESUME :

L'objectif général de ce travail était l'étude de l'intérêt du test des comètes en génotoxicité environnementale. Dans le contexte de la marée noire de l'Erika et de celui plus large des hydrocarbures aromatiques polycycliques, nous avons étudié, à l'aide du test des comètes, les dommages à l'ADN, chez des mammifères (rats) contaminés par la voie alimentaire dans un premier temps, puis chez un invertébré d'eau douce, *Unio tumidus*, suite à des expositions au benzo(a)pyrène et au fer ferrique *in vivo*, en conditions contrôlées au laboratoire.

Les études avec les rats montrent l'apparition de dommages à l'ADN principalement dans le foie, chez les animaux nourris par des moules fortement contaminées suite à une marée noire et permettent d'établir le transfert des hydrocarbures aromatiques polycycliques, des moules vers le consommateur. Des effets sont également observés à un degré moindre dans les cellules de moelle osseuse. Les résultats d'une étude sur la réversibilité des dommages à l'ADN montrent que les dommages mis en évidence sont transitoires, avec une réparation complète en deux semaines dans tous les cas.

Dans la deuxième partie relative à l'étude de deux marqueurs de génotoxicité chez le bivalve *Unio tumidus*, les réponses observées étaient dues à la toxicité du benzo(a)pyrène et les cassures de la molécule d'ADN mesurées par le test des comètes ne sont pas apparues comme le paramètre le plus sensible, comparées à la mesure des lésions d'oxydation.

Globalement, nos résultats soulignent que le test des comètes est adapté à l'étude de la génotoxicité environnementale et permet l'évaluation de la biodisponibilité de composés génotoxiques dans des échantillons environnementaux.

ABSTRACT :

The aim of this work was to study the interest of the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay, in environmental genotoxicity assessment. In the contexts of the Erika oil slick and of the polycyclic aromatic hydrocarbons, DNA damages were studied in mammals contaminated *via* the food and in freshwater invertebrates.

The studies with rats demonstrated the occurrence of DNA damage in the livers of the animals fed with mussels strongly contaminated following an oil slick and established a transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons present in mussels to the consumers. Genotoxic effects were also registered in the bone marrow cells. The results of a study on their reversibility pointed that DNA damages were transitory, with a complete repair in two weeks in our exposure conditions.

The second part of this work related genotoxic effects consecutive to *in vivo* exposures to benzo(a)pyrene and ferric iron in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. For the two markers of genotoxicity, DNA breaks measured by the comet assay and oxidative DNA damage assessed by the measurement of the 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, responses were mainly consecutive to the toxicity of benzo(a)pyrene. The comet assay did not appear as the most sensitive parameter under these conditions of exposure, comparatively to the measurement of oxidative DNA lesions.

Globally, our results underline that the comet assay is appropriate for the study of environmental genotoxicity and allow the assessment of the biodisponibility of genotoxic compounds in the food and in environmental samples.