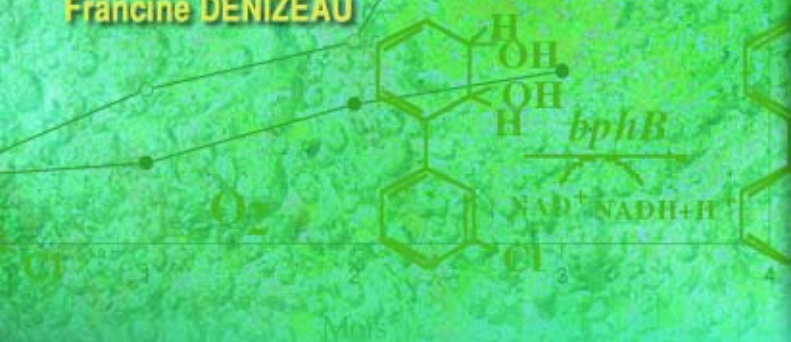
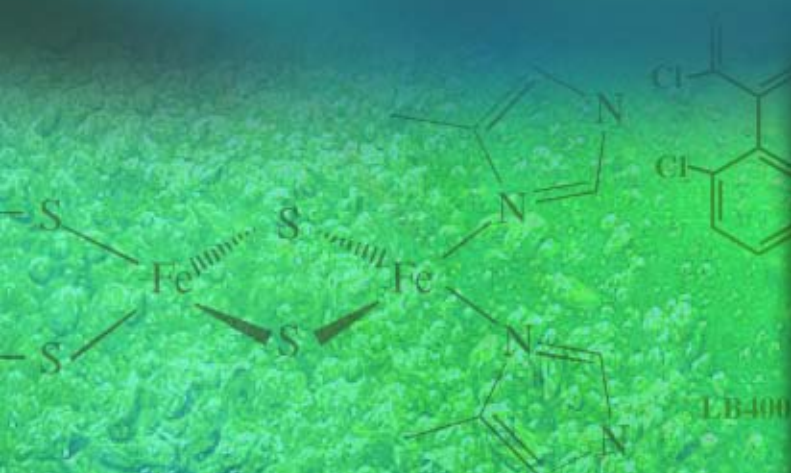


Sous la direction de
Émilien PELLETIER
Peter G.C. CAMPBELL
Francine DENIZEAU



ÉCOTOXICOLOGIE MOLECULAIRE

Principes fondamentaux
et perspectives de développement



Presses de l'Université du Québec

ÉCOTOXICOLOGIE MOLÉCULAIRE

Principes fondamentaux
et perspectives de développement

PRESSES DE L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

Le Delta I, 2875, boulevard Laurier, bureau 450

Sainte-Foy (Québec) G1V 2M2

Téléphone : (418) 657-4399 • Télécopieur : (418) 657-2096

Courriel : puq@puq.ca • Internet : www.puq.ca

Distribution :

CANADA et autres pays

DISTRIBUTION DE LIVRES UNIVERS S.E.N.C.

845, rue Marie-Victorin, Saint-Nicolas (Québec) G7A 3S8

Téléphone : (418) 831-7474 / 1-800-859-7474 • Télécopieur : (418) 831-4021

FRANCE

DISTRIBUTION DU NOUVEAU MONDE

30, rue Gay-Lussac, 75005 Paris, France

Téléphone : 33 1 43 54 49 02

Télécopieur : 33 1 43 54 39 15

SUISSE

SERVIDIS SA

5, rue des Chaudronniers, CH-1211 Genève 3, Suisse

Téléphone : 022 960 95 25

Télécopieur : 022 776 35 27



La *Loi sur le droit d'auteur* interdit la reproduction des œuvres sans autorisation des titulaires de droits. Or, la photocopie non autorisée – le « photocopillage » – s'est généralisée, provoquant une baisse des ventes de livres et compromettant la rédaction et la production de nouveaux ouvrages par des professionnels.

L'objet du logo apparaissant ci-contre est d'alerter le lecteur sur la menace que représente pour l'avenir de l'écrit le développement massif du « photocopillage ».

ÉCOTOXICOLOGIE MOLÉCULAIRE

Principes fondamentaux et perspectives de développement

Sous la direction de
Émilien PELLETIER
Peter G.C. CAMPBELL
Francine DENIZEAU

2004



Presses de l'Université du Québec
Le Delta I, 2875, boul. Laurier, bur. 450
Sainte-Foy (Québec) Canada G1V 2M2

Catalogage avant publication de la Bibliothèque nationale du Canada

Vedette principale au titre :

Écotoxicologie moléculaire : principes fondamentaux et perspectives de développement

Comprend des réf. bibliogr.

ISBN 2-7605-1258-4

1. Écotoxicologie. 2. Organismes aquatiques, Effets de la pollution de l'eau sur les.
3. Biologie moléculaire. 4. Marqueurs biologiques. 5. Polluants de l'eau. 6. Xénobiotiques.
I. Pelletier, Émilien. II. Campbell, P.G.C. (Peter Gerald Cadogan), 1943- .
III. Denizeau, Francine.

QH90.8.T68 E26 2004

571.9'5'0916

C2004-940015-0

Nous reconnaissons l'aide financière du gouvernement du Canada
par l'entremise du Programme d'aide au développement
de l'industrie de l'édition (PADIÉ) pour nos activités d'édition.

Mise en pages : INFO 1000 MOTS INC.

Couverture : RICHARD HODGSON

1 2 3 4 5 6 7 8 9 PUQ 2004 9 8 7 6 5 4 3 2 1

Tous droits de reproduction, de traduction et d'adaptation réservés

© 2004 Presses de l'Université du Québec

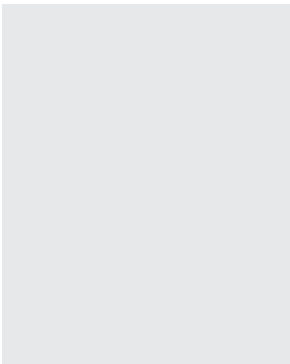
Dépôt légal – 2^e trimestre 2004

Bibliothèque nationale du Québec / Bibliothèque nationale du Canada

Imprimé au Canada

*À la mémoire de notre collègue et très chère amie,
Francine Denizeau,
décédée le 24 mars 2004
à la suite d'un long combat contre le cancer.
Nous garderons de Francine le souvenir
d'une femme de sciences énergique
et profondément engagée en recherche et en formation
de jeunes diplômés capables de prendre la relève
en toxicologie de l'environnement.*

TABLE DES MATIÈRES



Liste des figures	xxi
Liste des tableaux	xxvii
Abréviations	xxxii
Introduction	1
<i>Émilien Pelletier, Peter G.C. Campbell et Francine Denizeau</i>	
Références	8
Chapitre 1	
Prise en charge et détoxification des métaux chez les organismes aquatiques	9
<i>Peter G.C. Campbell et Yves Couillard</i>	
Résumé	10
1. Introduction	11
1.1. Contamination environnementale	11
1.2. Identification de métaux prioritaires	12
1.3. Plan du chapitre	15
2. Toxicologie aquatique des métaux – notions	16
2.1. Chimie environnementale	16
2.2. Prise en charge des métaux	19
2.2.1. Considérations générales	19

2.2.2. Modèle de l'ion libre (MIL)/Modèle du ligand biotique (BLM)	21
2.2.3. Applicabilité du Modèle du ligand biotique (BLM)	25
2.2.4. Résumé: prise en charge des métaux	30
2.3. Toxicité et de détoxification des métaux	34
2.3.1. Mécanismes de toxicité	34
2.3.2. Mécanismes de détoxification	37
2.3.3. Spéciation intracellulaire des métaux – un outil pour déceler la toxicité ?	39
3. Métallothionéines	41
3.1. Introduction	41
3.2. Biochimie	41
3.3. Synthèse et dégradation	44
3.4. Fonctions	45
3.4.1. Rôle dans la régulation des métaux essentiels ...	47
3.4.2. Protection contre le stress oxydant	49
3.4.3. Détoxification des métaux traces	49
4. Conclusions et perspectives	51
Références	55

Chapitre 2

La métallothionéine : un biomarqueur d'exposition

au cadmium pour les invertébrés d'eau douce

*Bernadette Pinel-Alloul, Olivier Perceval, Anik Giguère,
Yves Couillard, Peter G.C. Campbell et Landis Hare*

Résumé	64
1. Introduction	65
1.1. Contamination métallique dans les écosystèmes aquatiques	65
1.2. Concept de biomarqueur	66
1.3. Démarche écotoxicologique holistique et hiérarchique	67
2. La métallothionéine comme biomarqueur d'exposition et de toxicité	70
2.1. Approche écotoxicologique intégrée	70
2.2. Rappel du rôle de la MT comme biomarqueur d'exposition au cadmium	74
2.3. Étude de cas : caractérisation limnologique et toxicologique	76

2.4. Évaluation de la MT comme biomarqueur des effets toxiques du cadmium au niveau de la cellule et de l'organisme	77
2.5. Validation de la MT comme biomarqueur des effets des métaux au niveau des populations	82
2.5.1. Contexte écotoxicologique	82
2.5.2. Variables toxicologiques	83
2.5.3. État des populations et qualité environnementale des habitats	85
2.5.4. Relations entre l'état des populations et les variables toxicologiques	85
2.5.5. Discussion	94
2.6. Effets confondants des facteurs environnementaux en milieu naturel	95
3. Conclusions et perspectives de recherche	99
Références	102

Chapitre 3

La dépollution des POP : les nouveaux outils de la biologie moléculaire à la rescousse des biotechnologies environnementales

*Michel Sylvestre, Diane Barriault,
Marie-Michèle Plante et Catherine Simard*

Résumé	110
1. Introduction	111
2. Biodisposition des composés xénobiotiques par les bactéries de l'environnement	111
2.1. Capacité des micro-organismes à dégrader les xénobiotiques	112
2.2. Capacité d'adaptation des micro-organismes dans un nouvel environnement	115
3. Les POP, une menace pour l'environnement	117
3.1. Persistance des POP	118
3.2. Exemple des BPC	119
4. Voie catabolique des BPC	119
4.1. Purification et mécanismes réactionnels de la dioxygénase du biphenyle	120
4.2. Activité et spécificité de la dioxygénase du biphenyle	124

5. Ingénierie de la dioxygénase du biphenyle	129
5.1. Évolution moléculaire <i>in vitro</i> par recombinaison aléatoire	131
5.2. Application de l'évolution moléculaire <i>in vitro</i> par recombinaison aléatoire à l'ingénierie de la dioxygénase du biphenyle	133
5.3. Évolution moléculaire de familles de gènes	134
5.4. Méthode de criblage pour une dioxygénase améliorée	135
5.5. Ingénierie de la dioxygénase du biphenyle de la souche B-356 par recombinaison <i>in vitro</i> aléatoire	136
5.6. Analyse d'hybrides obtenus en remplaçant la partie C-terminale de la chaîne α de la dioxygénase de LB400 par celle de B-356	136
6. Autres enzymes de la voie catabolique du biphenyle	142
6.1. La 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyle 2,3-déshydrogénase	142
6.2. La 2,3-dihydroxybiphenyle 1,2-dioxygénase	143
6.3. Hydrolase du HOPDA	146
7. Application des organismes modifiés génétiquement dans des procédés de décontamination	146
7.1. Expression et fonctionnalité des enzymes modifiées ...	146
7.2. Survie des organismes modifiés génétiquement	148
8. Conclusion	150
Références	152

Chapitre 4

Défaillance de la synthèse des hormones corticostéroïdes : exposition de poissons et amphibiens aux métaux et aux pesticides

161

Alice Hontela et J. John Dorval

Résumé	162
1. Introduction	163
1.1. Problématique des perturbateurs endocriniens	163
1.2. Cibles endocrines des polluants environnementaux et axe hypothalamo-hypophyso-adrénal	164

2. Endocrinologie comparée du tissu adrénocortical et hormones corticostéroïdes	166
2.1. Anatomie comparée : poissons téléostéens, amphibiens et mammifères	166
2.2. Cellule corticostéroïdogénique et voies de signalisation	167
2.3. Les hormones corticostéroïdes et leurs effets physiologiques	169
3. Travaux sur le terrain et effets des expositions chroniques chez les poissons	170
3.1. La défaillance cortisolique	170
3.2. Effets des métaux sur la capacité d'osmorégulation	173
3.3. Effets des métaux sur la croissance et le métabolisme	174
4. Expositions <i>in vitro</i> : mécanismes impliqués dans la défaillance cortisolique	175
4.1. Les interactions des métaux avec le Ca^{2+} intracellulaire	176
4.2. Effets des métaux et des pesticides sur les enzymes stéroïdogéniques	178
5. Pesticides et stress oxydatif	181
5.1. Définition du stress oxydatif	182
5.2. Les systèmes de défense antioxydants	182
5.3. Travaux en laboratoire	184
5.3.1. Exposition <i>in vitro</i> à l'endosulfan	184
5.3.2. Travaux sur le terrain	185
6. Utilisation des biomarqueurs hormonaux	186
6.1. Recommandations et protocoles pour l'utilisation sur le terrain	186
6.2. Avantages et limitations	188
7. Perspectives	189
8. Conclusion	189
Références	191

Chapitre 5

Rétinoïdes : biomarqueurs et base moléculaire

d'effets de substances toxiques	197
<i>Monique Boily, Marjolaine Bisson et Philip A. Spear</i>	
Résumé	198
1. Introduction	199
2. Biochimie, métabolisme et action moléculaire	200
2.1. Absorption, métabolisme, stockage et transport des rétinoïdes majeurs	200
2.2. Métabolisme de l'acide rétinoïque et formes apparentées	205
2.3. Interactions au niveau des récepteurs nucléaires	206
2.4. Aspects nutritionnels de la vitamine A et effets d'un excès en acide rétinoïque sur l'embryon	208
3. Déséquilibres des rétinoïdes	212
3.1. Déséquilibre des formes de stockage	212
3.1.1. Stockage au niveau du foie et certains organes ..	215
3.1.2. Corrélations entre enzymes et rétinoïdes hépatiques stockés	220
3.1.3. Réserve au niveau des œufs	221
3.1.4. Effet des contaminants sur la HER, la LRAT et l'ARAT	223
3.1.5. Conclusions à propos du stockage de rétinoïdes	225
3.2. Rétinol sanguin	226
3.3. Effets sur le métabolisme de l'acide rétinoïque	229
4. Exemples des rétinoïdes comme biomarqueurs dans le contexte d'études écotoxicologiques	230
4.1. Programmes de surveillance des colonies aviennes sur les Grands Lacs et le fleuve Saint-Laurent	230
4.2. Études sur les populations d'esturgeon jaune	237
5. Conclusion	244
Références	245

Chapitre 6

**Les interactions multiples en écotoxicologie :
le cas du benzo(a)pyrène et du tributylétain****chez l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*)** 257*Jaime Padrós, Émilien Pelletier et Ciro A. de Oliveira Ribeiro*

Résumé	258
1. Introduction générale	259
1.1. L'antagonisme sélénium/mercure	260
1.2. Introduction au problème du TBT et du BaP	262
1.3. Hypothèses de travail et objectifs	266
2. Matériel et méthodes	268
2.1. Produits chimiques	268
2.2. Poissons	268
2.3. Traitements	268
2.4. Prélèvement des tissus cibles	269
2.5. Préparation des essais enzymatiques et dosages biochimiques	269
2.6. Analyse des métabolites du BaP dans la bile	270
2.7. Isolement des macromolécules	270
2.8. Analyses chimiques	270
2.9. Analyses histopathologiques	270
2.10. Analyses statistiques	271
3. Résultats	271
3.1. Effets interactifs du BaP et du TBT sur l'activité du P4501A	271
3.2. Effets du TBT sur le métabolisme du BaP	272
3.3. Effets du TBT sur la bioactivation du BaP	273
3.4. Effets interactifs du BaP et du TBT sur les activités de la GST et de la GR hépatiques	274
3.5. Effets interactifs du BaP et du TBT sur le glutathion ...	275
3.6. Effets du BaP sur le métabolisme du TBT	276
3.7. Effets interactifs du BaP et du TBT sur l'histopathologie du tissu hépatique	277
4. Discussion	279
4.1. Inhibition de la bioactivation du BaP par le TBT	281
4.2. Potentiation du métabolisme et/ou de l'excrétion du TBT par le BaP	283

4.3. Effet modulateur du TBT sur l'activité du P4501A	284
4.4. Diminution de l'activité de la GST et du glutathion et effet protecteur du BaP	286
4.5. Protection mutuelle entre le BaP et le TBT au niveau tissulaire hépatique	288
5. Conclusions	288
6. Perspectives sur les interactions multiples en écotoxicologie	291
Références	294

Chapitre 7

Interactions cellule-cellule : cible des xénobiotiques

Daniel G. Cyr, Stéphane Pillet et Jean-Marc Nicolas

Résumé	302
1. Introduction	303
2. Intégrines et sélectines	303
2.1. Sélectines	303
2.2. Intégrines	305
3. Jonctions lacunaires et communication intercellulaire	315
3.1. Connexines et jonctions lacunaires	315
3.2. Effets des xénobiotiques	321
3.2.1. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	321
3.2.2. Phénobarbital (PB)	322
3.2.3. Organochlorés	323
3.2.4. Métaux	327
4. Jonctions d'adhésion cellulaire	329
4.1. Cadhérines	329
4.2. Voie de signalisation des cadhérines	330
4.3. Régulation de la jonction adhérente	332
4.4. Effets du cadmium	335
5. Conclusions	335
Références	336

Chapitre 8

Stress physiologique et perturbation**endocrinienne chez les bivalves marins** 349

*Jocelyne Pellerin, Sophie Gauthier-Clerc,
Ahmed Siah et Olivier Assoi-Etchian*

Résumé	350
1. Introduction	351
1.1. Les biomarqueurs	352
2. Signaux cellulaires et moléculaires de stress physiologique	352
2.1. Les processus oxydants	352
2.1.1. Exemples de stress oxydant en milieu marin	354
2.1.2. Observations interspécifiques	355
2.2. La déstabilisation de la membrane lysosomale	356
2.2.1. Réponses de la membrane lysosomale aux paramètres du milieu	358
2.2.2. Réponses de la membrane lysosomale aux stress anthropiques	359
2.3. La croissance : un signal physiologique, intégrateur des dysfonctionnements	359
2.3.1. Les paramètres du milieu : exemples de leur influence	359
2.3.2. Le potentiel de croissance	360
3. Signalisation cellulaire de la reproduction et de ses dysfonctionnements	361
3.1. La gamétogenèse	362
3.1.1. Le développement des ovocytes	362
3.2. L'enzyme aspartate transcarbamylase	362
3.2.1. Utilisation de l'ATCase	363
3.3. Régulation de la gamétogenèse	363
3.4. La stéroïdogénèse	364
3.4.1. Relations entre la disponibilité des réserves énergétiques et la régulation endocrinienne de la maturation des gonades	365
3.4.2. Le rôle physiologique des stéroïdes chez les mollusques bivalves	366
3.5. Rôle de la vitellogénine et des protéines associées	366
3.5.1. La vitellogénèse chez les invertébrés	366

4. Les perturbateurs endocriniens	367
4.1. Problématique générale des perturbateurs endocriniens	367
4.2. Le cas des xéno-œstrogènes dans l'environnement	369
4.2.1. Identification et mode d'action	369
4.2.2. Présence en milieu aquatique	369
4.3. Utilisation de la vitellogénine comme signal d'exposition	370
4.4. Autres effets associés à l'exposition aux xéno-œstrogènes	371
4.5. Les anti-œstrogènes	372
5. Signalisation cellulaire en milieu marin : résultats récents	373
5.1. Variation de la maturation sexuelle chez <i>Mya arenaria</i> dans le fjord du Saguenay (Québec) : exposition à des perturbateurs endocriniens ?	373
5.1.1. Relations entre les réserves énergétiques et la maturation des gamètes	373
5.2. Effets du tributylétain sur la reproduction des mollusques	377
6. Rôle de la progestérone dans la maturation sexuelle : résultats récents	378
7. Effets des perturbateurs endocriniens sur l'enzyme aspartate transcarbamylase	383
7.1. Cas du tributylétain (TBT)	383
7.1.1. Résultats récents sur l'ATCase chez <i>Mya arenaria</i>	384
7.1.2. Les acquis	386
8. Perspectives	386
8.1. L'intégration de signaux moléculaires et cellulaires	386
8.2. Utilisation de <i>Mya arenaria</i> comme organisme sentinelle dans le cas d'exposition à des xéno-œstrogènes	387
9. Conclusion	388
Références	390

Chapitre 9

Biomarqueurs immunologiques appliqués

à l'écotoxicologie	401
<i>Michel Fournier, Alain Lalancette, Lucie Ménard, Marie-Soleil Christin-Piché, Sylvain De Guise et Pauline Brousseau</i>	
Résumé	402
1. Considérations générales	403
1.1. Introduction	403
1.2. Diversité des effets immunotoxiques	403
1.3. Procédures d'évaluation toxicologique et prévision d'immunotoxicité	405
1.4. Principes d'une exploration immunotoxicologique	405
1.5. Évaluation du risque en immunotoxicologie	406
2. Immunotoxicologie des invertébrés	407
2.1. Introduction	407
2.2. Réponses immunitaires non spécifiques	408
2.2.1. La phagocytose	408
2.2.2. L'activité des cellules NK	409
2.3. Réponses immunitaires spécifiques	410
2.3.1. Réponse à médiation cellulaire	410
2.3.2. Réponse à médiation humorale	411
2.3.3. Les cytokines	411
2.4. Les biomarqueurs immunologiques chez les invertébrés	411
2.4.1. Les marqueurs immunologiques chez les annélides oligochètes	411
2.4.2. Biomarqueurs immunologiques chez les mollusques bivalves	415
2.5. Conclusion	421
3. Immunotoxicologie des amphibiens	421
3.1. Introduction	421
3.2. La structure du système immunitaire	422
3.2.1. Le thymus et les lymphocytes T	422
3.2.2. La rate et les lymphocytes B	422
3.2.3. Autres organes lymphoïdes	423
3.3. L'immunité innée	423
3.4. L'immunité acquise	424
3.4.1. Le complexe majeur d'histocompatibilité	424
3.4.2. Les immunoglobulines	424
3.4.3. La diversité des anticorps dans la réponse humorale	425

3.5. La tolérance	425
3.6. Les changements dans le système immunitaire lors de la métamorphose	426
3.7. Sensibilité des amphibiens à différents pathogènes lors de la métamorphose	426
3.8. Effets toxiques des produits chimiques sur le système immunitaire des amphibiens	427
3.9. Effets immunotoxiques d'un mélange de pesticides sur les grenouilles	429
4. Discussion et perspectives	431
5. Conclusion	433
Références	434
Glossaire	445
Index	451
Auteurs	457

LISTE DES FIGURES

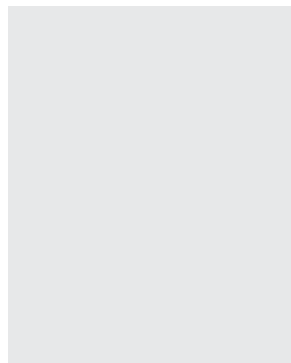


Figure 1.1	Schéma général montrant la spéciation chimique des métaux en solution	17
Figure 1.2	Modèle conceptuel des interactions entre les métaux et les organismes aquatiques	21
Figure 1.3	Prise en charge de métaux par des organismes aquatiques – mécanismes généraux	23
Figure 1.4	Schéma général des courbes dose-réponse typiquement observées chez un organisme vivant pour i) un macro-élément nutritif (p. ex., Ca); ii) un micro-élément nutritif (p. ex., Cu); et iii) un élément toxique non essentiel (p. ex., Pb) ..	35
Figure 1.5	Liens entre l'exposition aux métaux, leur prise en charge, leur détoxification, et la manifestation d'effets délétères	38
Figure 1.6	Structure tridimensionnelle des deux domaines de chélation métallique de la métallothionéine 2a du foie de lapin	43
Figure 1.7	Modèle de synthèse et de dégradation de la métallothionéine à l'échelle cellulaire	46

Figure 1.8	Changements dans les concentrations d'hémocyanine, de cuivre- et de zinc-thionéine dans l'hépatopancréas du crabe bleu <i>Callinectes sapidus</i> au cours de son cycle de mue	48
Figure 2.1	Effet de l'introduction d'un métal toxique dans l'environnement	69
Figure 2.2	Approche écotoxicologique intégrée	72
Figure 2.3	Modèles de cytotoxicité (ou de débordement) cellulaire	78
Figure 2.4	Concentration de métallothionéine	81
Figure 2.5	Réactions des populations de bivalves au niveau de contamination	90
Figure 2.6	Productivité des populations de bivalves en fonction de la contamination	93
Figure 3.1	Métabolisme des organismes prototrophiques aérobies	113
Figure 3.2	Voie catabolique oxydative du biphenyle et des chlorobiphenyles	122
Figure 3.3	Structure probable du centre Rieske	124
Figure 3.4	Mode d'hydroxylation et propriétés catalytiques des dioxygénases du biphenyle des souches B-356, KF707 et LB400 envers les congénères chlorobiphenyles ...	126
Figure 3.5	Comparaison des séquences en acides aminés des portions C-terminales des chaînes α des dioxygénases du biphenyle des souches LB400, B-356 et KF707	127
Figure 3.6	Modes d'attaque du 2,2'-dichlorobiphenyle par la dioxygénase du biphenyle de LB400	130
Figure 3.7	Évolution moléculaire par recombinaison <i>in vitro</i> aléatoire	132
Planche 1	Colonies induites de <i>E. coli</i> exposées aux vapeurs de biphenyle	

Figure 3.8	Constructions d'hybrides entre la dioxygénase de la souche LB400 et celle de la souche B-356 et leur activité envers le biphényle	138
Figure 3.9	Potentiel catalytique et alignements des séquences de variants de la dioxygénase du biphényle obtenus par recombinaison <i>in vitro</i> aléatoire	141
Figure 3.10	Mécanisme d'inhibition de la 2,3-dihydroxybiphényle 1,2-dioxygénase par le 3-chlorocatéchol	145
Figure 4.1	Niveaux d'organisation anatomique et fonctionnelle de l'axe HHI	165
Figure 4.2	L'organisation cellulaire du tissu interrénal chez le poisson téléostéen	168
Figure 4.3	Voies signalétiques de la synthèse du cortisol dans la cellule stéroïdogénique	170
Figure 4.4	Sites échantillonnés dans l'étude écotoxicologique de la perchaude <i>Perca flavescens</i> dans la région minière de Rouyn-Noranda	171
Figure 4.5	Le bioessai utilisé pour évaluer <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> la toxicité adrénales chez les poissons et les amphibiens	180
Figure 4.6	Enzymes impliquées dans la défense oxydative	183
Figure 4.7	Effet d'une exposition <i>in vitro</i> à l'endosulfan sur la sécrétion de cortisol par les cellules corticostéroïdogéniques de la truite arc-en-ciel.	185
Figure 5.1	Structure générale des rétinoïdes	200
Figure 5.2	Schéma général des interactions concernant les rétinoïdes	201
Figure 5.3	Étude sur les colonies de grands hérons nichant le long du fleuve Saint-Laurent	235
Figure 5.4	Chromatogrammes par HPLC des extraits de foie d'esturgeons jaunes, <i>Acipenser fulvescens</i> , provenant du fleuve Saint-Laurent et de la région d'Abitibi	242

Figure 5.5	Proportions (A) et concentrations (B) de rétinoïdes hépatiques pour l'esturgeon jaune, <i>Acipenser fulvescens</i> , du fleuve Saint-Laurent et de la région d'Abitibi (site de référence)	243
Figure 6.1	Structures chimiques du benzo(a)pyrène (BaP) et du chlorure de tributylétain (TBTCl)	263
Figure 6.2	Schéma général du métabolisme des xénobiotiques chez le poisson	265
Figure 6.3	Processus de bioactivation du BaP en un métabolite cancérogène (+)-anti-BaPDE	267
Figure 6.4	Effets interactifs du BaP et du TBT sur l'activité de l'EROD hépatique (UF/min/mg de protéine)	272
Figure 6.5	Effets interactifs du BaP et du TBT sur l'activité de la GST hépatique (nmol/min/mg de protéine) dans le foie	275
Figure 6.6	Effets interactifs du BaP et du TBT sur le contenu en GSH (nmol/g de tissu) dans le foie	276
Figure 6.7	Coupes microscopiques (5µm) du foie de <i>Salvelinus alpinus</i> exposé à 6 doses successives, soit de TBT, soit de BaP, ou encore de TBT + BaP, colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (agrandissement 400×).	278
Figure 6.8	Distribution des aires non colorées du cytoplasme . .	280
Figure 7.1	Représentation schématique des interactions intercellulaires	304
Figure 7.2	Principales molécules d'adhérence intercellulaire et leur implication dans le processus séquentiel de migration cellulaire	307
Figure 7.3	Représentation schématique d'une plaque jonctionnelle	316
Figure 7.4	Représentation schématique de l'insertion d'une connexine au sein de la membrane plasmatique	319

Figure 7.5	Représentation schématique du complexe cadhérine-caténine dans une cellule épithéliale	331
Figure 7.6	Représentation schématique de la voie de signalisation Wnt	333
Figure 8.1	Suivi des processus oxydants chez <i>Mya arenaria</i> via l'activité catalasique	356
Figure 8.2	Suivi des processus oxydants chez <i>Mya arenaria</i> autant en milieu naturel que transplantés dans les mésocosmes	357
Figure 8.3	Exemple de réponses du potentiel de croissance (<i>Scope for growth</i>) chez <i>Mya arenaria</i> et <i>Mytilus edulis</i>	358
Figure 8.4	Exposition de <i>Mya arenaria</i> et de <i>Mytilus edulis</i> à du TBT via du phytoplancton contaminé	361
Figure 8.5	Profil des variations de la maturation sexuelle de <i>Mya arenaria</i> dans le fjord du Saguenay	374
Figure 8.6	Profil saisonnier des variations des concentrations en glycogène de <i>Mya arenaria</i> dans le fjord du Saguenay	375
Figure 8.7	Profil des variations des concentrations en protéines apparentées aux vitellines dans l'hémolymphe de <i>Mya arenaria</i> dans le fjord du Saguenay	376
Figure 8.8	Fréquence des différents stades de maturation sexuelle chez <i>Mya arenaria</i>	380
Figure 8.9	Profil de la progestérone chez <i>Mya arenaria</i>	381
Figure 8.10	Influence du TBT sur l'activité de l'ATCase gonadique de <i>Mya arenaria</i>	385
Figure 9.1	Diagramme de points de la dispersion en taille (FSC) et en complexité (SSC) d'une population d'hémocytes de myes (<i>Mya arenaria</i>)	417

LISTE DES TABLEAUX

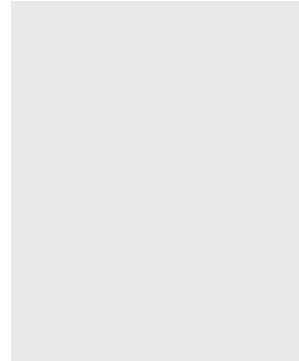


Tableau 1.1	Comparaison écotoxicologique entre les métaux traces et les micro-polluants organiques	12
Tableau 1.2	Classification des éléments métalliques dans un contexte environnemental	13
Tableau 1.3	Spéciation chimique des métaux	16
Tableau 1.4	Spéciation inorganique typique de quatre métaux traces (Cd, Cu, Pb, Zn) dans les eaux douces oxygènes	19
Tableau 1.5	Propriétés chimiques des substances humiques et processus biogéochimiques reconnus qui y sont associés	30
Tableau 1.6	Influence de la matière organique dissoute (MOD) naturelle sur la biodisponibilité des métaux	32
Tableau 1.7	Facteurs physiologiques et expérimentaux entraînant l'induction de métallothionéine chez les mammifères	44
Tableau 1.8	Études montrant le rôle des métallothionéines dans l'acquisition de tolérance accrue aux métaux ..	50
Tableau 2.1	Relations entre la MT chez différentes espèces d'invertébrés et le niveau de cadmium dans le milieu (Cd^{2+}) et dans les organismes (Cd dans le corps entier ou les branchies)	74

Tableau 2.2	Méthodes de mesure de la contamination au cadmium	80
Tableau 2.3	Concentrations de cadmium	84
Tableau 2.4	Méthodes de mesure des variables démographiques	86
Tableau 2.5	Caractéristiques démographiques dans les lacs sélectionnés	88
Tableau 2.6	Caractéristiques morphométriques et limnologiques des 9 lacs sélectionnés	91
Tableau 2.7	Effets de la contamination du milieu sur les populations	98
Tableau 3.1	Quantité de substrat consommé 5 min après le début de la réaction enzymatique	128
Tableau 3.2	Activité de dioxygénases hybrides purifiées par chromatographie d'affinité de protéines recombinantes portant une étiquette Histidine	137
Tableau 4.1	Concentrations tissulaires en métaux ($\mu\text{g/g}$ poids sec) de la perchaude, <i>Perca flavescens</i> , prélevée dans la région minière de l'Abitibi	172
Tableau 4.2	Sensibilité de cellules adrénocorticales de la truite aux métaux et pesticides	181
Tableau 5.1	Effets des contaminants sur le stockage de rétinoides majeurs au niveau du foie	213
Tableau 5.2	Effets des organochlorés sur l'activité de l'ARAT, de la LRAT et de la HER	224
Tableau 5.3	Résumé des résultats chez la population de l'esturgeon jaune, <i>Acipenser fulvescens</i> , du fleuve Saint-Laurent comparativement aux sites de référence	239
Tableau 6.1	Effets du TBT sur la concentration biliaire de métabolites du BaP ($\mu\text{g/mg}$ de protéine)	273
Tableau 6.2	Effets du TBT sur la formation <i>in vivo</i> des adduits à l'albumine (Alb), à la globine (Gb) et à l'ADN (pg BaP tétrol I-1/ mg de macromolécule)	274

Tableau 6.3	Effets du BaP sur la concentration biliaire des composés butylétains (ng Sn/g de bile)	277
Tableau 6.4	Nature et incidence des effets morphologiques observés dans le foie de <i>Salvelinus alpinus</i> exposé à six doses de TBT, de BaP, ou de TBT + BaP	279
Tableau 7.1	Liste des connexines identifiées à ce jour chez les mammifères	317
Tableau 7.2	Liste des connexines identifiées à ce jour chez les vertébrés aquatiques	318
Tableau 8.1	Récapitulatif des effets observés sur différentes espèces exposées aux perturbateurs endocriniens . . .	368
Tableau 9.1	Concentrations inhibant de 50 % la phagocytose effectuée par des hémocytes de myes (<i>Mya arenaria</i>) et des coelomocytes de vers (<i>Lumbricus terrestris</i>) exposés à divers métaux	414
Tableau 9.2	Concentrations inhibant de 50 % la phagocytose effectuée par des hémocytes de myes (<i>Mya arenaria</i>), de moules bleues (<i>Mytilus edulis</i>) et de mactres (<i>Spisula polynima</i>) exposés à divers composés de butylétain	418

ABRÉVIATIONS

17b-HSD	17b-hydroxystéroïde déshydrogénase-isomérase
2,4,5-T	Acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique
2,4-D	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
3b-HSD	3b-hydroxystéroïde déshydrogénase-isomérase
4-NP	4-nonylphénol
Acétyl CoA	Acétyl coenzyme A
ACTH	Hormone adrénocorticotropique
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADN	Acide déoxyribonucléique
AgNO₃	Chlorure d'argent
AH + AF	Acides humiques et acides fulviques
AHH	Aryl-hydrocarbène-hydroxylase
Ahr	Aryl hydrolase
Alb	Albumine
ALP	Phosphore labile en milieu alcalin
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
APC	Suppresseur de tumeurs de polyposé rétro-colique familiale (adenomatous polyposis coli tumor suppressor)
APs	Alkylphénols
ARAT	Acyl-coenzyme A rétinol-acyltransférase
ARN	Acide ribonucléique
ASE	Anse Saint-Étienne
ATCase	Aspartate transcarbamylase
BaP	Benzo(a)pyrène
BaPDE	Benzo(a)pyrène-7,8-diol-9,10-époxyde
BE	Baie Éternité
BKME	Effluents d'usine de pâte kraft blanchie (bleached Kraft pulp mill effluents)
BLM	Modèle du ligand biotique (<i>Biotic Ligand Model</i>)
BPB	Biphényles polybromés
BPC	Biphényles polychlorés
C Sest	Carbone dans le seston < 80 µm
CAT	Catalase
CCF-1	Facteur cytolytique cœlomique de type 1 (<i>coelomic cytolytic factor-1</i>)
CdCl₂	Chlorure de cadmium
Cd-FPM	Cadmium lié aux ligands de faible poids moléculaire
Cd-HPM	Cadmium lié aux ligands de haut poids moléculaire

Cd-MT	Cadmium lié aux protéines s'apparentant aux métallothionéines
CE50	Concentration efficace à 50 %
CH₃HgCl	Chlorure de méthyl mercure
Chl.<i>a</i>	Chlorophylle <i>a</i>
CI10	Concentration requise pour obtenir 10 % d'inhibition
CI50	Concentration requise pour obtenir 50 % d'inhibition
CL50	Concentration létale à 50 %
CMH-I	Complexes d'histocompatibilités majeurs de classe I
CMH-II	Complexes d'histocompatibilités majeurs de classe II
CNRC	Conseil national de recherches du Canada
COD	Carbone organique dissous
CRABP	<i>Cellular Retinoic Acid-Binding Protein</i>
CRBP	<i>Cellular Retinol-Binding Protein</i>
CuCl₂	Chlorure de cuivre
Cx	Connexine
CYP	Cytochrome P450
DbcAMP	Dibutiryle AMP cyclique
DBT	Dibutylétain (C ₄ H ₉) ₂ Sn(IV)
DDT	1,1,1-trichloro-2,2-bis(<i>p</i> -chlorophényl)éthane
DEN	Dinitrosamine
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DSh	Protéine <i>dishevel</i>
E-Cad	Cadhérine épithéliale
ECOD	7-éthoxycoumarine- <i>O</i> -dééthylase
EDTA	Éthylènediamine-tétraacétate
EE2	Éthynyloestradiol
EIT	Éléments inhibiteurs de transcription
ELAM	Molécule d'adhésion des leucocytes à l'endothélium (<i>endothelial leukocyte-adhesion molecule</i>)
ELISA	Immuno-absorption enzymatique (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ER	Récepteur œstrogénique
ERE	Composante réactive aux estrogènes
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
EROD	7-éthoxyrésorufine- <i>O</i> -dééthylase
ESEE	Étude de suivi des effets sur l'environnement
FAD	Flavine adénine dinucléotide

FGF	Facteur de croissance fibroblastique (<i>fibroblast growth factor</i>)
Frz	Récepteur <i>frizzle</i>
Gb	Globine
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse
GJIC	Communication intercellulaire via les jonctions lacunaires (<i>gap junctional intercellular communication</i>)
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion
GSK	Synthétase de glycogène
GST	Glutathion <i>S</i> -transférase
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HCB	Hexachlorobenzène
HER	Hydrolase des esters du rétinol
HgCl₂	Chlorure de mercure
HHA	Hydrolase des hydrocarbures aromatiques
HOPDA	Acide 2-hydroxy-6-oxo-6-phénylhexa-2,4-diénoïque
ICAM	Molécule d'adhérence intercellulaire (<i>intercellular adhesion molecule</i>)
Ig	Immunoglobuline
IGF	Facteur de croissance semblable à l'insuline (<i>insulin-like growth factor</i>)
IL	Interleukine
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
K	Constante du taux de croissance instantanée
K-Cad	Cadhérine rénale
K_{ow}	Coefficient de partage octanol/eau
L_∞	Longueur asymptotique théorique
LC-MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
LECAM	Molécule d'adhérence cellulaire des leucocytes à l'endothélium (<i>leukocyte-endothelial cell adhesion molecule</i>)
L-FPM	Ligands de faible poids moléculaire
L-HPM	Ligands de haut poids moléculaire
LOEL	Effet observé à dose faible
LPS	Lipopolysaccharide
LRAT	Lécithine rétinol-acyltransférase
LVn	Lipovitellines
MBT	Monobutylétain (C ₄ H ₉)Sn(IV)

MDA	Malondialdéhyde
MDCK	Cellules rénales de chien Mardin-Darby (<i>Mardin-Darby dog kidney</i>)
MFO	Oxygénases à fonction mixte (<i>mixed function oxygenase</i>)
MIL	Modèle de l'ion libre
MoCl₄	Chlorure de molybdène
MOD	Matière organique dissoute
MT	Métallothionéine
MTF-1	Facteur de transcription impliqué dans l'induction de la synthèse de la métallothionéine
M^{z+}	Ion métallique libre (incluant sa sphère d'hydratation)
N Sest	Azote dans le seston < 80 µm
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	Dihyronicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NiCl₂	Chlorure de nickel
NK	Cellule tueuse naturelle (<i>natural killer</i>)
NOAEL	Dose sans effet néfaste observé (<i>no observable adverse effect level</i>)
NOEL	Pas d'effet observé
NP	Nonylphénol
NP1EC	Acide nonylphénoxyacétique
NP2EC	Acide nonylphénoxyéthoxyacétique
NPxEO	Nonylphénolpolyéthoxylates
NTA	Nitriлотriacétate
<i>o,p'</i>DDE	<i>o,p'</i> -dichlorodiphényldichloroéthylène
<i>o,p'</i>DDT	<i>o,p'</i> -dichlorodiphénoltrichloréthane
OFM	Oxygénases à fonction mixte
OP	Octylphénol
P/B	Ratio Production/Biomasse
P450	Cytochrome P-450
PbCl₂	Chlorure de plomb
P-Cad	Cadhérine placentaire
PCB	Pentachlorobiphényle
PCDD	Dibenzopolychlorés (<i>polychlorinated dibenzodioxin</i>)
PCDF	Dibenzofuranes (<i>polychlorinated dibenzofuran</i>)
PCP	Pentachlorophénol
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PHMB	Para-hydroxymercuribenzoate
PMN	Cellules polymorphonucléées

POP	Polluants organiques persistants
Protéine StAR	<i>Steroidogenic Acute Regulatory Protein</i>
RAG	Enzymes de recombinaison d'activation des gènes (<i>recombination activating genes enzyme</i>)
RAG	All- <i>trans</i> -rétinoylglucuronide
RAR	Récepteurs de l'acide rétinoïque
RBP	<i>Retinol-binding Protein</i>
RNI	Intermédiaires réactifs d'azote (<i>reactive nitrogen intermediates</i>)
ROI	Intermédiaires réactifs d'oxygène (<i>reactive oxygen intermediates</i>)
RXR	Récepteurs X des rétinoïdes
sélectine-Ec	Sélectine-E circulante
SH	Groupes thiol
SNC	Système nerveux central
SOD	Super oxyde dismutase
TBT	Tributylétain (C ₄ H ₉) ₃ Sn(IV)
TCB	Tétrachlorobiphényle
TCCD	2,3,7,8-dichlorodibenzo-dioxine
TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine
TCDD-EQ	Équivalences toxiques en TCDD
TdT	Transférerase-terminale (<i>terminal deoxynucleotidyl transferase</i>)
TGF-β	Facteur de croissance de transformation bêta (<i>transforming growth factor β</i>)
TNF	Facteur de nécrose des tumeurs (<i>tumor necrosis factor</i>)
TNT	Trinitrotoluène
TTR	Transthyréline
UDP-GT	Uridine diphosphoglucuronyltransférase
UMP	Uridine monophosphate
VCAM	Molécule d'adhérence vasculaire (<i>vascular adhesion molecule</i>)
VLA	Gène d'activation tardive (<i>very late antigen</i>)
ZnCl ₂	Chlorure de zinc
ZO	<i>Zona occludens</i>
γ-BHC	Gamma benzene hexachlorure



INTRODUCTION

à l'écotoxicologie moléculaire

ÉMILIE PELLETIER

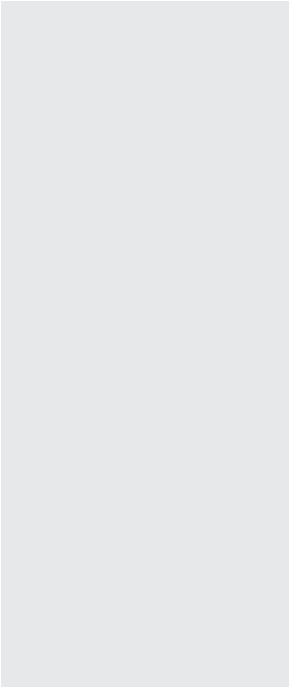
*Université du Québec à Rimouski,
Institut des sciences de la mer de Rimouski*

PETER G.C. CAMPBELL

*Université du Québec,
INRS Eau, Terre et Environnement*

FRANCINE DENIZEAU

*Université du Québec à Montréal,
Département de chimie et biochimie*



L'écotoxicologie se définit de façon concise comme étant *la science qui traite de l'impact des composés chimiques sur les écosystèmes*. Cette science, qui intègre la chimie, la toxicologie et l'écologie, a fait ses premiers pas il y a un peu plus de trente ans lorsque le professeur René Truhaut a défini cette nouvelle discipline comme une branche de la toxicologie concernée par l'étude des effets toxiques causés par les polluants sur les constituants des écosystèmes (voir Truhaut, 1977). C'est effectivement au cours des années 1970 et au début des années 1980 que les concepts et les méthodes propres à l'écotoxicologie se sont peu à peu développés, donnant lieu à la publication de plusieurs ouvrages qui cherchaient de plus en plus à intégrer les différents savoirs disciplinaires en une approche fonctionnelle portant à la fois sur l'effet des contaminants sur les écosystèmes et sur le rôle des écosystèmes eux-mêmes dans le devenir des contaminants (Butler, 1978 ; Moriarty, 1983 ; Nürnberg, 1984 ; Ramade, 1979). L'ouvrage de Levin et ses collaborateurs, publié en 1989, nous paraît particulièrement important parce qu'il fournit une excellente synthèse de l'avancement des connaissances à la fin des années 1980 et surtout parce que les auteurs abordent la question de l'écotoxicologie prédictive par l'intégration de résultats expérimentaux à des modèles écologiques comportant des bases mathématiques solides avec une bonne compréhension du comportement physico-chimique des composés chimiques dans l'environnement. L'approche de la fugacité développée par le professeur Donald Mackay à l'Université de Toronto en est un exemple exceptionnel montrant comment des connaissances très disciplinaires en physique et chimie peuvent servir à décrire le comportement complexe des composés chimiques dans les différents compartiments de l'environnement (Mackay, 1991).

L'idée d'utiliser des microcosmes (ou mésocosmes selon leur taille) pour obtenir des données expérimentales en écotoxicologie provient d'abord des écologistes marins qui ont cherché à reproduire à petite échelle des phénomènes difficiles à observer en pleine mer (Grice et Reeve, 1980). Le Marine Ecosystem Research Laboratory (MERL) a été pendant les années 1980 le haut lieu de la recherche sur le comportement des substances chimiques en présence d'organismes marins plus ou moins organisés en populations et communautés pélagiques ou benthiques (Gearing et Gearing, 1983). Des microcosmes d'eau douce ont aussi été développés pour comprendre les mécanismes de bioaccumulation et les effets de contaminants chez les invertébrés et les poissons (Boudou et Ribeyre, 1989).

Plusieurs ouvrages publiés depuis les années 1990 ont mis l'accent sur l'évaluation des impacts des contaminants sur les écosystèmes et sur les risques pour les humains et les organismes de vivre en contact avec des environnements pollués (Landis et Yu, 1995 ; Wright et Welborn, 2002). Ainsi, la seconde édition de l'imposant ouvrage de Gary Rand sur la

toxicologie aquatique (Rand, 1995) consacre maintenant quinze chapitres (350 pages) à l'évaluation des risques environnementaux alors que la première édition (Rand et Petrocelli, 1985) n'en comportait que quatre (62 pages), preuve tangible des progrès enregistrés en matière de législation et de méthodes de caractérisation du risque associé à la contamination des écosystèmes. Ces méthodes ont progressé parce que notre compréhension des mécanismes fondamentaux qui régissent les modes d'action des composés chimiques sur les processus vitaux a progressé et que des bioindicateurs qui permettent de poser un diagnostic environnemental de qualité ont été développés. Le développement d'une écotoxicologie appliquée à l'évaluation des risques et au suivi de la santé des écosystèmes passe par la mise au point d'outils de diagnostic à la fois sensibles et pertinents au plan écologique (Huggett *et al.*, 1992). Ces outils sont le plus souvent regroupés sous le vocable de « biomarqueurs » et divisés en sous-groupes en fonction de l'utilisation qu'on veut en faire, soit pour déterminer les niveaux d'exposition (bioaccumulation de xénobiotiques ou formation de métabolites), soit pour caractériser les effets toxiques à partir du niveau cellulaire jusqu'au niveau d'un écosystème entier. Il n'existe pas de « biomarqueur universel » qui fournirait l'état de santé d'un écosystème donné ou même d'une population spécifique au sein d'un écosystème. La solution préconisée en santé environnementale, tout comme d'ailleurs en santé humaine, est l'utilisation d'une batterie de tests (ou marqueurs biologiques) qui permette au « clinicien environnemental » de détecter la présence d'un ou plusieurs stressors et d'en déterminer les effets sur des individus, des populations et des communautés.

Notre ouvrage sur *l'écotoxicologie moléculaire* se présente comme une suite logique aux travaux fondamentaux entrepris au cours des années 1990 (Malins et Ostrander, 1993) sur les mécanismes biochimiques et cellulaires faisant intervenir une ou plusieurs substances chimiques, particulièrement les métaux et les petites molécules organiques ayant un caractère persistant dans l'environnement. Les chapitres de ce livre ont été ordonnés de façon à montrer le passage progressif d'une approche mécanistique de nature chimique et biochimique à une approche de nature plus toxicologique aux niveaux cellulaire et tissulaire.

Les deux premiers chapitres proviennent de l'équipe de chercheurs dirigée par les professeurs Peter G.C. Campbell, Bernadette Pinel-Alloul et Ladis Hare qui œuvre depuis déjà plusieurs années à comprendre l'action toxicologique des métaux chez les organismes aquatiques et à relier la présence de certains métaux traces, comme le cadmium dans des lacs du nord du Québec, à des indicateurs d'exposition et d'effets toxiques chez les bivalves indigènes. On trouve dans le premier de ces deux textes une analyse approfondie des mécanismes d'interaction chimique et biochimique des métaux avec la cellule vivante et sur les outils dont

dispose cette cellule pour contrôler son environnement intracellulaire et se défendre contre l'intrusion des ions métalliques. Les rôles de régulation et de défense cellulaire dévolus de la métallothionéine y sont discutés dans une perspective d'utilisation de cette protéine comme biomarqueur d'exposition aux métaux. Le deuxième texte décrit une application sur le terrain de l'outil « métallothionéine » chez un bivalve d'eau douce, *Pyganodon grandis*, choisi comme espèce sentinelle. La présence d'un gradient de contamination en cadmium entre une dizaine de lacs de la région de Rouyn-Noranda au nord du Québec offre un cadre expérimental exceptionnel permettant de relier la présence du cadmium à l'état de santé général des moules et à la mise en place de leurs moyens de défense cellulaires.

Le troisième chapitre, préparé par le professeur Michel Sylvestre et son équipe de recherche de l'INRS-Institut Armand-Frappier, aborde le sujet très novateur de la biologie moléculaire appliquée à l'écotoxicologie. Les auteurs montrent les progrès très récents et prometteurs d'une technique appelée « évolution moléculaire *in vitro* par recombinaison aléatoire ». Cette technique reproduit à l'échelle moléculaire ce que l'évolution a réalisé sur des millions d'années et ouvre la porte à des modifications génétiques qui permettront par exemple de transformer des bactéries pour les rendre capables de dégrader des contaminants encore récalcitrants aux attaques enzymatiques. La différence essentielle avec les méthodes classiques de sélection des souches actives est que l'évolution des nouveaux gènes se fait beaucoup plus rapidement que par sélection naturelle. Cette approche ainsi que d'autres méthodes en ingénierie moléculaire sont décrites en détail et appliquées au cas des biphényles polychlorés (BPC) ainsi que d'autres composés organiques persistants. Cette approche mécanistique est fascinante, car elle montre les voies d'application de la génomique et de la protéomique aux problématiques environnementales. Les auteurs discutent aussi très franchement des risques réels que pourraient représenter les organismes génétiquement modifiés.

Le quatrième chapitre est aussi un texte nettement orienté sur les mécanismes chimiques et biochimiques au niveau cellulaire qui s'inscrit dans une suite logique avec les chapitres précédents. La question des perturbateurs endocriniens a été et reste au cœur de l'actualité environnementale puisque de nombreux xénobiotiques sont capables d'affecter le système endocrinien et par conséquent d'agir à plusieurs niveaux d'organisation tant anatomique que fonctionnelle, aussi bien chez le poisson que chez les invertébrés. Le texte de la professeure Hontela et de son collaborateur nous présente une synthèse des travaux les plus récents sur la défaillance cortisolique induite entre autres par les métaux, ainsi que sur les stress oxydatifs provoqués par la présence de nombreux contaminants

organiques. Ces travaux ont mené les chercheurs à proposer l'utilisation de biomarqueurs hormonaux sur le terrain afin de détecter la présence et l'action des perturbateurs anthropiques. Les auteurs montrent les difficultés que présente l'interprétation des résultats fournis par ces biomarqueurs dans un contexte environnemental où des dizaines de substances peuvent agir simultanément et où les organismes peuvent et doivent s'adapter à leur environnement.

Le chapitre 5, proposé par le professeur Spear et ses collaborateurs, nous plonge dans la chimie et la biochimie des rétinoïdes, petites molécules essentielles à plusieurs fonctions biologiques dont la différenciation cellulaire et la vision. Or, le métabolisme des rétinoïdes est sensible à la présence des contaminants environnementaux et une carence en rétinoïdes est considérée comme dommageable pour la santé des organismes aquatiques. Ce texte présente une revue très exhaustive sur le stockage des rétinoïdes chez diverses espèces animales et montre comment ce stockage peut être utilisé comme un biomarqueur d'exposition sensible à la présence de contaminants lipophiles persistants ou non chez les oiseaux et les poissons. La deuxième partie du chapitre nous entraîne vers l'écotoxicologie appliquée en décrivant comment les rétinoïdes ont été utilisés dans l'application de grands programmes de surveillance environnementale sur les Grands Lacs et le fleuve Saint-Laurent au cours des années 1980 et 1990.

Tout en restant fermement ancré au monde des indicateurs chimiques et biochimiques, le chapitre 6, préparé par le professeur Pelletier et ses collaborateurs, nous présente un exemple d'interactions multiples en écotoxicologie, un secteur de connaissances encore peu exploré mais combien important quand vient le temps d'interpréter des résultats de biomarqueurs d'exposition pouvant répondre simultanément à des stressors ayant des actions synergiques ou antagonistes. Ce chapitre présente les résultats récents de deux expériences *in vivo* où des salmonidés ont été exposés simultanément au benzo(a)pyrène (BaP) et au tributylétain (TBT) dont les actions individuelles sur le cytochrome P450 sont déjà bien documentées. Le texte montre comment une batterie de biomarqueurs, allant de l'activité de l'EROD jusqu'aux microlésions hépatiques en passant par les adduits à l'ADN, peut être utilisée pour quantifier les effets antagonistes ou synergiques du BaP et du TBT et surtout pour comprendre les mécanismes biochimiques qui sous-tendent ces effets. Les auteurs proposent une nouvelle approche pour l'étude des interactions chimiques qui passe par la prédiction d'interactions en se basant sur les voies métaboliques des polluants et sur leur capacité de moduler l'activité du P450, le système enzymatique clé impliqué à la fois dans la bioactivation et la détoxification des polluants organiques.

Le texte suivant, rédigé par le professeur Daniel Cyr et son équipe de l'INRS-Institut Armand-Frappier, nous amène à examiner les effets des contaminants environnementaux sur les interactions cellule-cellule, afin de mieux comprendre les mécanismes de toxicité au niveau cellulaire. C'est le monde des protéines membranaires, comme les sélectines et les intégrines, qui régissent les interactions entre les cellules du système immunitaire et des cellules endothéliales. Quoiqu'il existe encore peu de travaux dans ce domaine particulier, on comprend que toute modulation de la synthèse de ces protéines peut entraîner d'importantes conséquences au niveau du système immunitaire. Ce chapitre présente les développements les plus récents en toxicologie cellulaire et cherche à comprendre comment certains xénobiotiques qui agissent sur les jonctions lacunaires peuvent induire la prolifération cellulaire et le développement de tumeurs. Dans un deuxième temps, les auteurs décrivent le rôle joué par les cadhérines dans les jonctions adhérentes entre cellules et montrent comment un métal comme le cadmium peut agir sur les cadhérines et éventuellement dérégler les interactions cellule-cellule. Ce chapitre marque une transition entre les chapitres précédents, plutôt axés sur les mécanismes biochimiques intra-cellulaires, et les deux chapitres suivants, qui utilisent la signalisation cellulaire et la réponse du système immunitaire pour quantifier des effets toxiques observés sur le terrain.

Le chapitre 8, produit par la professeure Pellerin et son équipe d'étudiants, illustre fort bien l'utilisation des biomarqueurs pour des fins d'évaluation de la santé environnementale de populations de bivalves marins. La gamme des biomarqueurs utilisés s'étale de la mesure du stress oxydant jusqu'à la détermination histologique des stades de maturation sexuelle en passant par la stabilité de la membrane lysosomale et les mesures du potentiel de croissance et des réserves énergétiques permettant aux organismes de survivre aux multiples stressseurs tant anthropiques que naturels. Ces travaux montrent que l'intégration des signaux moléculaires et cellulaires permet de formuler un diagnostic environnemental pour plusieurs sites marins. Les résultats obtenus sur le terrain montrent l'importance d'une meilleure compréhension de la stéroïdogénèse et de la vitellogénèse chez les bivalves, notamment la mye *Mya arenarias*, qui montre un excellent potentiel comme organisme sentinelle de l'estuaire du Saint-Laurent.

Enfin, on ne pouvait présenter un ouvrage sur l'écotoxicologie moléculaire sans y consacrer un chapitre aux effets immunotoxiques des contaminants et aux méthodes de détection des différentes réponses immunitaires. Sachant que le système immunitaire est une cible particulièrement importante pour nombre de contaminants environnementaux, il apparaît clairement que tous les niveaux de l'organisation biologique peuvent

montrer une sensibilité élevée à la présence de substances chimiques capables de moduler l'activité immune et fragiliser le système de défense contre les pathogènes. Les auteurs du chapitre 9 ont particulièrement porté attention aux biomarqueurs immunologiques chez les invertébrés (activité des lysosomes, phagocytose, dérivés oxygénés) et à l'immunotoxicologie chez les amphibiens, dont le système immunitaire marque une transition entre les invertébrés aquatiques et les vertébrés terrestres.

La succession de ces neuf chapitres montre toute la vigueur et la diversité de la recherche en écotoxicologie dans les universités au Québec. On voit une convergence remarquable de tous ces laboratoires et équipes de recherches à approcher l'écotoxicologie d'un point de vue moléculaire et cellulaire et de chercher à comprendre les mécanismes qui régissent les interactions entre la matière inerte et le monde vivant, entre les molécules chimiques et la cellule capable de réagir et se défendre face à son agresseur. S'il fallait fournir une définition de l'écotoxicologie moléculaire en regard du contenu de cet ouvrage, on pourrait probablement avancer que cette branche de l'écotoxicologie traite tout particulièrement *des mécanismes fondamentaux de la défense cellulaire face aux stress du milieu et de l'application de la biochimie et de la biologie moléculaire aux problématiques environnementales complexes auxquelles notre société est quotidiennement confrontée.*

Ce livre s'adresse aux étudiants des deuxième et troisième cycles et aux chercheurs du domaine de la toxicologie environnementale et de l'écotoxicologie au sens large. Il se veut une première tentative d'intégration de travaux très diversifiés en écotoxicologie et montre le défi qui s'offre aux futurs chercheurs du domaine qui consiste au fond à trouver des causes moléculaires et cellulaires à des effets qui s'observent à l'échelle des populations et des communautés naturelles.

RÉFÉRENCES

- BOUDOU, A. et F. RIBEYRE (1989). *Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies*, Boca Raton, FL, CRC Press.
- BUTLER, G.C. (1978). « Principles of ecotoxicology », *SCOPE*, vol. 12, New York, Wiley and Sons.
- DALLINGER, R. et P.S. RANBOW (1993). *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*, Boca Raton, FL, Lewis Publishers.
- GEARING, J.N. et P.J. GEARING (1983). « The effects of suspended load and solubility on sedimentation of petroleum hydrocarbons in controlled estuarine ecosystems », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 40, p. 54-62.
- GRICE, G.D. et M.R. REEVE (1980). *Marine Mesocosms: Biological and Chemical Research in Experimental Ecosystems*, New York, Springer-Verlag.
- HUGGETT, R.J. et al. (1992). *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*, Boca Raton, FL, Lewis Publishers.
- LANDIS, W.G. et M.H. YU (1995). *Introduction to Environmental Toxicology: Impacts of Chemicals upon Ecological Systems*, Boca Raton, FL, Lewis Publishers.
- LEVIN, S.A. et al. (1989). *Ecotoxicology: Problems and Approaches*, New York, Springer-Verlag.
- MACKAY, D. (1991). *Multimedia Environmental Models: The Approach of Fugacity*, Chelsea, MI, Lewis Publishers.
- MALINS, D.C. et G.K. OSTRANDER (1993). *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*, Boca Raton, FL, Lewis Publishers.
- MORIARTY, F. (1983). *Ecotoxicology: The Study of Pollutants in Ecosystems*, Londres, Academic Press.
- NÜRNBERG, H.W. (1984). *Pollutants and Their Ecotoxicological Significance*, Chichester, John Wiley and Sons.
- RAMADE, F. (1979). *Écotoxicologie*, 2^e édition, Paris, Masson.
- RAND, G.M. (1995). *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*, 2^e édition, Washington, Taylor and Francis.
- RAND, G.M. et S.R. PETROCELLI (1985). *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications*, New York, Hemisphere Publishing Corporation.
- TRUHAUT, R. (1977). « Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, n° 1, p. 151-173.
- WRIGHT, D.A. et P. WELBORN (2002). *Environmental Toxicology*, Cambridge, UK, Cambridge University Press.

CHAPITRE

1

PRISE EN CHARGE ET DÉTOXICATION DES MÉTAUX chez les organismes aquatiques

PETER G.C. CAMPBELL

*Université du Québec,
INRS Eau, Terre et Environnement*

YVES COUILLARD

*Environnement Canada,
Division de l'évaluation des produits chimiques*

RÉSUMÉ

Les espèces métalliques les plus communes dans les eaux naturelles sont de nature hydrophile, alors que les barrières biologiques que doivent franchir les métaux sont plutôt de caractère lipophile. À quelques exceptions près, les métaux cationiques et leurs complexes ne peuvent traverser des membranes biologiques par simple diffusion ; au contraire, la prise en charge (*uptake*) des métaux fait généralement appel au transport facilité, impliquant des transporteurs protéiques intégrés dans la membrane. Trois mécanismes de prise en charge ont été identifiés : *i*) transport facilité du cation, impliquant soit un transporteur trans-membranaire protéique, soit un canal trans-membranaire ; *ii*) transport facilité d'un complexe métallique anionique, impliquant un transporteur d'anions relativement peu sélectif (transport « accidentel » de l'anion + le métal qui y est associé) ; *iii*) transport passif, par simple diffusion, d'un complexe métallique neutre et lipophile (p. ex., HgCl_2^0). Normalement c'est la voie (i) qui prédomine ; dans de tels cas le modèle du ligand biotique (BLM) s'applique et la réponse de l'organisme varie en fonction de la concentration de l'ion métallique libre en solution, $[\text{M}^{z+}]$, et de la concentration d'autres ions pouvant concourir avec M^{z+} pour le ligand biotique (Ca^{2+} , Mg^{2+} et H^+).

L'action toxicologique d'un métal, une fois accumulé, découle de son interaction anormale avec une biomolécule essentielle. Cette liaison d'un métal « inapproprié » à des molécules physiologiquement importantes peut induire des effets délétères de différentes manières : en bloquant des groupements fonctionnels essentiels de la biomolécule (souvent des groupements thiol) ; en déplaçant des métaux essentiels de leurs sites chez la biomolécule ; en modifiant la conformation (et donc l'activité) de la biomolécule. Dans ce cadre conceptuel, on peut envisager trois mécanismes de « détoxification » : l'organisme peut agir *i*) sur le flux d'entrée (contrôle du transport trans-membranaire), *ii*) sur les ligands intracellulaires disponibles (nature, concentration et compartimentalisation cellulaire), et *iii*) sur les flux de sortie (vers des vacuoles ou vers l'extérieur de la cellule). Si l'organisme emploie le mécanisme (i) et/ou le mécanisme (iii), les teneurs intracellulaires du métal seront contrôlées à l'intérieur d'une gamme étroite (cas des organismes « régulateurs ») ; si la cellule réagit plutôt en synthétisant des ligands d'affinité appropriée (mécanisme (ii)), qui permettent de séquestrer le métal dans le milieu intracellulaire et de le rendre non-disponible (p. ex., la métallothionéine, ou « MT »), les teneurs intracellulaires en métal seront généralement élevées et varieront en fonction de l'exposition (cas des organismes « accumulateurs »).

Selon ce modèle intégré de toxicité/détoxification, la détermination de la spéciation intracellulaire des métaux pourrait en principe s'avérer utile pour diagnostiquer l'état physiologique d'un organisme (concept d'un biomarqueur d'effets). Il s'agirait de pouvoir différencier les métaux liés à des biomolécules sensibles de ceux qui ont été séquestrés à l'intérieur de la cellule sous forme inerte. On approfondit cette idée dans la dernière section de ce chapitre, en mettant un accent particulier sur la métallothionéine, un peptide reconnu comme ligand clé pour les métaux dans le milieu subcellulaire. On passe en revue les propriétés biochimiques, la biosynthèse et la dégradation de ce peptide clé, et on considère ensuite les diverses fonctions cellulaires qui lui ont été attribuées, en insistant sur son rôle dans la régulation des métaux essentiels, sa protection contre le stress oxydant et son implication possible dans la détoxification des métaux traces.

1. INTRODUCTION

1.1. CONTAMINATION ENVIRONNEMENTALE

En abordant le sujet de la contamination environnementale, il convient de considérer séparément les contaminants inorganiques (surtout métaux) et les (micro)polluants organiques. Ces derniers furent à l'origine de la prise de conscience environnementale des années 1960 (p. ex., Carson, 1962) et ils sont abondamment étudiés depuis ce premier réveil (voir Sylvestre, chapitre 3). En contraste, la contamination des écosystèmes aquatiques par les métaux a été quelque peu négligée pendant cette période, avec l'exception évidente du mercure (dont le comportement environnemental s'apparente à celui des contaminants organiques, au moins dans le cas de sa forme la plus nocive, le méthyl-mercure). On pourrait même dire que les micro-polluants organiques ont dominé le calendrier environnemental pendant cette période. L'approche réglementaire adoptée par les agences environnementales, avec son accent sur la persistance, la bioaccumulation et la toxicité (P-B-T) d'un produit comme critères d'évaluation du risque, reflète cette dominance.

L'idée d'aborder séparément les contaminants organiques et inorganiques n'est pas le résultat d'une simple formule éditoriale. Au contraire, il y a de bonnes raisons scientifiques pour considérer séparément les métaux et les micro-polluants organiques (tableau 1.1). Il importe de noter dès le départ que les métaux sont naturellement présents dans la croûte terrestre et qu'ils ne sont ni créés ni détruits par les activités humaines (différence importante par rapport aux substances xénobiotiques et aux micro-polluants organiques synthétiques). Les métaux ne sont donc pas sujets à la biodégradation, mais ils peuvent subir des transformations réversibles dans l'environnement naturel (p. ex., changements de « spéciation » – cf. section 2.1). Plusieurs métaux et métalloïdes sont essentiels à la vie biologique (p. ex., le cuivre (Cu), le cobalt (Co), le fer (Fe), le manganèse (Mn), le nickel (Ni) et le zinc (Zn)) et leur présence dans le milieu ambiant est essentielle ; on ne peut en dire autant des contaminants organiques. La bioaccumulation des métaux essentiels est donc un processus naturel, exigé par tous les organismes vivants afin de satisfaire à leurs besoins métaboliques. Plusieurs organismes ont développé des mécanismes efficaces pour contrôler leurs concentrations internes de métaux essentiels et pour maintenir celles-ci dans des gammes relativement restreintes (contrôle homéostatique). Comme nous le verrons dans ce chapitre, ces mécanismes de contrôle homéostatique peuvent également jouer un rôle dans la détoxification de métaux non essentiels (p. ex., le cadmium (Cd), le plomb (Pb) ou le mercure (Hg)).

Tableau 1.1**Comparaison écotoxicologique entre les métaux traces et les micro-polluants organiques**

Métaux	Micro-polluants organiques
<ul style="list-style-type: none"> • Naturellement présents dans la croûte terrestre ; nombre limité par le Tableau périodique des éléments • Pas sujets à la (bio)dégradation, mais peuvent subir des transformations de forme (changements de spéciation) ; ces changements sont réversibles • Plusieurs métaux et métalloïdes sont essentiels à la vie biologique (p. ex., Cu, Co, Fe, Mn, Ni, Zn) • Bioaccumulation implique généralement la prise en charge de formes hydrophiles (transport membranaire facilité) • Chez plusieurs organismes il existe des mécanismes efficaces pour contrôler les concentrations internes de certains métaux essentiels (contrôle homéostatique) 	<ul style="list-style-type: none"> • Naturellement absents de la croûte terrestre (composés synthétiques, « xénobiotiques ») ; nombre presque sans limite, et croissant • Sujets à la (bio)dégradation, à des degrés divers (composés labiles → composés réfractaires) ; ces changements sont généralement irréversibles • Jamais essentiels à la vie biologique • Bioaccumulation implique généralement la prise en charge de formes lipophiles (transport membranaire par simple diffusion) • Aucun processus équivalent

1.2. IDENTIFICATION DE MÉTAUX PRIORITAIRES

Parmi les différences entre contaminants inorganiques et organiques, il y en a une qui simplifiera notre traitement contrairement à la situation : des produits organiques synthétiques, dont le nombre ne cesse de croître, dans le cas des contaminants métalliques on se trouve limité par la réalité du Tableau périodique des éléments (~80 métaux et métalloïdes). Comment doit-on identifier les métaux « prioritaires » parmi ceux-ci, dans un contexte écotoxicologique ? Wood (1976) a proposé une classification des métaux et métalloïdes en trois catégories : *a*) « éléments inoffensifs » ; *b*) « éléments très toxiques et relativement accessibles » ; et *c*) « éléments toxiques mais insolubles ou très rares » (tableau 1.2). Campbell *et al.* (1985) se sont inspirés de cette première classification en choisissant la catégorie *b*) et en y ajoutant une évaluation du degré de perturbation du cycle géochimique naturel du métal par les activités humaines.

Tableau 1.2

Classification des éléments métalliques dans un contexte environnemental (adapté de Wood, 1976 ; voir aussi Campbell et al., 1985)

A. Éléments inoffensifs		B. Éléments très toxiques et relativement accessibles		C. Éléments toxiques mais insolubles ou très rares	
Ca	calcium	Ag	argent	Ba	baryum
Fe	fer	Al ^{2,4}	aluminium	Ga	gallium
K	potassium	As ^{3,4}	arsenic	Hf	hafnium
Li	lithium	Au	or	In	indium
Mg	magnésium	Be	béryllium	La	lanthane
Mn ¹	manganèse	Bi	bismuth	Nb	niobium
Na	sodium	Cd ⁴	cadmium	Os	osmium
Rb	rubidium	Co	cobalt	Re	rhénium
Si	silicium	Cr ⁴	chrome	Rh	rhodium
Sr	strontium	Cu ⁴	cuivre	Ru	ruthénium
		Hg ⁴	mercure	Ta	tantale
		Ni ⁴	nickel	Ti	titane
		Pb ⁴	plomb	W	tungstène
		Pd	palladium		
		Pt	platine		
		Sb	antimoine		
		Se ³	sélénium		
		Sn ⁴	étain		
		Te	tellure		
		Tl	thallium		
		Zn ⁴	zinc		

- Notes :
1. Wood (1976) n’a pas classifié le manganèse, puisque selon lui cet élément « couvrait plus d’une catégorie », et il semble avoir « oublié » le chrome.
 2. Wood (1976) a caractérisé l’aluminium d’ « inoffensif », mais actuellement, à la lumière notamment des recherches réalisées sur les précipitations acides, il faudrait le placer dans la catégorie B.
 3. L’arsenic et le sélénium sont des métalloïdes.
 4. Élément identifié par Environnement Canada comme substance d’intérêt prioritaire. Cr = Cr(VI) ; Sn = composés organométalliques ; Al = sels utilisés dans le traitement des eaux ; Cu = rejets des fonderies de Cu ; Zn = rejets des fonderies de Zn. Pour de plus amples renseignements sur l’établissement de listes de substances prioritaires (LSP) dans le cadre de la *Loi canadienne sur la protection de l’environnement*, voir Environnement Canada (1997).

Dans un cycle géochimique naturel, non perturbé, on peut identifier plusieurs sources naturelles de métaux : l'altération naturelle des roches présentes à la surface terrestre (*weathering*) ; les émanations volcaniques ; les fentes sous-marines hydrothermales (*deep-sea vents*). À celles-ci s'ajoutent des sources anthropiques possibles de métaux : sources ponctuelles, comme les effluents miniers ou les effluents d'usines impliquées dans la transformation des métaux, ainsi que des sources diffuses comme les fonderies impliquées dans le raffinage de minerais sulfureux. À ces sources évidentes s'en ajoute une dont l'implication est plus subtile : les pluies acides et l'acidification des sols peuvent mobiliser (« mettre en circulation ») des métaux, constituant ainsi une source diffuse indirecte. Dans ce contexte, une première question clé se pose : Quelles sont les contributions relatives des sources naturelles et des sources anthropiques aux quantités de métaux couramment présentes dans la partie superficielle de la terre ?

Sachant qu'il existe pour chaque élément un « bruit du fond » ou *background* (qui n'existe évidemment pas dans le cas des composés organiques xénobiotiques), il s'agit de déterminer si ce bruit du fond a été perturbé par les activités anthropiques. Pour y arriver, il convient de considérer le comportement des métaux dans l'atmosphère ; les concentrations de métaux dans ce compartiment environnemental étant normalement très faibles, il est plus facile d'y détecter l'influence des activités humaines. On peut

- comparer pour chaque élément le taux d'émission de sources naturelles à celui de sources anthropiques = « facteur de mobilisation » ;
- comparer pour chaque élément sa concentration dans les aérosols atmosphériques à celle dans des matrices naturelles non perturbées = « facteur d'enrichissement » ;
- déterminer pour chaque élément les tendances temporelles de sa concentration dans la déposition atmosphérique.

L'application de ces trois critères a permis d'identifier neuf métaux et deux métalloïdes dont les cycles géochimiques avaient incontestablement été perturbés par les activités anthropiques, à savoir : l'argent (Ag), le cadmium (Cd), le cuivre (Cu), le plomb (Pb), le manganèse (Mn), le mercure (Hg), le nickel (Ni), le vanadium (V), le zinc (Zn) ; l'arsenic (As), le sélénium (Se) (Campbell *et al.*, 1985).

Il faut raffiner ce premier résultat de tri en y ajoutant des considérations de la toxicité inhérente du métal (Kaiser, 1980 ; Newman et McCloskey, 1996 ; Tatara *et al.*, 1997), permettant d'établir des seuils de concentration à partir desquels le métal pourrait exercer des effets toxiques. Ensuite il faut comparer ces seuils aux concentrations qui risquent de se

présenter dans le milieu récepteur. Cette approche relève du domaine de l'évaluation de risque écotoxicologique et nous encourageons le lecteur à consulter la documentation pertinente (CCME, 1996 ; Chapman, 1996 ; Chapman *et al.*, 1998 ; Chapman et Wang, 2000 ; Suter, 1993). L'application de ces critères mène à l'identification du cadmium, du cuivre, du plomb et du zinc comme métaux d'intérêt prioritaire (tableau 1.2), et ce sont ces métaux et leurs complexes qui retiendront notre attention. À ceux-ci s'ajouteraient certainement le mercure (surtout le méthyl-mercure, produit de la méthylation *in situ* du mercure inorganique) et certains organométaux synthétiques comme le tributyl-étain (TBT), employé comme agent pour empêcher les salissures (*fouling*) sur la coque des bateaux (voir Padrós et Pelletier, chapitre 6). Cependant, puisque le comportement écotoxicologique de ces composés organométalliques diffère considérablement de celui des métaux cationiques (Cd, Cu, Pb, Zn), nous ne les considérerons pas dans le contexte du présent chapitre.

1.3. PLAN DU CHAPITRE

Ce chapitre comporte deux sections complémentaires, qui sont complétées par l'étude de cas présentée dans le chapitre suivant. Dans la première section, qui se veut une introduction générale à la toxicologie des métaux chez la faune et la flore aquatiques, on traite d'abord des mécanismes de prise en charge (*uptake*) des métaux chez ces organismes, pour ensuite considérer comment ces métaux peuvent exercer leurs effets toxiques, une fois accumulés. Cette discussion mène naturellement à un examen des mécanismes de détoxification, où on introduit la notion de répartition subcellulaire des métaux, et on explore la possibilité que ce paramètre puisse être utilisé pour diagnostiquer l'état de santé d'un organisme exposé aux métaux (concept d'un biomarqueur d'effets).

Ayant introduit l'idée de répartition subcellulaire des métaux, nous mettons l'accent sur un des acteurs principaux dans le milieu subcellulaire, la métallothionéine. Cette deuxième section du chapitre passe en revue les propriétés biochimiques, la biosynthèse et la dégradation de ce peptide clé. On considère ensuite les diverses fonctions cellulaires qui ont été attribuées à ce peptide clé, en insistant sur son rôle dans la régulation des métaux essentiels, sa protection contre le stress oxydant et son implication possible dans la détoxification des métaux traces. Cette section se termine par un examen critique du potentiel de la métallothionéine comme biomarqueur pour les métaux.

Signalons que ce « modèle écotoxicologique » est confronté à la réalité du terrain au chapitre 2, où on présente une étude de cas portant sur un mollusque d'eau douce, *Pyganodon grandis*, un organisme filtreur qui vit naturellement dans des lacs du Bouclier canadien et qui offre beaucoup de potentiel comme organisme « sentinelle ».

2. TOXICOLOGIE AQUATIQUE DES MÉTAUX – NOTIONS

2.1. CHIMIE ENVIRONNEMENTALE

Avant d'aborder la toxicologie aquatique des métaux qui retiennent notre attention (Cd, Cu, Pb, Zn), il faut rappeler certains aspects de la spéciation des métaux. Par « spéciation » d'un métal on entend sa répartition parmi différentes formes physiques ou chimiques (Templeton *et al.*, 2000). La « spéciation physique » d'un métal fait appel à sa distribution entre des formes particulières (p. ex., >200 nm), colloïdales (10–200 nm) ou dissoutes (< 10 nm), alors que la « spéciation chimique » d'un élément renvoie surtout à son implication dans la formation de divers complexes de coordination. Dans ce dernier cas, pour un métal cationique, on peut considérer les formes suivantes (figure 1.1 ; tableau 1.3) :

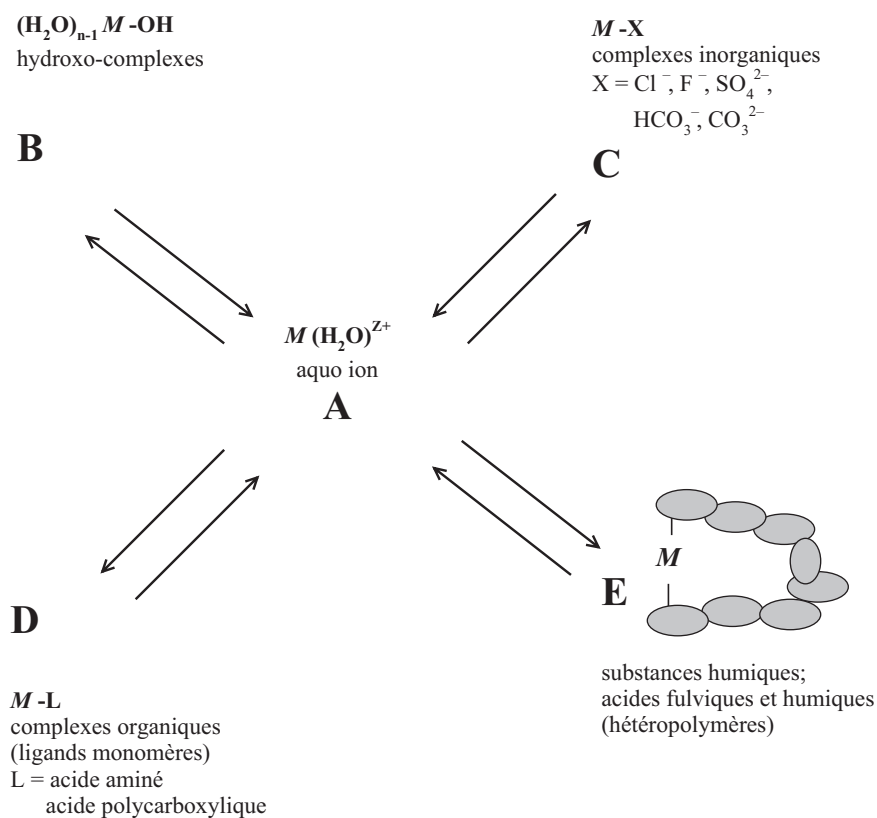
Tableau 1.3

Spéciation chimique des métaux*

Forme (A → E dans la figure 1.1)	Exemples
A. Ion métallique libre	$\text{Al}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_6$ $\text{Cu}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6$
B. Hydroxo-complexes	AlOH^{2+} , $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ FeOH^{2+} , $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$ $\text{Cu}(\text{OH})_2^0$
C. Complexes simples inorganiques	AlF_2^+ , AlF_2^+ CdCl^+ , CdCl_2^0 , CdCl_3^- HgCl_2^0 , HgOHCl^0 CuCO_3^0 CdSO_4^0
D. Complexes simples organiques	
i) synthétiques	Cu-EDTA^{2-} Cd-NTA^-
ii) naturels	Cd-alanine Cd-citrate Fe-sidérophore
E. Complexes polymères organiques	$\text{Al, Fe, Cu, Pb ou Hg - acide fulvique ou humique}$

* Exemples de formes ou d'espèces métalliques qui sont potentiellement importantes sur le plan toxicologique.

- l'ion métallique libre (p. ex., Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+})
- des complexes inorganiques, impliquant les anions inorganiques couramment trouvés dans les eaux naturelles (p. ex., HO^- , F^- , Cl^- , HCO_3^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$)
- des complexes organiques, impliquant des ligands monomères simples (p. ex., acides aminés, acides hydroxamiques, acides polycarboxyliques)
- des complexes organiques, impliquant des ligands polymères complexes (p. ex., acides fulviques et humiques ; protéines).

Figure 1.1**Schéma général montrant la spéciation chimique des métaux en solution**

La répartition du métal **M** entre les formes A, B, C et D peut se calculer à l'aide de la modélisation des équilibres chimiques.

Tel qu'indiqué à la figure 1.1, l'ion métallique libre joue un rôle central dans la spéciation des métaux dissous. Il faut cependant noter que les cations métalliques ne sont jamais parfaitement « libres » en solution aqueuse – ils sont toujours associés à des molécules d'eau d'hydratation, $M^{z+}(H_2O)_n$, où n vaut normalement 4 ou 6. Cependant, par convention on écrit souvent « M^{z+} » sans indiquer la présence de la sphère d'hydratation.

Il importe de souligner le caractère dynamique de la distribution représentée à la figure 1.1. Les formes $A \rightarrow E$ sont toutes en équilibre, les unes avec les autres ; le métal s'échange rapidement entre les différents complexes, la demi-vie d'une espèce donnée étant généralement très courte (< 1 min), mais si les conditions ambiantes demeurent constantes, la distribution globale du métal entre les formes $A \rightarrow E$ ne change pas. Cependant, la distribution est souvent sensible à des variations de certains paramètres, notamment le pH ; les ajustements de la distribution en réponse à de tels changements dans les conditions physico-chimiques se produisent très rapidement et de manière réversible. Ces deux caractéristiques de la spéciation des métaux, à savoir la rapidité avec laquelle les équilibres s'établissent ainsi que la réversibilité des changements, différencient nettement les métaux des contaminants organiques.

La spéciation chimique d'un métal dissous dépendra entre autres de la composition de la solution (pH ; concentrations des divers ligands ; température) et de son affinité pour les ligands disponibles. Si les constantes d'équilibre sont connues pour ces diverses réactions, on peut s'en servir comme données d'entrée dans un modèle d'équilibres chimiques pour calculer la spéciation du métal (p. ex., Turner, 1995). À cause de la variabilité inévitable de la composition de la solution, la spéciation chimique d'un métal variera d'un milieu à un autre ; cependant, malgré cette variabilité inhérente, les propriétés intrinsèques du cation métallique s'avèrent encore plus importantes dans la détermination de la spéciation d'un métal et les mêmes tendances générales se manifestent dans divers milieux. À titre d'exemple, le tableau 1.4 présente la spéciation chimique des quatre métaux d'intérêt, telle que calculée pour une eau douce typique (en l'occurrence, l'eau d'un des Grands Lacs laurentiens, le lac Érié, en ne tenant compte que des ligands inorganiques). À l'examen de ce tableau on constate que la proportion du métal présente sous forme d'ions libres s'avère plus importante dans les cas du Cd et du Zn que pour le Cu ou le Pb ; les valeurs absolues changeront d'un milieu à un autre, mais cette tendance persistera. Ce genre de calcul peut également se faire avec des ligands organiques naturels, mais avec moins de confiance (notamment à cause de l'hétérogénéité de ces ligands et de leurs propriétés comme hétéropolymères et polyélectrolytes – Turner, 1995) ; de nouveau la proportion du métal présente sous forme d'ions libres s'avère plus importante dans les cas du Cd et du Zn que pour le Cu ou le Pb.

Tableau 1.4

Spéciation inorganique typique de quatre métaux traces (Cd, Cu, Pb, Zn) dans les eaux douces oxygènes

Métal	M ^{z+}	M(OH) _n	M(CO ₃)	M(Cl) _n	M(SO ₄)
Cd	84	<1	2 CdHCO ₃ ⁺ ; 6 CdCO ₃	5 CdCl ⁺	4 CdSO ₄
Cu	3	1 CuOH ⁺ ; 90 Cu(OH) ₂	5 CuCO ₃	<1	<1
Pb	14	10 PbOH ⁺	2 PbHCO ₃ ⁺ ; 73 PbCO ₃	<1	1 PbSO ₄
Zn	86	2 ZnOH ⁺ ; 2 Zn(OH) ₂	2 ZnHCO ₃ ⁺ ; 5 ZnCO ₃	<1	3 ZnSO ₄

Note :

composante	[] (mol/L)	composante	[] (mol/L)
Ca ²⁺	1,00 x 10 ⁻³	Cl ⁻	0,80 x 10 ⁻³
Mg ²⁺	0,30 x 10 ⁻³	SO ₄ ²⁻	0,30 x 10 ⁻³
Na ⁺	0,60 x 10 ⁻³	PO ₄ ³⁻	1,00 x 10 ⁻⁷
K ⁺	0,04 x 10 ⁻³	F ⁻	2,50 x 10 ⁻⁶
HCO ₃ ⁻	1,80 x 10 ⁻³		

Conditions générales : pH 7,6 ; T = 20 °C

Avant de passer de la spéciation des métaux à leur prise en charge par les organismes aquatiques, il importe de contraster la nature hydrophile des espèces métalliques communes (tableau 1.4) au caractère lipophile des barrières biologiques que devront franchir les métaux. À quelques exceptions près (p. ex., HgCl₂⁰), les métaux cationiques et leur complexes ne pourront traverser des membranes biologiques par simple diffusion ; la prise en charge (*uptake*) des métaux fera plutôt appel au transport facilité, impliquant des transporteurs protéiques intégrés dans la membrane.

2.2. PRISE EN CHARGE DES MÉTAUX

2.2.1. Considérations générales

Considérons d’abord la nature de l’interface abiotique/biotique. En s’approchant d’une surface biologique (branchies, tégument, paroi cellulaire, etc.), le métal rencontrera souvent une couche protectrice composée soit de polysaccharides (p. ex., parois cellulaires chez les microorganismes ou les plantes supérieures), soit de glycoprotéines (p. ex., mucus à la surface de cellules animales épithéliales). Les macromolécules présentes dans

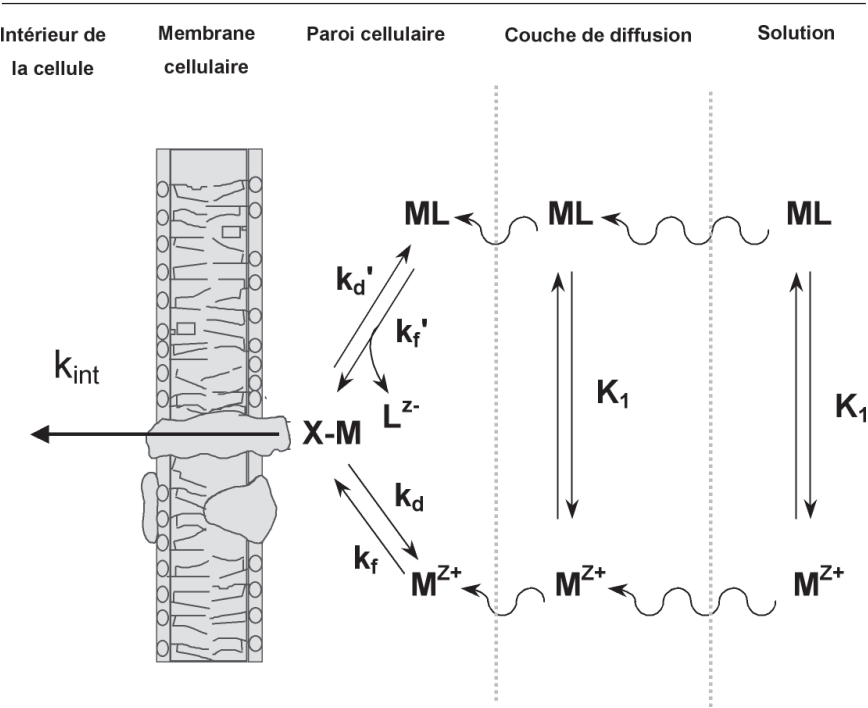
cette couche renferment une variété de groupements fonctionnels, normalement non chélatants et dominés par l'oxygène comme atome donneur (groupements $-C(O)OH$, $-P(O)OH$ ou $-C(OH)$). Dans la gamme de pH normalement rencontrée dans les eaux naturelles, plusieurs de ces groupements fonctionnels se dissocient, générant une matrice de sites chargés négativement que le métal devra franchir avant d'atteindre la barrière membranaire proprement dite. La composition (bio)chimique de la membrane cellulaire varie d'une espèce à une autre, et même d'un tissu à un autre (Simkiss et Taylor, 1995). Cependant, dans le contexte actuel, ce sont plutôt les similarités entre membranes qui nous intéressent : leur caractère hydrophobe ; l'omniprésence de phospholipides et de protéines (dont certaines traversent la membrane) ; l'existence de divers transporteurs protéiques et/ou de canaux ioniques, impliqués dans le transport d'ions d'un côté à l'autre de la membrane.

Le métal rencontrera donc une grande diversité de sites de liaison potentiels, lesquels se divisent en deux classes distinctes : des sites physiologiquement inertes, où le métal peut se lier sans perturber les fonctions cellulaires normales, et des sites physiologiquement actifs où, en se liant, le métal affecte le métabolisme de la cellule. Dans ce dernier cas, la liaison du métal peut affecter le métabolisme cellulaire directement si, par exemple, le site de liaison correspond à un enzyme clé intégré à la membrane cellulaire, ou indirectement si le site de liaison correspond plutôt à un site de transport qui permet au métal d'atteindre l'intérieur de la cellule. Une fois le cytosol atteint, le métal peut réagir avec une grande diversité de sites de complexation intracellulaires, avec des conséquences métaboliques évidentes.

Dans le cadre de ce modèle général des interactions entre les métaux et les organismes vivants (figure 1.2), on peut donc identifier quatre étapes : *i)* advection ou diffusion du métal (et de ses complexes) de la solution vers la surface biologique ; *ii)* diffusion du métal au travers de la couche protectrice externe ; *iii)* complexation du métal à des sites physiologiquement inertes dans la couche protectrice, ou à des sites sur la face apicale de la membrane cellulaire ; *iv)* prise en charge (*uptake* ou internalisation) du métal. La réponse biologique globale comprendra la bioaccumulation du métal (sorption ; internalisation), ainsi que les effets induits par le métal bioaccumulé sur des processus tels que la photosynthèse, la respiration, la motilité, la croissance et la reproduction. Une évaluation de la « biodisponibilité » d'un métal doit tenir compte de l'ensemble de ces éléments de réponse. Le défi, pour un métal donné, est de pouvoir prédire la réponse biologique en fonction de la spéciation du métal dans le milieu d'exposition.

Figure 1.2

Modèle conceptuel des interactions entre les métaux et les organismes aquatiques



M^{Z+} = ion métallique libre ; ML = complexe métallique en solution ; K_1 = constante d'équilibre pour la formation de l'espèce ML ; $M-X$ -membrane = complexe métallique de surface ; k_f , k_f' = constantes de vitesse pour la formation du complexe de surface ; k_d , k_d' = constantes de vitesse pour la dissociation du complexe de surface ; k_{int} = constante de vitesse pour l'internalisation du métal. Les charges sur les complexes ne sont pas indiquées.

Source : Dessin modifié à partir de Campbell (1995) – figure 1.1, p. 47. Reproduit avec l'autorisation de l'auteur.

2.2.2. Modèle de l'ion libre (MIL)/Modèle du ligand biotique (BLM)

Au cours des 30 dernières années, plusieurs chercheurs ont exploré les liens entre la spéciation des métaux et leur biodisponibilité et il est devenu évident que normalement la réponse biologique sollicitée par un métal dissous varie en fonction de la concentration de l'ion métallique libre, $M^{Z+}(H_2O)_n$, laquelle est déterminée par la concentration totale du métal dissous de même que par la concentration et la nature des ligands présents en solution (voir la section 2.1). La première formulation cohérente de cette dépendance, sous la forme du « Modèle de l'ion libre » ou MIL, a

été réalisée par Morel (1983), qui invoquait « l'importance universelle de l'activité de l'ion métallique libre pour déterminer la prise en charge, la nutrition et la toxicité des métaux traces cationiques ». Subséquemment Campbell (1995) et Hudson (1998) ont quelque peu nuancé ce premier énoncé (voir la section 2.2.3), dans des examens critiques de la littérature, mais il demeure néanmoins valable comme première base de prédiction de la biodisponibilité des métaux.

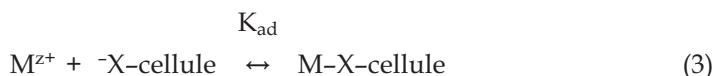
L'importance de l'activité de l'ion métallique libre comme prédicteur de la réponse biologique d'un organisme aquatique découle de la chimie des équilibres qui s'établissent à l'interface entre l'organisme et son milieu. L'interaction du métal avec la surface cellulaire, impliquant l'ion métallique libre (M^{z+}) ou le complexe (ML_n) comme réactif, peut être représentée comme une réaction de complexation de surface, menant à la formation de complexes du genre $M-X$ -cellule, où X -cellule = un ligand cellulaire présent à la surface membranaire (figure 1.2 ; figure 1.3, voie i). Dans le cas le plus simple, où c'est l'ion métallique libre qui réagit avec le ligand cellulaire, on peut envisager les réactions suivantes (où, pour simplifier, les charges sur le ligand et les complexes ne sont pas indiquées) :

Équilibre en solution



$$K_c = [ML]/([M^{z+}][L]) \quad (2)$$

Réaction de M^{z+} à la surface cellulaire



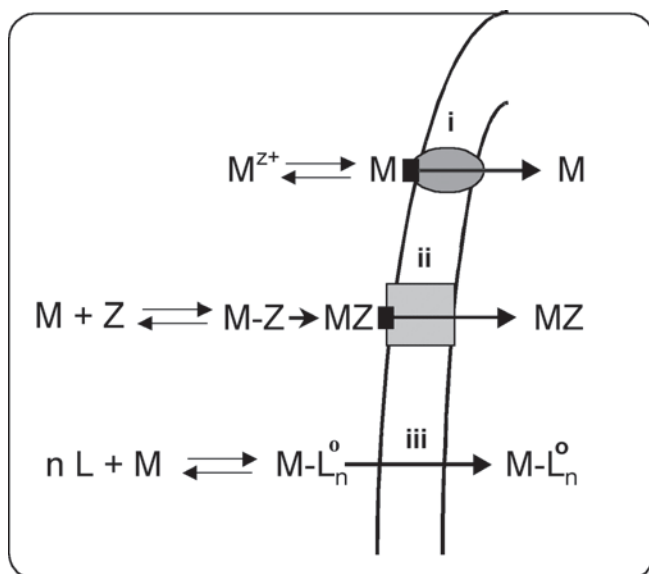
$$\{M-X\text{-cellule}\} = K_{ad}\{^-X\text{-cellule}\}[M^{z+}] \quad (4)$$

où K_c et K_{ad} sont des constantes d'équilibre. Si la réponse biologique varie en fonction de la concentration du complexe $\{M-X\text{-cellule}\}$, c'est-à-dire selon le degré de saturation des sites $^-X\text{-cellule}$, et si la concentration de sites $^-X\text{-cellule}$ libres demeure approximativement constante dans la gamme d'exposition, on peut déduire à partir de l'équation 4 que la réponse biologique suivra la concentration de l'ion métallique libre, $[M^{z+}]$, en solution. Une situation semblable prévaut même si c'est le complexe ML_n qui réagit avec le ligand cellulaire, à condition que la réaction se produise par échange de ligands (Campbell, 1995) :



Figure 1.3

Prise en charge de métaux par des organismes aquatiques – mécanismes généraux



i) transport facilité de cations; *ii)* transport accidentel de cations liés à des anions; *iii)* diffusion passive de complexes métalliques lipophiles.

Étant donné l'importance accordée au Modèle de l'ion libre, aussi bien par les scientifiques que par les régulateurs (Renner, 1997 ; Environnement Canada, 2001), il importe de bien identifier les prémisses de base qui le sous-tendent (Campbell, 1995).

À la surface biologique :

- La membrane cellulaire constitue le site clé pour l'interaction des métaux en solution avec les organismes aquatiques. L'ion métallique libre, M^{Z+} , et ses complexes hydrophiles, mL^{\pm} , ne peuvent traverser la membrane plasmique par simple diffusion. Leur interaction avec cette barrière prend plutôt la forme d'une réaction de complexation de surface (équations 3 ou 5). La réponse biologique est proportionnelle à la concentration du complexe de surface $\{M-X\text{-cellule}\}$ ainsi formé.
- Les variations de $\{M-X\text{-cellule}\}$ en fonction de la concentration de l'ion libre en solution, $[M^{Z+}]$, suivent un isotherme de type Langmuir. À condition que la concentration de sites de liaison libres,

{X-cellule}, demeure à peu près constante à l'intérieur de la gamme de concentrations métalliques d'intérêt toxicologique, les variations de la réponse biologique suivront celles de l'ion métallique libre (équation 4).

- La barrière biologique ne change pas lors de l'exposition au métal d'intérêt, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'acclimatation au niveau de la membrane cellulaire (corollaire : le MIL s'appliquera davantage à des expositions de courte durée qu'à des expositions chroniques).

Cinétique

- Le transport du métal à travers la membrane plasmique est l'étape limitante. C'est-à-dire que la diffusion du métal à travers la couche non mixée et sa complexation subséquente à la surface biologique se produisent rapidement, menant à l'établissement d'un équilibre entre la surface biologique et la solution externe d'exposition.

De l'ensemble de ces conditions, il s'ensuit que l'identité de l'espèce métallique qui réagit à la surface biologique, pour former le complexe {M-X-cellule}, **n'a pas de signification biologique – aucune espèce présente en solution ne peut être considérée comme plus (ou moins) biodisponible qu'une autre**. L'importance de l'ion métallique libre comme prédicteur de la biodisponibilité n'implique pas qu'il soit « l'espèce biodisponible », mais découle plutôt de la chimie des équilibres ; connaître la concentration ou l'activité de l'ion métallique libre permet de prédire la concentration de l'espèce clé, {M-X-cellule}.

Toutes ces prémisses de base ont été bien conservées dans le « Modèle du ligand biotique » (*Biotic Ligand Model* ou BLM), qui constitue la manifestation la plus récente du MIL (Di Toro *et al.*, 2001 ; Santore *et al.*, 2001) ; l'espèce {X-cellule} a été renommée {Ligand biotique}, mais autrement les deux modèles reposent sur les mêmes bases. En effet, vu en rétrospective, l'emploi de l'expression « Modèle de l'ion libre » pour décrire cette approche d'équilibres chimiques a peut-être semé une certaine confusion dans la littérature, dans le sens que le nom du modèle mettait l'accent exclusivement sur l'ion métallique libre lui-même, à l'exclusion d'autres facteurs comme le pH et la dureté de l'eau qui sont reconnus pour leur influence sur la biodisponibilité des métaux. L'introduction de l'expression « Modèle du ligand biotique » nous mène à migrer de la solution d'exposition vers l'organisme cible, vers le « ligand biotique » où le métal, le proton et les cations majeurs (Ca^{2+} , Mg^{2+}) concourent pour s'y lier. Pour cette raison, nous emploierons l'expression « Modèle du ligand biotique » dans le texte qui suit. Signalons que les autorités gouvernementales au

Canada, aux États-Unis ainsi qu'au sein de l'Union européenne semblent avoir adopté l'approche du BLM pour développer des objectifs environnementaux de rejet pour les métaux.

Plusieurs liens possibles entre la formation du complexe M-X-cellule et l'initiation d'un effet biologique ont été suggérés dans la littérature (Morel, 1983 ; Pagenkopf, 1983 ; Sunda, 1991). Si \bar{X} -cellule correspond à un site physiologiquement actif présent à la surface cellulaire, sa réaction avec le métal pourra induire une réponse biologique directe (p. ex., branchies de poisson – Pagenkopf, 1983 ; Wood, 2001). D'autre part, si \bar{X} -cellule correspond plutôt à un site de transport qui permet au métal de traverser la membrane cellulaire et d'entrer dans le cytosol, alors sa réaction avec le métal ne constituera qu'une étape préalable au transport membranaire (et la réaction du métal avec les sites métaboliquement actifs se produira dans le milieu intracellulaire, suite au transport – Morel, 1983). Dans une variante de ce scénario, \bar{X} -cellule pourrait correspondre à un site de transport normalement emprunté par un oligo-élément nutritif essentiel ; dans ce cas, sa réaction avec le métal « M » inhiberait le transport du métal essentiel et en induirait une déficience (p. ex., phytoplancton – Sunda et Huntsman, 1983 (Mn, Cu) ; Harrison et Morel, 1983 (Fe, Cd)).

2.2.3. Applicabilité du Modèle du ligand biotique (BLM)

A priori, le Modèle du ligand biotique devrait s'appliquer aux organismes aquatiques qui n'assimilent pas de matière particulaire (p. ex., des algues et des plantes aquatiques supérieures), ou encore à ceux qui peuvent en assimiler mais pour qui la phase dissoute demeure le vecteur principal de prise en charge (p. ex., des poissons, du moins pour les conditions d'exposition de courte durée). Beaucoup de preuves expérimentales à l'appui du BLM se sont effectivement accumulées depuis 30 ans.

Organismes étudiés

Le phytoplancton a été beaucoup étudié, les études avec les algues d'eau douce et les algues marines étant de loin les plus nombreuses dans la littérature scientifique. Cette distribution inégale reflète sans doute la sensibilité des algues (unicellulaires) aux métaux, mais elle découle aussi de la facilité relative des manipulations expérimentales impliquées (milieu de culture inorganique défini ; temps de génération court ; réponse rapide). Des essais avec les invertébrés sont aussi relativement nombreux, avec un biais évident vers des espèces marines. Par contre, chez les poissons la majorité des études ont été réalisées avec des espèces dulcicoles.

Conditions expérimentales (métaux/ligands)

Presque sans exception, les expériences conçues pour tester le BLM ont été réalisées à un pH constant, avec des métaux bivalents (Cu, Cd, Ni, Pb, Zn), dans des milieux artificiels (inorganiques) ou dans l'eau de mer filtrée, et en présence de quantités connues de ligands synthétiques tels que l'éthylènediamine-tétraacétate (EDTA) ou le nitrilotriacétate (NTA). Ces ligands ont été employés comme « tampons » métalliques – en manipulant $[M]_T$ et/ou $[L]_T$, on peut faire varier la concentration de l'ion métallique libre, $[M^{z+}]$, dans la gamme voulue. Signalons que ces ligands forment des complexes hydrophiles avec les métaux d'intérêt, envers lesquels les membranes biologiques s'avèrent imperméables, ce qui a beaucoup simplifié l'interprétation des expériences. Le cuivre domine largement parmi les métaux étudiés ; le nombre de citations diminue dans l'ordre $Cu > Cd > Zn \gg$ les autres.

L'examen critique de cette littérature (Campbell, 1995 ; Campbell *et al.*, 2002 ; Hudson, 1998) permet de dégager un aperçu général de l'applicabilité de l'approche BLM aux eaux naturelles. Il convient de considérer séparément les études réalisées en absence/en présence de la matière organique dissoute naturelle (MOD).

Études réalisées en l'absence de la MOD

Diverses réponses ont été suivies dans ces expériences, allant d'indices très spécifiques (p. ex., accumulation du métal – adsorption superficielle, absorption ; distribution sub-cellulaire) jusqu'à des mesures plus holistiques (p. ex., croissance, motilité, mortalité). Dans la très grande majorité des expériences réalisées à pH et à dureté constants, et en présence de ligands formant des complexes métalliques hydrophiles, la réponse biologique varie en fonction de la concentration de l'ion métallique libre ($M^{z+}(H_2O)_n$ ou aquo ion), tel que prédit par le BLM (52 cas sur 59 – voir Campbell, 1995).

Des exemples d'expériences où la biodisponibilité d'un métal ne suit pas l'activité de l'ion métallique libre sont plutôt rares. Ces quelques exceptions se classent en trois groupes : *i*) des expériences avec des ligands formant des complexes métalliques hydrophobes, ML_n^0 , ou avec des composés organométalliques hydrophobes, $R - M - X^0$; *ii*) des études impliquant des ligands formant des complexes métalliques hydrophiles, mais où on permettait au pH et/ou à la dureté de l'eau de varier ; et *iii*) quelques cas avec des ligands formant des complexes hydrophiles (normalement avec des métabolites de poids moléculaire faible).

- Groupe (i) : Dans la littérature scientifique on retrouve quelques exemples où la biodisponibilité d'un métal augmente après complexation, cette disponibilité accrue étant attribuable à la formation de complexes neutres lipophiles (Block et Wicklund Glynn, 1992 ; Croot *et al.*, 1999 ; Phinney et Bruland, 1997). On s'attendrait à ce que de tels complexes puissent traverser les membranes biologiques directement (figure 1.3, voie iii), sans devoir emprunter les systèmes (canaux, perméases) impliqués dans le transport membranaire des métaux essentiels comme le Cu ou le Zn. Il importe de mentionner, cependant, que les concentrations de ligand nécessaires pour provoquer cette disponibilité accrue sont généralement supérieures à celles susceptibles d'être trouvées dans les eaux naturelles. Pour que ces résultats puissent être considérés « pertinents » sur le plan environnemental, il faudrait démontrer que de tels complexes lipophiles, de poids moléculaire faible, existent réellement dans les eaux naturelles. La question demeure ouverte : ces exceptions sont-elles d'intérêt académique seulement ou constituent-elles des analogues valables pour une certaine classe de complexes métalliques naturels ?
- Groupe (ii) : D'après des études réalisées sur des organismes d'eau douce, dans des conditions de pH ou de dureté variables, il est évident que la simple connaissance de la concentration de l'ion métallique libre, M^{z+} , ne suffit pas pour prédire la réponse biologique au métal. En effet, on s'attendrait à ce que l'ion H^+ et les cations majeurs responsables de la dureté (Ca^{2+} , Mg^{2+}) puissent concourir pour le site de liaison, $-X$ -cellule. Dans le cas d'un métal toxique, ce genre de compétition offrirait une certaine protection à l'organisme. Le BLM tient compte de cette compétition, en introduisant explicitement les réactions du ligand biotique, $-X$ -cellule, avec le proton et les cations majeurs.



L'évidence qualitative de ce genre de compétition est reconnue depuis longtemps dans la littérature toxicologique (proton : Campbell et Stokes, 1985 ; dureté : Howarth et Sprague, 1978), mais ce n'est que récemment que l'on a tenté de la quantifier (Meyer *et al.*, 1999 ; Schampelaere et Janssen, 2002). D'autre part, il serait imprudent

de conclure que cette compétition pour des sites de liaison suffise à elle seule à expliquer l'effet protecteur de l'ion H^+ et des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . Le calcium et le proton ne se limiteront pas à concourir avec le métal M pour le ligand biotique ; ils peuvent aussi affecter d'autres propriétés de la membrane cellulaire comme sa fluidité et sa perméabilité globale. Par exemple, chez les organismes pluricellulaires, le calcium joue un rôle dans le maintien de l'intégrité des jonctions paracellulaires (Lacaz-Viera, 2000). De tels effets bénéfiques viendraient s'ajouter à l'effet protecteur représenté par l'équation (7a). De même, le rôle du proton ne se limitera pas à la compétition pour le ligand biotique représentée par l'équation (6). Par exemple, dans leur étude de la prise en charge de ^{85}Sr par la carpe commune (*Cyprinus carpio*), Chowdhury et Blust (2001) ont fait varier le pH entre 5 et 8,5 et ils ont réussi à démontrer que l'ion H^+ agissait comme inhibiteur non compétitif de la prise en charge du strontium.

- Groupe (iii) : Normalement, la complexation d'un métal par un ligand de poids moléculaire faible, donnant lieu à la formation de complexes hydrophiles, mène à une diminution de la biodisponibilité du métal. Cependant, dans quelques cas, la biodisponibilité « résiduelle » du métal en présence du ligand dépasse celle qui aurait été prédite selon la concentration de l'ion métallique libre présente en équilibre avec les complexes hydrophiles (Campbell, 1995 ; Errécalde et Campbell, 2000 ; Errécalde *et al.*, 1998 ; Fortin et Campbell, 2001). Dans tous les cas recensés, ces exceptions apparentes au BLM impliquent des ligands assimilables de poids moléculaire faible (p. ex., acides aminés, acide citrique, thiosulfate), pour lesquels il existe des transporteurs (perméases) au niveau de la membrane cellulaire. De cette observation découle l'explication la plus plausible de ce comportement anormal des métaux, à savoir le transport « accidentel » ; on suppose que le transporteur responsable de l'assimilation du ligand « Z » est relativement peu sélectif, et qu'il peut s'accommoder non seulement du ligand libre Z^- , mais également du complexe M-Z. Le métal ne fait qu'accompagner le ligand, en mode *piggy-back*. Ce transport accidentel offre donc au métal une voie additionnelle pour atteindre l'intérieur de la cellule (figure 1.3, voie ii), qui existe en parallèle à la voie normale de transport (figure 1.3, voie i).

Ces exemples constituent un défi théorique important pour le BLM, mais, tout comme dans le cas du groupe (i) ci-dessus, leur pertinence environnementale demeure discutable. En effet, dans la plupart des cas on n'observe de biodisponibilité accrue que pour des concentrations de ligand qui excèdent celles trouvées normalement dans les eaux naturelles (p. ex., pour les métabolites organiques on observe des effets à des concentrations de 10 à 100 μM , alors que ces ligands

sont normalement présents dans les eaux naturelles à des concentrations $< 1 \mu\text{M}$). Cependant, des concentrations élevées pourraient prévaloir dans des stations d'épuration d'eaux usées, dans des milieux récepteurs influencés par le rejet de telles eaux résiduaires, ou encore dans le tractus intestinal de certains animaux aquatiques (Chen et Mayer, 1998).

Études réalisées en présence de la MOD

La matière organique dissoute qu'on trouve dans les eaux naturelles est dominée par les substances humiques (acides fulviques et humiques : Thurman, 1985 ; Tipping, 2002). Parmi les propriétés reconnues de ces substances (tableau 1.5), celle qui nous intéresse le plus est leur capacité de complexer des métaux cationiques.



En faisant l'analogie entre les équations (1) et (8), on s'attendrait à ce que la MOD agisse en complexant le métal et en faisant diminuer la concentration de l'ion métallique libre. De fait, maintes fois dans la littérature on a étudié les effets de la MOD sur la biodisponibilité d'un métal et dans la très grande majorité des cas on a effectivement observé une diminution de la biodisponibilité, tel que prédit par le BLM. Cependant, presque sans exception ces études sont de nature qualitative (c'est-à-dire que la spéciation du métal est demeurée indéfinie) et on n'a pas pu déterminer si la diminution de la biodisponibilité suivait rigoureusement la baisse de la concentration de l'ion libre. La situation avec les quelques études quantitatives n'est guère meilleure (tableau 1.6) ; l'examen des résultats ne révèle aucun consensus (contrairement à ce que nous avons vu antérieurement pour les expériences réalisées en l'absence de la MOD). En effet, environ la moitié des expériences se conforment au BLM (tableau 1.6A), alors que les autres semblent être en contradiction (tableaux 1.6B et 1.6C).

Ce manque d'études quantitatives permettant de tester le BLM en présence de la matière organique dissoute naturelle limite actuellement son application aux eaux naturelles. Le fait que l'on observe presque toujours une diminution de biodisponibilité en présence de la MOD est néanmoins rassurant ; il indique que globalement le BLM représente correctement le rôle de la MOD. Les autres effets de la MOD, reliés à son activité de surface et à ses effets sur la perméabilité membranaire (Campbell *et al.*, 1997 ; Vigneault *et al.*, 2000), seraient d'ordre secondaire. Cette situation ressemble à celle décrite antérieurement pour le Ca^{2+} et l'ion H^+ , où leurs effets dominants sur la biodisponibilité des métaux

seraient liés à leur compétition pour le ligand biotique, γ -cellule, alors que leurs effets sur les propriétés membranaires (perméabilité/fluidité/conformation des protéines) demeureraient secondaires.

Tableau 1.5

**Propriétés chimiques des substances humiques
et processus biogéochimiques reconnus qui y sont associés**

Propriétés chimiques	Processus biogéochimiques
<ul style="list-style-type: none"> • Acides faibles (présence de groupements carboxyliques et phénoliques) • Polyfonctionnels • Polyélectrolytes • Contrôle du pH de certaines eaux de surface 	<ul style="list-style-type: none"> • Complexation des métaux • Complexation du phosphate (complexes ternaires avec le Fe) • Complexation et stabilisation d'exoenzymes
<ul style="list-style-type: none"> • Surfactants 	<ul style="list-style-type: none"> • Contrôle des charges superficielles de particules inorganiques
<ul style="list-style-type: none"> • Présence de domaines hydrophobes (chaînes aliphatiques et noyaux aromatiques) • Présence de domaines hydrophiles coexistant avec des domaines hydrophobes au sein de la molécule 	<ul style="list-style-type: none"> • Association avec des composés organiques hydrophobes
<ul style="list-style-type: none"> • Présence d'accepteurs d'électrons (groupements quinones) 	<ul style="list-style-type: none"> • (Photo)réduction de métaux, Fe et Mn
<ul style="list-style-type: none"> • Présence de chromophores (électrons π excitables) 	<ul style="list-style-type: none"> • (Photo)oxydation d'autres molécules organiques (photosensibilisation) • Atténuation de la lumière dans les eaux de surface

2.2.4. Résumé : prise en charge des métaux

Dans la section 2.2 nous avons considéré les interactions possibles entre un métal dissous et la barrière biologique membranaire qui sépare un organisme (aquatique) de son milieu. Trois mécanismes de prise en charge ont été identifiés :

- transport facilité du cation, impliquant soit un transporteur trans-membranaire protéique, soit un canal trans-membranaire (figure 1.3, voie i) ;

- transport facilité d'un complexe métallique anionique, impliquant un transporteur d'anions relativement peu sélectif (figure 1.3, voie ii : transport « accidentel » de l'anion + le métal qui y est associé) ;
- transport passif, par simple diffusion, d'un complexe métallique neutre et lipophile (figure 1.3, voie iii).

Normalement c'est la voie i qui prédomine, aussi bien pour les métaux essentiels (pour lesquels il existe des systèmes de transport facilité conçus pour assurer/contrôler la prise en charge de ces oligo-éléments nutritifs essentiels) que pour les métaux non essentiels comme le Cd ou le Pb, qui réussissent à « tromper » les systèmes de transport cationique présents à l'interface membranaire. Lorsque la voie i prédomine, le Modèle du ligand biotique (BLM) s'applique et la réponse de l'organisme varie en fonction du degré de saturation du ligand biotique, c'est-à-dire selon la concentration de la forme $\{M-X\text{-cellule}\}$ (équation 4). La concentration de cette dernière forme est déterminée par la concentration de l'ion métallique libre en solution, $[M^{z+}]$, de même que par la concentration d'autres ions pouvant concourir avec M^{z+} pour le ligand biotique (Ca^{2+} , Mg^{2+} et H^+).

Dans cette section nous n'avons pas considéré explicitement la prise en charge de métaux associés aux particules (métaux particulaires). Pour qu'un métal particulaire puisse être réellement assimilé, il faut d'abord que la particule soit ingérée et ensuite que le métal soit solubilisé. Normalement cette étape de solubilisation se produit dans le tractus intestinal de l'organisme consommateur, mais dans certains cas (p. ex., la phagocytose) la particule est assimilée par un processus d'invagination de la membrane cellulaire, créant une vacuole. Dans les deux cas, la particule peut se trouver dans des conditions fort différentes de celles qui règnent dans le milieu ambiant, notamment en ce qui concerne le pH et les conditions d'oxydoréduction ; souvent ces nouvelles conditions favoriseront la solubilisation des métaux initialement associés à la particule. Cependant, cette étape de solubilisation n'est qu'une première étape – pour être réellement « assimilé », le métal doit franchir la membrane digestive ou la membrane vacuolaire. La nature de ces barrières membranaires sera peut-être différente de celle des membranes qui se trouvent exposées aux métaux dissous dans le milieu ambiant (p. ex., membranes épithéliales des branchies ou du tégument), mais en principe le transport transmembranaire impliquera les mêmes trois processus que nous avons déjà identifiés (figure 1.3).

Tableau 1.6

Influence de la matière organique dissoute (MOD) naturelle sur la biodisponibilité des métaux

Espèce	Métal	Milieu	Durée	Réponse	Référence
A – Cas se conformant au BLM, où le rôle de la MOD se limite à complexer le métal dans la solution d'exposition					
1. <i>Monochrysis lutheri</i> (algue euryhaline)	Cu	Eau de mer filtrée + eau de rivière filtrée + TRIS	5 j	Croissance (m_{max} <i>vs</i> pCu^{2+})	Sunda et Lewis (1978)
2. <i>Selenastrum capricornutum</i> (algue d'eau douce)	Cd	Milieu synthétique + acide humique ou fulvique ou NTA	0,5 h	Prise en charge du Cd (comparaison avec Cd^{2+} tamponné avec NTA)	Vigneault et Campbell (2004)
3. Bactérie marine (gram-négative)	Cu	Eau de mer filtrée + eau de rivière filtrée	2,5 h	Incorporation ^{14}C -glucose (cpm <i>vs</i> pCu^{2+})	Sunda et Gillespie (1979)
4. <i>Daphnia magna</i> (cladocère d'eau douce)	Cu	Milieu synthétique + EDTA + MOD + tampon	4 j	Mortalité ($CL_{50}(Cu^{2+})$ <i>vs</i> [MOD])	Meador (1991)
5. <i>Xenopus laevis</i> (embryon, larve) (amphibien d'eau douce)	Cu	Milieu synthétique + acide humique ou fulvique	4 j	Développement des larves (anormalités ou terata <i>vs</i> pCu^{2+})	Buchwalter <i>et al.</i> (1996)

Espèce	Métal	Milieu	Durée	Réponse	Référence
B - Cas ne se conformant pas au BLM, où le métal s'avère plus toxique que prévu					
1. <i>Selenastrum capricornutum</i> (algue d'eau douce)	Cd	Eau de lac filtrée + éléments nutritifs ajoutés	4 h	Prise en charge du ¹⁴ CO ₂ (% inhibition <i>vs</i> pCd ²⁺)	Laegreid <i>et al.</i> (1983)
2. <i>Simocephalus serrulatus</i> (cladocère d'eau douce)	Cu	Eau souterraine + eau d'étang filtrée	2 j 6 h	Mortalité (CL ₅₀ (Cu ²⁺) mesurée dans différents milieux) Prise en charge du Cu	Giesy <i>et al.</i> (1983)
3. <i>Daphnia magna</i> (cladocère d'eau douce)	Cu	Milieu synthétique ou eau de lac + TRIS	2 j	Immobilisation (CE ₅₀ (Cu ²⁺) mesurée dans différents milieux)	Borgmann et Charlton (1984)
4. <i>Pimephales promelas</i> (mené tête-de-boule)	Cu	Eau de lac + acide humique	4 j	Mortalité des larves (CL ₅₀ (Cu ²⁺) mesurée dans différents milieux)	Erickson <i>et al.</i> (1996)
C - Cas ne se conformant pas au BLM, où le métal s'avère moins toxique que prévu					
5. <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (algue d'eau douce)	Al	Milieu synthétique + acide fulvique	4 j	Inhibition de croissance (rendement final), sans/avec acide fulvique, à pAl ³⁺ constant	Parent <i>et al.</i> (1996)
6. <i>Paratya australiensis</i> (crevette d'eau douce)	Cu	Eau naturelle riche en MOD, diluée avec eau de robinet	6 j	Mortalité (CL ₅₀ (Cu ²⁺) mesurée dans différents milieux)	Daly <i>et al.</i> (1990)
7. <i>Salmo salar</i> (juvénile) (saumon atlantique)	Al	Milieu synthétique + acide fulvique	4 j	Mortalité (CL ₅₀ (Al ³⁺) mesurée sans/avec acide fulvique)	Roy et Campbell (1997)

2.3. TOXICITÉ ET DE DÉTOXICATION DES MÉTAUX

2.3.1. Mécanismes de toxicité

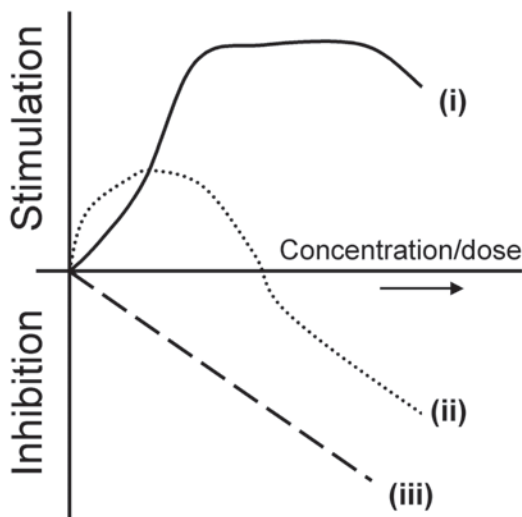
En abordant la toxicité des métaux, il convient de distinguer entre macro-éléments essentiels, éléments traces essentiels et éléments traces sans fonction biologique connue. Les métaux de classe A, de configuration électronique correspondant à des gaz inertes (p. ex., Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}), se lient préférentiellement à des ligands offrant l'oxygène et l'azote ($\text{O} > \text{N} > \text{S}$) comme atomes donneurs, forment des liaisons coordonnées à caractère ionique et montrent des constantes de stabilité qui sont généralement relativement faibles (exception = Al^{3+}). Les cations de classe B, de configuration électronique d^8 , d^9 ou d^{10} (p. ex., Ag^+ , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+}) possèdent plusieurs électrons non liants, sont très polarisables, se lient préférentiellement à des groupements sulfhydryles ($\text{S} > \text{N} > \text{O}$), forment des liaisons à caractère partiellement covalent, et montrent des constantes de stabilité très grandes. Les cations *borderline* (Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}), pour leur part, montrent un comportement intermédiaire, comme leur nom (« limite ») l'indique. Ce sont les cations A et *borderline* qui sont essentiels ; ceux de la classe B ne sont que toxiques.

Pour un métal donné, la forme de la courbe dose-réponse variera selon la classe dans laquelle se trouve l'élément (figure 1.4). Dans cette figure, inspirée de l'analyse initiale de Bowen (1979), la concentration ou la dose du métal est indiquée le long de l'axe des abscisses (unités arbitraires) alors que la réponse de l'organisme est exprimée selon l'axe des ordonnées, une réponse positive correspondant à une stimulation de la « performance » de l'organisme et une réponse négative à une inhibition de celle-ci. Pour un macro-élément nutritif comme le Ca, la réponse initiale sera positive, jusqu'à l'atteinte d'un plateau plutôt large correspondant à la dose optimale (suffisance) ; à des concentrations très élevées on pourrait théoriquement commencer à déceler de l'inhibition. Dans le cas d'un oligo-élément nutritif essentiel comme le Cu, la courbe montrera une stimulation initiale, mais seulement sur une gamme relativement étroite de concentrations, suivie d'un court plateau et ensuite d'une inhibition progressive au fur et à mesure que la dose augmente. La situation avec un élément non essentiel comme le Hg ou le Pb sera plus simple, montrant un plateau initial plus ou moins court (tolérance) suivi d'une inhibition progressive.

Dans le contexte actuel, nous nous intéressons surtout aux effets délétères provoqués par les métaux traces, c'est-à-dire à la partie droite de la figure 1.4 (courbes ii et iii). Ces effets délétères couvrent toute la gamme des effets sous-létaux (p. ex., inhibition de croissance ; atteintes au cycle de reproduction ; motilité réduite) jusqu'à la mortalité. Pour

Figure 1.4

Schéma général des courbes dose-réponse typiquement observées chez un organisme vivant pour *i)* un macro-élément nutritif (p. ex., Ca); *ii)* un micro-élément nutritif (p. ex., Cu); et *iii)* un élément toxique non essentiel (p. ex., Pb)



Source : Dessin modifié à partir de Wright et Welbourn (2002), figure 6.2, p. 251. Reproduit avec permission.

comprendre ces effets délétères, il faut d'abord considérer les rôles métaboliques essentiels que peuvent jouer les métaux. Mason et Jenkins (1995) ont identifié trois catégories de rôle : stérique, catalytique et oxydatif/réductif. Comme exemple d'un rôle stérique, mentionnons l'implication du Zn dans les *finger proteins* qui sont appelées à interagir avec l'acide désoxyribonucléique (ADN) comme facteurs de transcription ; en se liant au résidu de cystéine (-SH) et d'histidine (-N:) présents chez ces protéines, le Zn stabilise leur topologie (conformation) et permet leur interaction avec la région « promoteur » du gène. Un tel rôle stérique se manifeste aussi chez plusieurs métallo-enzymes, où le cofacteur métallique est responsable du maintien de la conformation active de la protéine. La suggestion d'un rôle catalytique pour les métaux découle de l'observation de leur capacité à catalyser *in vitro* l'hydrolyse de liaisons d'ester et d'amide ; par exemple, le Zn étant un cofacteur essentiel pour le bon fonctionnement de certains peptidases, on peut envisager qu'il joue un rôle catalytique dans l'hydrolyse de la liaison peptide, en se liant au groupement carbonyle et en le rendant plus susceptible à une attaque nucléophile (Mason et

Jenkins, 1995). Finalement, certains métaux dans la catégorie *borderline* (p. ex., Fe, Mn, Cu et Mo) sont incorporés dans des métalloprotéines et jouent un rôle clé dans les réactions intracellulaires d'oxydation/réduction.

Après ce bref aperçu des rôles métaboliques joués par les métaux essentiels, considérons maintenant comment les métaux peuvent provoquer des effets toxiques. Rappelons que les métaux jouant ces rôles métaboliques essentiels sont tous liés aux molécules organiques par des réactions de complexation, c'est-à-dire par des liaisons de coordination dont les forces de liaison sont relativement faibles (pas covalentes). Les réactions de complexation sont donc réversibles ; par conséquent, un métal « étranger » qui entre dans une cellule peut déplacer un métal/cation essentiel. Ce genre de déplacement n'est pas limité aux métaux « étrangers » ; même un métal essentiel, s'il est présent à des concentrations intracellulaires anormalement élevées, pourra provoquer un tel déplacement par la loi d'action des masses. Selon ce raisonnement, le mécanisme général de toxicité des métaux impliquera la liaison d'un métal « inapproprié » à des molécules physiologiquement importantes (Mason et Jenkins, 1995). La liaison du métal « inapproprié » pourrait induire des effets délétères de différentes manières :

- en bloquant des groupements fonctionnels essentiels de biomolécules (souvent des groupements thiol) ;
- en déplaçant des métaux essentiels de leurs sites chez les biomolécules ;
- en modifiant la conformation (donc l'activité) de biomolécules.

Signalons qu'un métal donné peut normalement réagir avec une variété de ligands intracellulaires et ainsi provoquer une diversité d'effets. De même, un ligand intracellulaire donné peut normalement accepter différents métaux (i.e., sélectivité imparfaite), donc un effet donné peut être induit par plus d'un métal. Par exemple, l'inhibition de l'enzyme Na^+/K^+ -ATPase a été rapportée pour plusieurs métaux (Ag, Cd, Cu, Zn, Pb). En d'autres termes, aucune cible intracellulaire n'est entièrement spécifique à un seul métal, et aucun métal ne s'avère entièrement spécifique à une seule cible.

Outre ce mécanisme général de liaison de métaux « inappropriés » à des biomolécules importantes, certains métaux susceptibles de subir des changements cycliques de leur état d'oxydation (p. ex., Fe, Cu) peuvent générer la production d'espèces réactives d'oxygène telles O_2^- , $\text{HO}\cdot$ et $\text{O}_2\cdot$ dans le milieu intracellulaire et induire ainsi un stress oxydatif. Les radicaux libres d'oxygène, une fois formés, auront tendance à attaquer

les lipides polyinsaturés des membranes biologiques en leur arrachant un hydrogène, menant à une peroxydation lipidique et à une fragilisation des membranes cellulaires (Bus et Gibson, 1979).

2.3.2. Mécanismes de détoxification

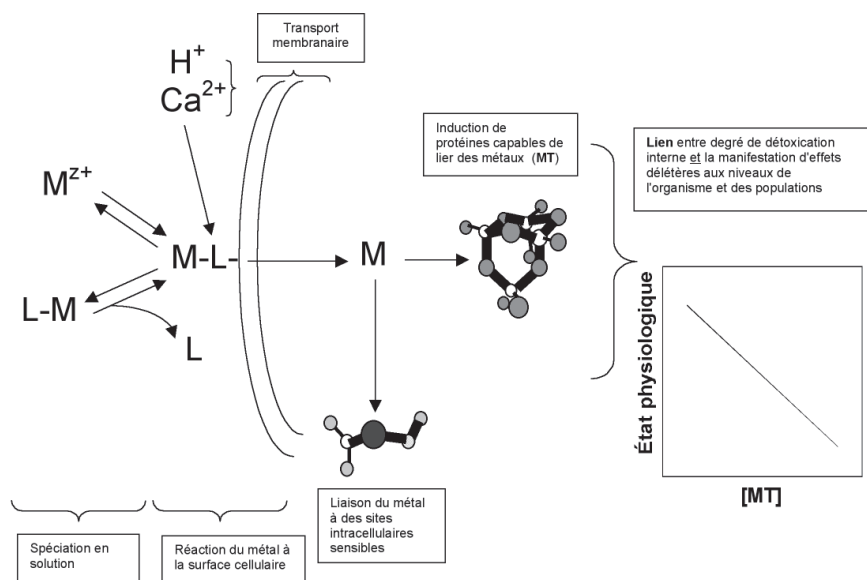
À partir de l'idée générale présentée dans la section précédente, à l'effet que l'action toxicologique d'un métal découle de son interaction anormale avec une biomolécule essentielle, Mason et Jenkins (1995) ont proposé une définition opérationnelle de la détoxification : la détoxification comprend tous les processus, stratégies, ou mécanismes qui permettent de minimiser le potentiel d'un métal à interagir de manière nuisible avec des macromolécules essentielles. Comme corollaire, tout exemple d'acclimatation, de tolérance ou de résistance à des métaux pourra être interprété comme une preuve de l'existence d'un système de détoxification. La figure 1.5 représente ce modèle intégré de toxicité et de détoxification. Le métal qui entre dans la cellule, via un des mécanismes décrits à la section 2.2, ne demeurera pas longtemps libre dans le cytosol. Au contraire, il aura tendance à se lier rapidement aux ligands intracellulaires. Dans leur analyse de la détoxification, Mason et Jenkins (1995) identifient trois classes de ligands sur la base de leur action physiologique après s'être liés à un métal. Les ligands du groupe « L_E » sont ceux qui exercent un effet bénéfique une fois le métal lié (p. ex., un apométalloenzyme, L_E , qui requiert un métal spécifique pour son fonctionnement normal, $<M-L_E>$). La situation inverse s'applique aux ligands de type « L_T », pour lesquels la liaison du métal provoque un effet négatif ; il s'agit de molécules qui sont inactivées lorsqu'un métal inapproprié s'y lie. La détoxification correspondrait aux efforts de l'organisme à limiter la formation d'espèces $<M-L_T>$. Finalement, les ligands de type « L_I » sont physiologiquement inertes, ne manifestant ni stimulation ni inhibition lorsque le métal s'y lie ; les formes $<M-L_I>$ représenteraient plutôt des réservoirs d'entreposage ou de stockage du métal. La métallothionéine est probablement l'exemple le mieux connu d'un ligand de ce type ; nous la considérons en détail à la section 3 du présent chapitre.

Le destin intracellulaire du métal, c'est-à-dire sa répartition parmi les formes $<M-L_E>$, $<M-L_T>$ et $<M-L_I>$, sera fortement influencé par deux facteurs clés, son affinité pour chaque ligand, K_{ML} , et la concentration libre de chaque ligand, $[L_{E,T \text{ ou } I}]$. D'autres facteurs thermodynamiques (pH, potentiel d'oxydoréduction, présence d'autres métaux compétitifs) et cinétiques (vitesse de réaction du métal $<M>$ avec les différents ligands) viendront moduler cette compétition. À première vue, la situation ici ressemble à celle que nous avons décrite pour le milieu extracellulaire (section 2.1), où la spéciation d'un métal peut être prédite avec confiance

à partir des équilibres chimiques. L'intérieur d'une cellule vivante n'est cependant pas à l'équilibre ! Il correspond davantage à un état stationnaire, où la cellule pourra activement influencer la distribution du métal en agissant sur le flux d'entrée (contrôle du transport trans-membranaire), sur les ligands intracellulaires disponibles (nature, concentration et compartimentalisation cellulaire) ainsi que sur les flux de sortie (vers des vacuoles ou vers l'extérieur de la cellule).

Figure 1.5

Liens entre l'exposition aux métaux, leur prise en charge, leur détoxification et la manifestation d'effets délétères



Pour un métal essentiel, la cellule visera à maintenir une concentration optimale des formes $\langle M-L_E \rangle$. Si la concentration extracellulaire de ce métal augmente, la cellule aura trois « choix » : agir sur le système de prise en charge et réduire le flux d'entrée ; agir sur le système d'efflux et augmenter ainsi le flux sortant ; ou laisser augmenter le flux d'entrée du métal et entreposer l'excédent de métal sous forme de complexes $\langle M-L_I \rangle$. Cette dernière option aurait pour effet de constituer une réserve intracellulaire facilement mobilisée et de minimiser les chances que le métal se lie aux ligands de type L_T et provoque des effets délétères. L'ensemble de ces processus assurera l'homéostasie du métal essentiel.

Des considérations semblables s'appliquent aux métaux non essentiels, quoique dans ce cas la cellule vise une concentration non pas optimale mais plutôt minimale des complexes de type $<M-L_T>$. De nouveau, la cellule pourra adopter deux stratégies de détoxification : *i)* réguler la concentration intracellulaire totale du métal, en empêchant son entrée dans la cellule ou en accélérant sa sortie (cas des organismes « régulateurs », qui contrôleront la teneur intracellulaire du métal à l'intérieur d'une gamme étroite) ; *ii)* synthétiser des ligands d'affinité appropriée, ce qui permettra de séquestrer le métal dans le milieu intracellulaire et de le rendre non disponible pour former des complexes de type $<M-L_T>$ (cas des organismes « accumulateurs », dont la teneur intracellulaire en métal est généralement élevée et varie en fonction de l'exposition).

Selon une perspective chimique, la détoxification peut paraître relativement élémentaire, le but ultime étant simplement de limiter/empêcher la formation de complexes de type $<M-L_T>$, mais d'un point de vue biologique elle est beaucoup plus complexe (Mason et Jenkins, 1995). Dans certains cas les mécanismes moléculaires/cellulaires impliqués dans la détoxification peuvent opérer de manière constitutive (cas des phytochélatines chez les cellules végétales), alors que dans d'autres situations ils doivent être induits (cas de la métallothionéine). Lorsque la stratégie de détoxification est activée et devient opérationnelle durant le cycle de vie de l'organisme exposé, on peut parler d'acclimatation physiologique. Si par contre la stratégie découle d'un processus de sélection naturelle chez des populations d'organismes exposés au métal, et si la résistance au métal peut être transférée à la progéniture, on parlera plutôt l'adaptation génétique. Sur le plan biologique, ces deux processus sont radicalement différents, mais leurs conséquences sont semblables : dans le deux cas la toxicité du métal est réduite et l'organisme acquiert de la tolérance/résistance. Signalons que ces deux derniers termes sont reliés l'un à l'autre, mais qu'ils ne sont pas strictement synonymes. Selon Mason et Jenkins (1995), la « résistance » implique la capacité de s'opposer aux effets négatifs du métal et de ramener/maintenir les processus physiologiques aux mêmes taux que chez les organismes non exposés. La « tolérance » suppose elle aussi une capacité de combattre les effets délétères du métal, mais de manière moins efficace, de sorte que les processus métaboliques continuent de se dérouler, mais à des taux anormaux.

2.3.3. Spéciation intracellulaire des métaux – un outil pour déceler la toxicité ?

Selon le modèle intégré de toxicité/détoxification présenté dans les sections précédentes, la détermination de la spéciation intracellulaire des métaux pourrait nous renseigner indirectement sur l'état physiologique d'un organisme. Considérons, par exemple, le cas d'un organisme accumulateur (p. ex., un mollusque) qui vit dans un environnement propre

mais qui doit soudainement faire face à des concentrations élevées d'un métal non essentiel comme le Cd (scénario d'une exposition épisodique). Dans les conditions initiales, l'organisme devrait être en mesure de protéger les ligands de type L_T et d'éviter que le Cd forme des complexes de type Cd- L_T ; une détermination de la spéciation intracellulaire du Cd montrerait des concentrations en $\text{Cd-}L_T$ très faibles. Si maintenant on changeait le régime d'exposition, en augmentant $[\text{Cd}^{2+}]$, la prise en charge du métal augmenterait et sa concentration intracellulaire suivrait. Si l'organisme était en mesure de détoxiquer le métal, la concentration en $\text{Cd-}L_I$ augmenterait progressivement avec le temps, mais celle en $\text{Cd-}L_T$ resterait faible et relativement constante. Si, par contre, le flux d'entrée du Cd dépassait les capacités de l'organisme à détoxiquer le métal, on s'attendrait à voir une augmentation de la concentration des formes $\text{Cd-}L_T$, et cette augmentation correspondrait au déclenchement des effets délétères chez l'organisme exposé.

Pour tester ce modèle de « débordement cellulaire », il faut pouvoir distinguer expérimentalement entre les formes $\text{M-}L_I$ et $\text{M-}L_T$. Si on se limite au cytosol, c'est à dire aux ligands intracellulaires dissous (acides aminés, peptides, métallothionéine, enzymes, etc.), on pourra homogénéiser la cellule, isoler le cytosol par ultracentrifugation, puis séparer les complexes $\text{M-}L_{\text{cytosol}}$ par chromatographie d'exclusion (Micallef *et al.*, 1992). Dans ce genre d'approche on associe les ligands de poids moléculaire élevé à des enzymes, une fraction qui normalement ne devrait pas contenir des métaux non essentiels; en suivant de près leur contenu en métaux, on peut en principe déceler l'initiation du « débordement cellulaire ». Pour considérer à la fois le cytosol, les organelles ainsi que les granules/lysosomes, on peut faire appel à des techniques de centrifugation différentielle (Wallace et Lopez, 1997) et les coupler à une étape finale de chromatographie d'exclusion, appliquée au cytosol.

Le modèle de « débordement cellulaire » a été testé à quelques reprises (Jenkins et Mason, 1988; Couillard *et al.*, 1995a,b; Baudrimont *et al.*, 1999), mais toujours selon un protocole impliquant un changement dans le régime d'exposition où les organismes tests ont dû subir une augmentation brusque de la concentration du métal dans leur milieu. Nous sommes en droit de nous demander si le modèle s'applique aussi chez les organismes qui sont exposés de manière chronique à des concentrations élevées de métaux, comme chez les organismes indigènes sédentaires vivant dans des lacs contaminés. C'est la question qui fait l'objet du « cas d'étude » présenté au chapitre 2. Cependant, avant d'y arriver, nous devons considérer en détail les métallothionéines, des molécules polyfonctionnelles auxquelles on attribue souvent un rôle de détoxication. C'est ce que nous ferons à la section 3 de ce chapitre.

3. MÉTALLOTHIONÉINES

3.1. INTRODUCTION

Les recherches scientifiques sur les métallothionéines (MT) débutent il y a plus de 40 ans avec l'isolation dans les années 1950 d'une protéine complexant le cadmium dans le rein du cheval (Margoshes et Vallee, 1957). Depuis ce temps les études sur ces protéines ont porté sur d'autres groupes animaux ; leurs fonctions sont mal cernées et restent l'objet d'intenses discussions. Le développement de ce domaine de recherche a bénéficié de contributions en biochimie, en médecine humaine et vétérinaire, en nutrition, en pathologie, en cancérologie, en toxicologie et en écotoxicologie. Il peut être constaté que l'intérêt suscité par les métallothionéines reste élevé, eu égard au nombre d'articles publiés d'année en année (> 1000 : Nordberg, 1998) et les conférences internationales sur le sujet depuis 20 ans (Kägi et Kojima, 1987 ; Kägi et Nordberg ; 1979, Suzuki *et al.*, 1993). La présente revue documentaire s'appuie sur ce savoir ainsi que sur nos recherches sur des organismes aquatiques d'eau douce. Le lecteur peut également consulter des publications et articles de revue récents portant sur la purification, la caractérisation et la quantification des métallothionéines (Stillman *et al.*, 1992 ; Stillman, 1995), et les synthèses qui furent faites sur les poissons et invertébrés aquatiques (Amiard et Cosson, 1997 ; Cosson et Amiard, 2000 ; George et Olsson, 1994 ; Roesijadi, 1992).

3.2. BIOCHIMIE

Appartenant au groupe des métalloprotéines, les métallothionéines présentent des caractéristiques uniques (Roesijadi, 1992 ; Stillman, 1995) :

- une forte teneur en cystéine, atteignant 33 % sur les 61 acides aminés que comportent les formes mammaliennes ;
- une absence totale d'acides aminés aromatiques ;
- un contenu élevé et une forte affinité pour les métaux ;
- un poids moléculaire de 6–7 kD, ou de 10 kD lorsque celui-ci est estimé à partir de la chromatographie liquide d'exclusion ;
- un spectre d'absorption dans l'ultraviolet comportant une absence d'absorbance à 280 nm, en raison de l'absence d'acides aminés aromatiques, et un pic d'absorbance à des longueurs d'ondes qui varient selon le métal qui est associé aux groupements thiols (Cd : 250 nm) ;
- l'absence de ponts disulfure ;
- une grande thermostabilité et la capacité de résister aux attaques acides.

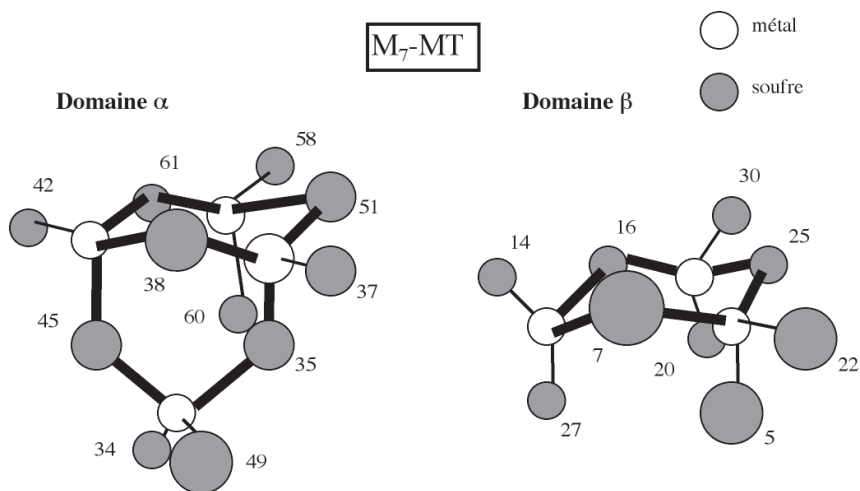
La structure tridimensionnelle de ces protéines a été révélée grâce à la résonance magnétique nucléaire et aux techniques de diffraction aux rayons X. Typiquement, on peut distinguer deux domaines globulaires (α et β) liés entre eux par deux lysines (figure 1.6). Le domaine α comporte 11 cystéines alors que le domaine β en comporte 9. Les ions métalliques qui leur sont associés sont isolés de l'extérieur par la chaîne peptidique. Ces deux domaines paraissent indépendants l'un de l'autre et semblent arborer des affinités respectives différentes pour les métaux. L'ensemble forme une structure dynamique dans laquelle les échanges intramoléculaires et intermoléculaires de métaux avec d'autres ligands cellulaires ont pu être mis en évidence. Ces échanges sont permis par la présence de deux crevasses donnant accès aux liaisons cystéiniques des sites de fixation dans chacun des domaines (Brouwer *et al.*, 1993 ; Stillman, 1995). On a entre autres découvert l'existence de complexes CuMT-GSH à l'intérieur de cellules de vertébrés et d'invertébrés (Brouwer *et al.*, 1993).

En contraste avec cette relative aisance dans les transferts intermoléculaires de métaux, les métallothionéines retiennent fortement les ions métalliques qui leur sont associés. Des constantes d'association de 2×10^{12} (pH 7) et 2×10^{19} (pH 8) sont rapportées respectivement pour le Zn et le Cd (MT mammalienne : Roesijadi, 1992 ; Vallee et Maret, 1993). *In vitro*, l'affinité des métaux pour les MT décroît généralement dans l'ordre $\text{Hg(II)} > \text{Ag(I)} \approx \text{Cu(I)} > \text{Cd(II)} > \text{Zn(II)}$ (Stillman, 1995). Les rapports stœchiométriques déduits à partir de techniques de spectroscopie optique indiquent généralement que dans le règne animal, une molécule de MT peut lier sept ions pour le Hg(II), le Cd(II) et le Zn(II), 12 pour le Cu(I) et 12, 17 ou 18 pour l'Ag(I). Des rapports particuliers sont observés chez certains organismes en fonction notamment de l'abondance des groupements thiols (Stillman, 1995).

Les métallothionéines se présentent naturellement sous une multiplicité de formes. Une même molécule peut voir ses deux domaines occupés par différents ions métalliques. De plus, on a pu observer plusieurs isoformes dans un même organisme et dans différents phylums. Ces protéines semblent ubiquistes – on en a rapporté chez l'humain (quatre isoformes), les mammifères terrestres et aquatiques, les amphibiens et reptiles, les oiseaux, les poissons, les protistes unicellulaires, les champignons microscopiques et les végétaux (Bebianno *et al.*, 1992 ; Bell et Lopez, 1985 ; Chattai *et al.*, 1997 ; Couillard, 1997 ; Hamer, 1986 ; High *et al.*, 1997 ; Laflamme *et al.*, 2000 ; Mackay *et al.*, 1993 ; Overnell *et al.*, 1981 ; Rauser, 1993 ; Roesijadi, 1992 ; Santovino *et al.*, 2000 ; Schlenck *et al.*, 1995 ; Shears et Fletcher, 1984 ; Sulaiman *et al.*, 1991 ; Stillman, 1995 ; Suzuki *et al.*, 1993 ; Unger *et al.*, 1991).

Figure 1.6

Structure tridimensionnelle des deux domaines de chélation métallique de la métallothionéine 2a du foie de lapin



Le chiffrage des structures renvoie à la localisation des cystéines le long de la chaîne peptidique de la protéine.

Source : Adapté de Stillman (1995).

Les structures primaires ne sont pas connues pour toutes les métallothionéines isolées à ce jour. Cependant, il est possible de définir trois classes de MT sur la base de composition en acides aminés et de leur mode de formation. Le principal critère retenu dans cet exercice est l'alignement des séquences cys-cys, cys-aaX-cys, et cys-aaX-aaY-cys où aaX et aaY représentent un acide aminé autre que la cystéine (Fowler *et al.*, 1987) :

- la classe I regroupe les polypeptides montrant un alignement en cystéine très similaire à celui de la MT du rein de cheval ;
- la classe II comprend les polypeptides avec un alignement en cystéine non homologue à la MT équine ; les formes isolées notamment dans les levures et certains végétaux terrestres appartiennent à cette classe ;
- la classe III incluent les polypeptides non directement produits par un gène, tels la cadystine et les phytochélatines, ces dernières étant un assemblage Glu-Cys(n)-Gly où n varie de 2 à 11. Ces composés ont été isolés dans les champignons, plantes et algues.

3.3. SYNTHÈSE ET DÉGRADATION

Les métallothionéines, à l'exception de celles de la classe III, sont synthétisées par un processus d'induction. Au sens biologique, l'induction désigne l'activation d'un phénomène se produisant avec un certain retard relativement à l'agent déclencheur de celui-ci. La complexité du mécanisme cellulaire de biosynthèse est responsable de ce délai dans la production des MT. Le tableau 1.7 fait état des facteurs physiologiques et expérimentaux induisant la synthèse des métallothionéines chez les mammifères (Cousins, 1985 ; Onasaka *et al.*, 1987 ; Palmiter, 1998).

Tableau 1.7

Facteurs physiologiques et expérimentaux entraînant l'induction de métallothionéine chez les mammifères

Facteurs physiologiques	Facteurs expérimentaux		
Développement	Ag	Adjuvant contre l'arthrite	Isopropanol
Zinc dans la diète	Cd	Agents alkylants	Acide rétinoïque
Infection (citokines)	Cu	Endotoxine	Térébenthine
Jeûne	Hg	Epinéphrine	Chloroforme
Stress (capture)	Zn	Glucocorticoïdes	Maléate de diéthyle
Diabète	Ni	Glucagon	Paraquat
	Co	Interleukine 1	CCl ₄
	Bi		H ₂ O ₂

Les stimuli physiologiques et hormonaux promeuvent habituellement la production de Zn- ou de Cu-thionéine (Stillman, 1995). Cependant, il est généralement admis que les métaux sont les plus forts inducteurs de MT (Hamilton et Mehrle, 1986 ; Klaassen, 1981). Des expériences avec des cultures cellulaires dont on a modifié le matériel génétique ont démontré que l'intensité de l'expression de ces métalloprotéines est fortement dépendante du métal inducteur. En présence de zinc dans le milieu de culture, les potentiels d'induction des métaux sont dans l'ordre Cd > Cu ~ Zn > Ag > Bi > Hg > Ni ~ Co (Palmiter, 1994). En environnement naturel, les variations en MT sont fréquemment associées à la présence de métaux traces dans le milieu ambiant (Amiard et Cosson, 1997 ; Couillard, 1997).

Des modèles cellulaires de synthèse et de dégradation des métallothionéines ont été récemment proposés (Davis et Cousins, 2000 ; Hogstrand, 1991 ; Palmiter, 1994 ; Roesijadi, 1996 ; figure 1.7). Leurs caractéristiques individuelles ne sont pas toutes fondées sur des certitudes et

plusieurs de celles-ci restent à valider en milieu naturel. L'induction des MT par des métaux et agents oxydants débiterait par un accroissement initial du zinc cellulaire labile. Les métaux faisant intrusion déplaceraient le zinc des ligands avec lesquels il serait initialement complexé. Les agents oxydants (p. ex., HO•, NO•, GSSG) feraient de même en libérant le Zn du réservoir initial de Zn-thionéine (Davis et Cousins, 2000). Ce zinc rendu disponible serait habilité à se lier à des éléments inhibiteurs de transcription (EIT), ces derniers faisant office de verrou à des facteurs de transcription (MTF-1). Le décodage d'un gène spécifique à la MT s'initierait par la complexation de la molécule MTF-1 avec l'élément régulateur (ERM) correspondant en amont du gène. Les complexes métal-ligand initialement formés représenteraient des interactions toxiques (p. ex., turbot, George *et al.*, 1996), qui seraient réparés par échange métallique avec la Zn-MT nouvellement synthétisée. L'élimination des métaux en excès procéderait par exocytose de lysosomes renfermant des formes polymérisées de complexes métal-MT. Ce mécanisme paraît plus efficace à éliminer le Cu et le Zn cellulaire excédentaire que le Cd (Hogstrand, 1991 : mammifères et poissons ; George, 1983 : mollusques). Ces observations sont en accord avec les demi-vies estimées très longues du Cd chez de nombreux vertébrés (Hogstrand, 1991, humain inclus) et invertébrés (George, 1983). Comme indiqué plus haut, ce cycle d'induction se montrerait également efficace à réduire la quantité d'oxydants cellulaires avec comme acteur central la Zn-MT nouvellement produite, faisant office d'antioxydant ultime (Powell, 2000).

Plusieurs autres éléments régulateurs de la transcription des gènes MT ont été mis en évidence (figure 1.6), dont un réceptif aux glucocorticoïdes (ERG : Davis et Cousins, 2000) et l'un répondant aux électrophyles (ERA, récemment isolé : Andrews, 2000). Le facteur de transcription MTF-1 a été isolé dans de nombreux groupes animaux – il s'agit une protéine du type Cys₂-His₂ caractérisée par la présence de structures en digitation. Le zinc paraît nécessaire au maintien de ces structures et à l'interaction du facteur MTF-1 avec l'ADN cellulaire (Andrews, 2000 ; voir également Vallee et Maret, 1993).

3.4. FONCTIONS

Il a été évoqué en introduction que les fonctions biologiques réelles des métallothionéines sont encore sujettes à controverse. Ce débat continue d'être alimenté par des observations récentes selon lesquelles des souris transgéniques dont on a inactivé les gènes codant pour les MT peuvent quand même survivre et ne pas présenter de symptômes de déficience en zinc dans la mesure où elles sont nourries avec une diète équilibrée. Le

tout suggère que d'autres mécanismes homéostatiques jouent un rôle prépondérant dans la stabilisation des réservoirs de zinc et l'élimination d'apports excédentaires de ce métal (Dalton *et al.*, 1996 ; Kelly *et al.*, 1996).

Si de tels mécanismes (non basés sur la MT) apparaissent efficaces à réguler les métaux essentiels, il semble en aller tout autrement pour les métaux non essentiels. Par exemple, à l'exception des bactéries, les organismes vivants ne semblent pas avoir développé de mécanismes d'excrétion efficace pour le cadmium (Palmiter, 1998 ; Simkiss et Taylor, 1995). Sa détoxification se ferait alors par un système chargé de sa séquestration à l'intérieur de l'organisme – la MT se veut un des candidats logiques à ce poste (Palmiter, 1998). De nouvelles études contribuent à la diversité déjà riche en formes et en fonctions potentielles attribuées à cette classe de métalloprotéines. Quelques-unes des plus importantes sont résumées dans les sections suivantes.

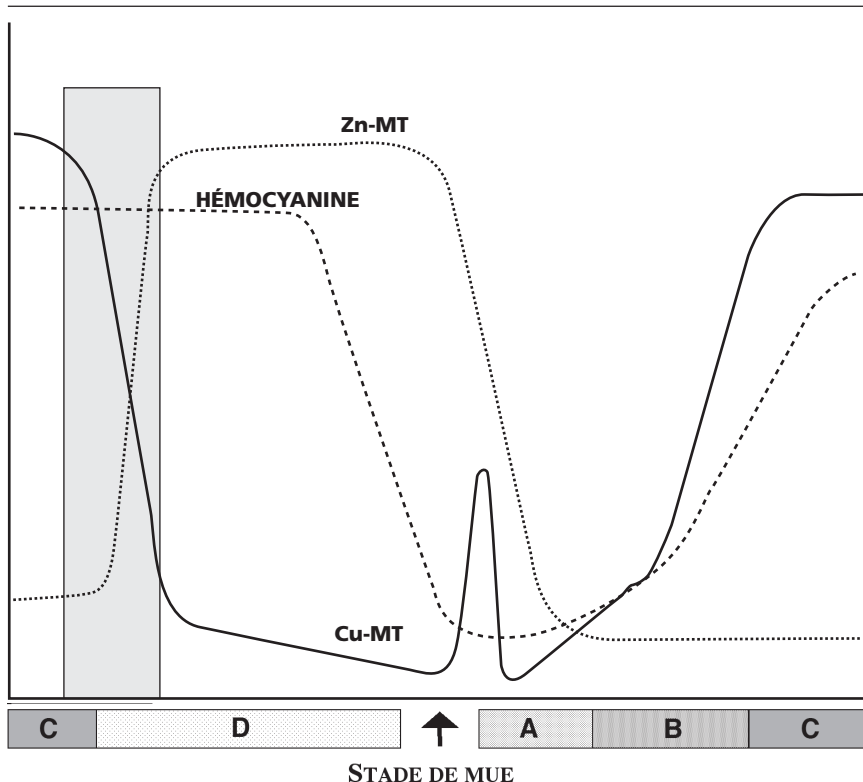
3.4.1. Rôle dans la régulation des métaux essentiels

La propension des métallothionéines à échanger des métaux s'est révélée à partir des connaissances de leur structure et des aspects dynamiques liés à leur fonctionnement (section 3.2). Des échanges intermoléculaires de Cu et de Zn avec les MT comme molécules donneuses ont par ailleurs été mis en évidence dans des expériences *in vitro* (Vallee et Maret, 1993). Cependant, d'autres recherches illustrent que les MT peuvent remplir des fonctions très diverses selon l'organe ou l'espèce animale considérée.

Une série de travaux intéressants effectués par Engel et Brouwer ont montré que les MT peuvent jouer un rôle actif dans le métabolisme et la mobilisation des métaux essentiels au cours du cycle de mue des crustacés décapodes (figure 1.8). Ainsi, les MT peuvent séquestrer le Cu provenant du catabolisme de l'hémocyanine (pigment respiratoire contenant du Cu) en pré-mue ; et elles peuvent devenir donneuses de Cu pour la synthèse d'hémocyanine au cours de la reconstitution des tissus (Engel et Brouwer, 1987). La glutathione serait une intermédiaire dans ce dernier processus (ligand pour le Cu(I) : Engel et Brouwer, 1993). Il est établi que ce mécanisme de mue est sous le contrôle d'hormones ecdystéroïdes. Dans ce contexte, Torreblanca *et al.* (1996) injectèrent l'hormone 20-hydroxyecdysone à des spécimens mâles de l'écrevisse *Procambarus clarkii* se trouvant en inter-mue. L'hormone déclencha la perte de protéines, Cu et Zn dans l'hépatopancréas. En contrepartie les niveaux de MT augmentèrent et le rapport molaire Zn/Cu bascula en faveur du zinc dans l'organe. Ces changements correspondent assez bien à ceux décrits par Engel et Brouwer (1987) durant la transition de l'inter-mue à la pré-mue chez le crabe bleu.

Figure 1.8

Changements dans les concentrations d'hémocyanine, de cuivre- et de zinc-thionéine dans l'hépatopancréas du crabe bleu *Callinectes sapidus* au cours de son cycle de mue



La région ombrée indique une période de transition d'une Cu-MT vers une Zn-MT.

Les stades de mue représentés sont :

A : carapace molle ;

B : carapace en voie de durcissement ;

C : inter-mue ;

D : pré-mue.

La flèche désigne l'ecdyse.

Source : Adapté d'Engel et Brouwer (1993).

Chez les petits mammifères, les métallothionéines semblent représenter un réservoir de zinc qui peut être mobilisé lors d'épisodes de carence en ce métal. Les MT protégeraient également les tissus de charges toxiques en Zn (Dalton *et al.*, 1996 ; Kelly *et al.*, 1996 ; Palmiter, 1998). D'autre part, une métallothionéine d'un nouveau type (nommée MT-III) a récemment été isolée dans le cerveau humain. Son expression n'est pas régulée par

les métaux ou les glucocorticoïdes et elle remplit le rôle inusité d'inhibiteur de croissance. On a associé son mal fonctionnement à la maladie d'Alzheimer (Vallee et Maret, 1993).

3.4.2. Protection contre le stress oxydant

La découverte récente d'éléments régulateurs de transcription répondant à des agents oxydants (figure 1.7) désigne sans ambiguïté un rôle pour la métallothionéine dans la défense cellulaire contre le stress oxydant (p. ex., Wright *et al.*, 2000, poissons). La métalloprotéine est vue comme un anti-oxydant direct parce que ses groupements thiols ont la capacité de capturer les radicaux hydroxyle $\text{HO}\bullet$ et superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Viarengo, 1989). De plus, le zinc libéré par l'oxydation de la MT est un antioxydant puissant et permettrait de stabiliser les membranes endommagées (Powell, 2000). La comparaison des capacités antioxydantes du dithiothréitol, de l'apothionéine et de la Zn-thionéine amena Thomas *et al.* (1986) à conclure que la libération d'ions Zn de la MT était bien plus importante que l'oxydation des groupes thiols de la protéine pour diminuer les dommages causés aux membranes par les oxydants. Ce type de stress est généralement répandu dans le règne animal et peut être déclenché par des métaux, des xénobiotiques et d'autres substances naturelles favorisant les phénomènes de peroxydation lipidique. La privation d'eau et de nourriture sont d'autres agents déclencheurs (Bremner et Beattie, 1990).

3.4.3. Détoxification des métaux traces

La découverte en 1957 d'une métallothionéine complexant le Cd dans le foie de cheval amena initialement Vallee et ses collaborateurs à déduire l'existence d'un système biologique de détoxification pour ce métal (Vallee et Maret, 1993). Cette fonction a depuis été mise en doute entre autres en raison de l'ancienneté de la protéine dans le monde vivant et du caractère récent (à l'échelle géologique) de la pollution de la biosphère par les métaux traces. À cet égard, il reste possible que la détoxification interne des métaux soit une propriété des MT plutôt qu'un rôle affirmé (Cosson *et al.*, 1991 ; Palmiter, 1998). Néanmoins, certaines populations animales semblent avoir mis à profit cette propriété leur conférant la possibilité de vivre et de se reproduire en un environnement enrichi en métaux (discuté ci-après).

Deux catégories d'expériences appuient fermement la thèse d'un rôle (ou effet) protecteur des métallothionéines en regard de la toxicité de métaux essentiels ou non (tableau 1.8). Primo, le préconditionnement en laboratoire d'organismes à des concentrations de Cd, Cu ou Zn suffisantes pour induire la synthèse de MT leur a donné une tolérance accrue à des expositions métalliques subséquentes (Hogstrand, 1991 ; Klaverkamp et Duncan,

1987 ; Roesijadi et Fellingham, 1987 ; CNRC, 1985). Par ailleurs, des observations sur des populations naturelles d'éphémères indiquent que des larves d'espèces sensibles au Cd ne synthétisent pas de MT en réponse à une agression par ce métal. Ces espèces sont introuvables dans les milieux contaminés, en conformité avec leur sensibilité au Cd (Aoki *et al.*, 1989).

Tableau 1.8

**Études montrant le rôle des métallothionéines
dans l'acquisition d'une tolérance accrue aux métaux**

Organisme	Type d'expérience	Référence
Meunier noir <i>Catostomus commersoni</i>	Tests de toxicité <i>in situ</i> en enclos	Klaverkamp <i>et al.</i> , 1991
Saumon Coho juvénile <i>Oncorhynchus kisutch</i>	Étude en laboratoire	McCarter et Roch, 1983
Carpe <i>Cyprinus carpio</i>	Étude en laboratoire	Kito <i>et al.</i> , 1982
Truite arc-en-ciel juvénile <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Étude en laboratoire	Dixon et Sprague, 1981a,b
Moule bleue <i>Mytilus edulis</i>	Étude en laboratoire	Roesijadi et Fellingham, 1987
Populations naturelles de mouches à fruit <i>Drosophila melanogaster</i>	Étude en laboratoire	Maroni <i>et al.</i> , 1987
Souris transgéniques	Utilisation d'une souche avec une mutation 'MT-null' inactivant le gène MT	Habeebu <i>et al.</i> , 2000
	Utilisation d'une souche sauvage produisant de la MT	Liu <i>et al.</i> , 1999

La seconde classe d'expériences comporte une manipulation génétique de lignées cellulaires, ou d'organismes entiers, de façon à les rendre incapables de produire de la MT ou à en faire des « sur-producteurs » (souvent par duplication de gène, voir le tableau 1.8). Des expériences en laboratoire ont montré la grande sensibilité des premiers et la résistance accrue des seconds à l'exposition aux métaux traces (Roesijadi, 1992 : exemple avec Cu et levure, Hogstrand, 1991).

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au début de ce chapitre, nous avons insisté sur les propriétés qui différencient les contaminants inorganiques (métaux et métalloïdes) des (micro)polluants organiques. Rappelons, à titre d'exemple, la présence naturelle des métaux dans la croûte terrestre, leur persistance infinie (pas sujets à la biodégradation) et leur implication comme éléments essentiels requis pour le métabolisme des organismes vivants. Dans un contexte écotoxicologique, il importe donc de considérer séparément ces deux classes de contaminants. Par ailleurs, le nombre de contaminants métalliques est limité par la réalité du Tableau périodique des éléments (~80 métaux et métalloïdes). L'identification parmi ceux-ci des métaux « prioritaires », dans un contexte écotoxicologique, fait appel à des critères biogéochimiques (quantification de l'influence des activités humaines sur les cycles d'éléments) et toxicologiques (toxicité inhérente des différents métaux). La considération de tels critères mène à l'identification d'un nombre plus restreint de métaux d'intérêt prioritaire (p. ex., Cd, Cu, Hg, Pb, Zn).

Dans un deuxième temps, nous avons examiné l'interaction des métaux avec les organismes aquatiques, en considérant la séquence suivante : la spéciation des métaux en solution → leurs interactions avec les membranes cellulaires → leur transport transmembranaire → leurs réactions intracellulaires → leur détoxification. De cette analyse nous pouvons dégager quelques conclusions générales :

- La spéciation d'un métal dissous dépend de la composition de la solution aqueuse dans laquelle il se trouve (pH ; potentiel d'oxydo-réduction ; concentration des divers ligands) et de son affinité pour les ligands disponibles. À cause de la variabilité inévitable de la composition des eaux naturelles, la spéciation chimique d'un métal varie d'un milieu à un autre ; cependant, malgré cette variabilité inhérente, les propriétés intrinsèques du cation métallique s'avèrent encore plus importantes dans la détermination de la spéciation d'un métal et les mêmes tendances générales se manifestent dans divers milieux (p. ex., proportion du métal présente sous forme d'ions libres plus importante dans les cas du Cd et du Zn que pour le Cu ou le Pb).
- À quelques exceptions près, les métaux cationiques et leur complexes ne peuvent traverser des membranes biologiques par simple diffusion ; la prise en charge (*uptake*) des métaux fait plutôt appel au transport facilité, impliquant des transporteurs protéiques intégrés à la membrane.

- Les transporteurs impliqués dans le transfert transmembranaire des cations répondent à la concentration de l'ion métallique libre dans la solution externe, $[M^{z+}]$. Le modèle du ligand biotique (BLM), qui tient compte de cette dépendance, a démontré une utilité indéniable dans la prédiction de la bioaccumulation de plusieurs métaux cationiques et de leurs effets associés (surtout pour les organismes aquatiques qui obtiennent leurs métaux principalement par la voie aqueuse). Il faut cependant noter que la grande majorité des expériences qui appuient le BLM ont été réalisées en laboratoire, dans des milieux sans matière organique naturelle ; l'applicabilité du modèle gagnerait à être évaluée en milieu naturel et pour diverses combinaisons métal-organisme.
- Pour saisir comment les métaux exercent leur toxicité, il faut comprendre leurs rôles métaboliques essentiels (rôle stérique, rôle catalytique et rôle oxydatif/réductif). Les métaux jouant ces rôles métaboliques essentiels sont tous liés à des molécules organiques par des réactions de complexation. Ces réactions de complexation sont réversibles ; par conséquent, un métal « étranger » qui entre dans une cellule peut déplacer un métal/cation essentiel. Ce genre de déplacement ne se limite pas aux métaux « étrangers » ; même un métal essentiel, s'il est présent à des concentrations intracellulaires anormalement élevées, pourra provoquer un tel déplacement par la loi d'action des masses. En d'autres termes, l'action toxicologique d'un métal découle de son interaction anormale avec une biomolécule essentielle.
- Une fois accumulé, un métal donné peut normalement réagir avec une variété de ligands intracellulaires et provoquer une diversité d'effets. De même, un ligand intracellulaire donné peut normalement accepter différents métaux (sélectivité imparfaite), donc un effet donné peut être induit par plus d'un métal. Il s'ensuit qu'aucune cible intracellulaire ne serait entièrement spécifique à un seul métal et qu'aucun métal ne s'avérerait entièrement spécifique à une seule cible.
- Plusieurs organismes ont développé des mécanismes efficaces pour contrôler leurs concentrations internes de métaux essentiels et pour maintenir celles-ci dans des gammes relativement restreintes (contrôle homéostatique). Ces mécanismes de contrôle homéostatique peuvent également jouer un rôle dans la détoxification de métaux non essentiels (p. ex., le cadmium (Cd), le plomb (Pb) ou le mercure (Hg)).
- Dans certains cas, l'organisme contrôle la concentration intracellulaire totale du métal, en empêchant son entrée dans la cellule ou en accélérant sa sortie (cas des organismes « régulateurs », qui

contrôlent leur teneur intracellulaire du métal à l'intérieur d'une gamme étroite); dans d'autres cas, l'organisme synthétise des ligands d'affinité appropriée, qui permettent de séquestrer le métal dans le milieu intracellulaire et de le rendre non disponible (cas des organismes « accumulateurs », dont les teneurs intracellulaires en métal sont généralement élevées et varient en fonction de l'exposition).

- Plusieurs organismes accroissent leur concentration interne de métallothionéine pour se protéger des métaux en excès dans leur milieu environnant. Ce faisant, ils deviennent plus tolérants à des expositions métalliques subséquentes.
- La métallothionéine est actuellement utilisée comme outil dans divers programmes de suivi environnemental des pollutions métalliques en milieu aquatique. Elle indique si l'organisme sentinelle a été exposé à une concentration biodisponible de métal dans son milieu ambiant. Cependant, la véritable utilité de cet outil résiderait dans son potentiel à prédire ou à indiquer si des effets délétères se sont produits sur l'organisme sentinelle en question en raison de la pression de contamination. Un tel potentiel n'a pas encore été démontré, mais les données disponibles demeurent encourageantes à cet égard.

Considérons maintenant les perspectives de recherche dans ce domaine. Selon le modèle intégré de toxicité/détoxification que nous avons développé dans ce chapitre, la détermination de la spéciation intracellulaire des métaux pourrait en principe s'avérer utile pour diagnostiquer l'état physiologique d'un organisme (concept d'un biomarqueur d'effets). Il s'agirait de pouvoir différencier les métaux liés à des biomolécules sensibles de ceux qui ont été séquestrés à l'intérieur de la cellule sous forme inerte. En se limitant au cytosol, c'est-à-dire aux ligands intracellulaires dissous (acides aminés, peptides, métallothionéine, enzymes, etc.), on peut envisager l'homogénéisation du tissu, la séparation du cytosol par ultracentrifugation, puis la séparation des complexes M-L_{cytosol} par chromatographie. Dans ce genre d'approche on associe les ligands de poids moléculaire élevé à des enzymes, une fraction qui normalement ne devrait pas contenir des métaux non essentiels; en suivant de près leur contenu en métaux, on peut en principe déceler l'initiation du « débordement cellulaire ». Pour considérer à la fois le cytosol, les organelles ainsi que les granules/lysosomes, on peut faire appel à des techniques de centrifugation différentielle et les coupler à une étape finale de chromatographie, appliquée au cytosol. L'application de telles approches intégrées nous semble prometteuse, mais il faudra s'assurer que les techniques utilisées pour séparer les diverses fractions intracellulaires ne perturbent pas la répartition subcellulaire originale des métaux (p. ex., les complexes M-L_{cytosol} sont-ils suffisamment stables pour demeurer intacts pendant les étapes de séparation chromatographique ?).

Rappelons aussi que toutes les expériences qui appuient le modèle de « débordement cellulaire », sans exception, ont été réalisées selon un protocole impliquant un changement dans le régime d'exposition, c'est-à-dire que les organismes tests ont subi une augmentation brusque de la concentration du métal dans leur milieu (scénario d'une exposition épisodique, potentiellement aiguë). Il est légitime de se demander si le modèle s'applique aussi chez les organismes qui sont exposés de manière chronique à des concentrations élevées de métaux, comme chez les organismes indigènes sédentaires vivant dans des lacs modérément contaminés. C'est une question pertinente : avec la dépollution de nos lacs et cours d'eau, les cas de contamination aiguë deviennent de plus en plus rares, mais les cas de contamination chronique demeurent abondants.

RÉFÉRENCES

- AMIARD, J.-C. et R.P. COSSON (1997). « Les métallothionéines », dans L.T. Lagadic *et al.* (édit.), *Biomarqueurs en écotoxicologie – Aspects fondamentaux*, Paris, Masson, p. 53-66.
- ANDREWS, G.K. (2000). « Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions », *Biochemistry and Pharmacology*, vol. 59, p. 95-104.
- AOKI, Y. *et al.* (1989). « Comparison of cadmium-binding protein induction among mayfly larvae of heavy metal resistant (*Baetis thermicus*) and susceptible species (*B. yoshinensis* and *B. sahoensis*) », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 93C, p. 345-347.
- BAUDRIMONT, M. *et al.* (1999). « Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France): II. Metallothionein response to metal exposure », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 18, p. 2472-2477.
- BEBIANNO, M.J., W.J. LANGSTON et K. SIMKISS (1992). « Metallothionein induction in *Littorina littorea* (Mollusca: Prosobranchia) on exposure to cadmium », *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, vol. 72, p. 329-342.
- BELL, J.U. et J.M. LOPEZ (1985). « Isolation and partial characterization of a cadmium-binding protein from the liver of alligators exposed to cadmium », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 82C, p. 123-128.
- BLOCK, M. et A. WICKLUND GLYNN (1992). « Influence of xanthates on the uptake of ^{109}Cd by Eurasian dace (*Phoxinus phoxinus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 11 p. 873-879.
- BORGSMANN, U. et C.C. CHARLTON (1984). « Copper complexation and toxicity to *Daphnia* in natural waters », *Journal of Great Lakes Research*, vol. 10, p. 393-398.
- BOWEN, H.J.M. (1979). « Environmental Chemistry of the Elements », Londres, Academic Press, p. 130-131.
- BREMNER, I. et J.H. BEATTIE (1990). « Metallothionein and the trace minerals », *Annual Review of Nutrition*, vol. 10, p. 63-83.
- BROUWER, M., T. HOEXUM-BROUWER et R.E. CASHION (1993). « A putative glutathione-binding site in Cd,Zn-metalllothionein identified by equilibrium partitioning and molecular-modelling studies », *Biochemistry Journal*, vol. 294, p. 219-225.
- BUCHWALTER, D.B., G. LINDER et L.R. CURTIS (1996). « Modulation of cupric ion activity by pH and fulvic acid as determinants of toxicity in *Xenopus laevis* embryos and larvae », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 15, p. 568-573.
- BUS, J.S. et J.E. GIBSON (1979). « Lipid peroxidation and its role in toxicology », *Reviews in Biochemistry and Toxicology*, vol. 1, p. 125-149.
- CAMPBELL, P.G.C. (1995). « Interactions between trace metals and organisms: critique of the free-ion activity model », dans A. Tessier et D. Turner (édit.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, Chichester, J. Wiley and Sons Ltd., p. 45-102.
- CAMPBELL, P.G.C. *et al.* (2002). « Metal bioavailability to phytoplankton – applicability of the Biotic Ligand Model », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 133, p. 189-206.
- CAMPBELL, P.G.C., J.N. GALLOWAY et P.M. STOKES (1985). *Acid Deposition – Effects on Geochemical Cycling and Biological Availability of Trace Elements*, Washington, National Academy Press, 83 p.
- CAMPBELL, P.G.C. et P.M. STOKES (1985). « Acidification and toxicity of metals to aquatic biota », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 42, p. 2034-2049.
- CAMPBELL, P.G.C., M.R. TWISS et K.J. WILKINSON (1997). « Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: Implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 54, p. 2543-2554.
- CARSON, R. (1962). *Silent Spring*, Boston, Houghton Mifflin.

- CHAPMAN, P.M. (1996). « Hazard identification, hazard classification and risk assessment for metals and metal compounds in the aquatic environment », International Council on Metals and the Environment, Ottawa, 31 p.
- CHAPMAN, P.M. et F. WANG (2000). « Issues in ecological risk assessments of inorganic metals and metalloids », *Human and Ecological Risk Assessment*, vol. 6, p. 965-988.
- CHAPMAN, P.M. *et al.* (1998). « Ecotoxicology of metals in aquatic sediments : Binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 55, p. 2221-2243.
- CHATTAL, M. *et al.* (1997). « The isolation of a novel metallothionein-related cDNA expressed in somatic and zygotic embryos of Douglas-fir : Regulation by ABA, osmoticum, and metal ions », *Plant Molecular Biology*, vol. 34, p. 243-254.
- CHEN, Z. et L.M. MAYER (1998). « Mechanisms of Cu solubilization during deposit feeding », *Environmental Science and Technology*, vol. 32, p. 770-775.
- CHOWDHURY, M.J. et R. BLUST (2001). « A mechanistic model for the uptake of waterborne strontium in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) », *Environmental Science and Technology*, vol. 35, p. 669-675.
- CONSEIL CANADIEN DES MINISTRES DE L'ENVIRONNEMENT (CCME) (1996). « A Framework for Ecological Risk Assessment : General guidance », Winnipeg, CCME, 50 p.
- CONSEIL NATIONAL DE RECHERCHES DU CANADA (CNRC) (1985). « The role of biochemical indicators in the assessment of aquatic ecosystem health – their development and validation », Conseil national de recherches du Canada, Ottawa, Publication 24371, 119 p.
- COSSON, R.P. et J.-C. AMIARD (2000). « Use of metallothioneins as biomarkers of exposure to metals », dans L.T. Lagadic *et al.* (edit.), *Use of Biomarkers for Environmental Quality Assessment*, Enfield, NH, Science Publishers, p. 79-112.
- COSSON, R.P., C. AMIARD-TRIQUET et J.-C. AMIARD (1991). « Metallothioneins and detoxication. Is the use of detoxication protein for MTs a language abuse ? », *Water Air and Soil Pollution*, vol. 57-58, p. 555-567.
- COUILLARD, Y. (1997). « Évaluation technique de la métallothionéine comme biomarqueur en vue de son utilisation par l'industrie minière », *Rapport technique pour le programme d'Évaluation des Techniques de Mesure d'Impacts en Milieu Aquatique (ETIMA), Projet ETIMA 2.2.1*, préparé pour Ressources naturelles Canada, CANMET, 191 p.
- COUILLARD, Y. *et al.* (1995a). « Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. I. Temporal changes of metallothionein and metal (Cd, Cu, Zn) concentrations in soft tissues », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 52, p. 690-702.
- COUILLARD, Y. *et al.* (1995b). « Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. II. Metallothionein response to metal exposure, evidence for cytotoxicity, and links to effects at higher levels of biological organization », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 52, p. 703-715.
- COUSINS, R.J. (1985). « Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc : Special reference to metallothionein and ceruloplasmin », *Physiology Reviews*, vol. 65, p. 238-309.
- CROOT, P.L. *et al.* (1999). « Uptake of ⁶⁴Cu-oxine by marine phytoplankton », *Environmental Science and Technology*, vol. 33, p. 3615-3621.
- DALY, H.R. *et al.* (1990). « Copper toxicity to *Paratya australiensis*: III. Influence of dissolved organic matter », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 9, p. 1013-1018.
- DALTON, T. *et al.* (1996). « Transgenic mice that overexpress metallothionein-I resist dietary zinc deficiency », *Journal of Nutrition*, vol. 126, p. 825-833.
- DAVIS, S.R. et R.J. COUSINS (2000). « Metallothionein expression in animals : A physiological perspective on function », *Journal of Nutrition*, vol. 130, p. 1085-1088.
- DI TORO, D.M. *et al.* (2001). « Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 20, p. 2383-2396.

- DIXON, D.G. et J.B. SPRAGUE (1981a). « Acclimation to copper by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) – A modifying factor in toxicity », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 38, p. 880-888.
- DIXON, D.G. et J.B. SPRAGUE (1981b). « Copper bioaccumulation and hepatoprotein synthesis during acclimation to copper by juvenile rainbow trout », *Aquatic Toxicology*, vol. 1, p. 69-81.
- ENGEL, D.W. et M. BROUWER (1993). « Crustaceans as models for metal metabolism : I. Effects of the molt cycle on blue crab metal metabolism and metallothionein », *Marine Environmental Research*, vol. 35, p. 1-5.
- ENGEL, D.W. et M. BROUWER (1987). « Metal regulation and molting in the blue crab, *Callinectes sapidus*: Metallothionein function in metal metabolism », *Biological Bulletin*, vol. 173, p. 239-251.
- ENVIRONNEMENT CANADA (1997). « Environmental Assessments of Priority Substances under the Canadian Environmental Protection Act », *Guidance Manual Version 1.0*, EPS/2/CC/3E:1-1 à 8-10, xvii + 86 p.
- ENVIRONNEMENT CANADA ET SANTÉ CANADA (2001). « Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999). Liste des substances d'intérêt prioritaire, rapport d'évaluation : Rejets des fonderies de première et de deuxième fusion et des affineries de cuivre. Rejets des fonderies de zinc de première et de deuxième fusion et des affineries de zinc », Environnement Canada, Ottawa, n° de catalogue En40-215/62F, 171 p.
- ERRÉCALDE, O. et P.G.C. CAMPBELL (2000). « Cadmium and zinc bioavailability to *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae) : Accidental metal uptake and toxicity in the presence of citrate », *Journal of Phycology*, vol. 36, p. 473-483.
- ERRÉCALDE, O., M. SEIDL et P.G.C. CAMPBELL (1998). « Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*: An exception to the Free-Ion Model », *Water Research*, vol. 32, p. 419-429.
- ERICKSON, R.J. *et al.* (1996). « The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 15, p. 181-193.
- FORTIN, C. et P.G.C. CAMPBELL (2001). « Thiosulfate enhances silver uptake by a green alga : Role of anion transporters in metal uptake », *Environmental Science and Technology*, vol. 35, p. 2214-2218.
- FOWLER, B.A. *et al.* (1987). « Nomenclature of metallothionein », dans J.H.R. Kägi et Y. Kojima, (édit.), *Metallothionein II*, Bâle, Birkhäuser Verlag, p. 19-22.
- GEORGE, S.G. (1983). « Heavy metal detoxification in the mussel *Mytilus edulis* – Composition of Cd-containing kidney granules (tertiary lysosomes) », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 76C, p. 53-57.
- GEORGE, S.G. et P.-E. OLSSON (1994). « Metallothioneins as indicators of trace metal pollution », dans K.J.M. Kramer (édit.), *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*, Boca Raton, FL, CRC Press, p. 151-178.
- GEORGE, S.G., K. TODD et J. WRIGHT (1996). « Regulation of metallothionein in teleosts : Induction of MTmRNA and protein by cadmium in hepatic and extrahepatic tissues of a marine flatfish, the Turbot (*Scophthalmus maximus*) », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 113C, p. 109-115.
- GIESY, J.P., A.D. NEWELL et G.J. LEVERSEE (1983). « Copper speciation in soft, acid, humic water : Effects on copper bioaccumulation by and toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Daphnidae) », *Science of the Total Environment*, vol. 28, p. 23-36.
- HABEEBU, S.S. *et al.* (2000). « Metallothionein-null mice are more sensitive than wild-type mice to liver injury induced by repeated exposure to cadmium », *Toxicological Science*, vol. 55, p. 223-232.
- HAMER, D.H. (1986). « Metallothioneins », *Annual Reviews in Biochemistry*, vol. 55, p. 913-951.

- HAMILTON, S.J. et P.M. MEHRLE (1986). « Metallothionein in fish : review of its importance in assessing stress from metal contaminants », *Transactions of the American Fisheries Society*, vol. 115, p. 596-609.
- HARRISON, G.I. et F.M.M. MOREL (1983). « Antagonism between cadmium and iron in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* », *Journal of Phycology*, vol. 19, p. 495-507.
- HIGH, K.A. *et al.* (1997). « Characterization of metallothionein-like proteins from zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 16, p. 1111-1118.
- HOGSTRAND, C. (1991). « Regulation of metallothionein in teleost fish during metal exposure », Thèse de doctorat, Dép. de zoophysiology, Université de Göteborg, Suède.
- HOWARTH, R.S. et J.B. SPRAGUE (1978). « Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH », *Water Research*, vol. 12, p. 455-462.
- HUDSON, R.J.M. (1998). « Which aqueous species control the rates of trace metal uptake by aquatic biota ? Observations and predictions of non-equilibrium effects », *Science of the Total Environment*, vol. 219, p. 95-115.
- JENKINS, K.D. et A.Z. MASON (1988). « Relationships between subcellular distributions of cadmium and perturbations in reproduction in the polychaete *Neanthes arenaceodentata* », *Aquatic Toxicology*, vol. 12, p. 229-244.
- KÄGI, J.H.R. et Y. KOJIMA (édit.) (1987). « Metallothionein II », *Proceedings of the Second International Meeting on Metallothionein and Other Low Molecular Weight Metal-binding Proteins, Zürich, August 21-24, 1985*, Bâle, Birkhäuser Verlag.
- KÄGI, J.H.R. et M. NORDBERG (édit.) (1979). « Metallothionein I », Bâle, Birkhäuser Verlag.
- KAISER, K.L.E. (1980). « Correlation and prediction of metal toxicity to aquatic biota », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 37, p. 211-218.
- KELLY, E.J. *et al.* (1996). « Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice », *Journal of Nutrition*, vol. 126, p. 1782-1790.
- KITO, H. *et al.* (1982). « Separation and purification of (Cd, Cu, Zn)-metallothionein in carp hepato-pancreas », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 73C, p. 121-127.
- KLAASSEN, C.D. (1981). « Induction of metallothionein by adrenocortical steroids », *Toxicology*, vol. 20, p. 275-279.
- KLAVERKAMP, J.F. et D.A. DUNCAN (1987). « Acclimation to cadmium toxicity by white suckers : Cadmium binding capacity and metal distribution in gill and liver cytosol », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 6, p. 275-289.
- KLAVERKAMP, J.F. *et al.* (1991). « Evaluating the effectiveness of metal pollution controls in a smelter by using metallothionein and other biochemical responses in fish », dans M.C. Newman et A.W. McIntosh (édit.), *Metal Ecotoxicology. Concepts and Applications*, Chelsea, MI, Lewis Publishers, p. 33-64.
- LACAZ-VIERA, F. (2000). « Tight junction dynamics : Oscillations and the role of protein kinase C », *Journal of Membrane Biology*, vol. 178, p. 151-161.
- LAEGREID, M. *et al.* (1983). « Seasonal variation of cadmium toxicity to the alga *Selenastrum capricornutum* Printz in two lakes with different humus content », *Environmental Science and Technology*, vol. 17, p. 357-361.
- LAFLAMME, J.-S. *et al.* (2000). « Interrenal metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu, and Zn exposure in yellow perch, *Perca flavescens*, from Abitibi lakes », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 57, p. 1692-1700.
- LIU, J. *et al.* (1999). « Metallothionein-null mice are highly susceptible to the hematotoxic and immunotoxic effects of chronic CdCl₂ exposure », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 159, p. 98-108.
- MACKAY, E.A. *et al.* (1993). « Complete amino acid sequence of five dimeric and four monomeric forms of metallothionein from the edible mussel *Mytilus edulis* », *European Journal of Biochemistry*, vol. 218, p. 183-194.

- MARGOSHES, M. et B.L. VALLEE (1957). « A cadmium protein from equine kidney cortex », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 79, p. 4813-4814.
- MARONI, G. *et al.* (1987). « Metallothionein gene duplications and metal tolerance in natural populations of *Drosophila melanogaster* », *Genetics*, vol. 117, p. 739-744.
- MASON, A.Z. et K.D. JENKINS (1995). « Metal detoxification in aquatic organisms », dans A. Tessier et D.R. Turner (édit.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, Chichester, John Wiley and Sons, p. 479-608.
- MCCARTER, J.A. et M. ROCH (1983). « Hepatic metallothionein and resistance to copper in juvenile coho salmon », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 74C, p. 133-137.
- MEADOR, J.P. (1991). « The interaction of pH, dissolved organic carbon, and total copper in the determination of ionic copper and toxicity », *Aquatic Toxicology*, vol. 19, p. 13-32.
- MEYER, J.S. *et al.* (1999). « Binding of nickel and copper to fish gills predicts toxicity when water hardness varies, but free-ion activity does not », *Environmental Science and Technology*, vol. 33, p. 913-916.
- MICALLEF, S. *et al.* (1992). « An evaluation of the HPLC-gel chromatographic method for analyzing metallothioneins in aquatic organisms », *Talanta*, vol. 39, p. 1073-1079.
- MOREL, F.M.M. (1983). *Principles and Applications of Aquatic Chemistry*, New York, J. Wiley and Sons.
- NEWMAN, M.C. et J.T. MCCLOSKEY (1996). « Predicting relative toxicity and interactions of divalent metal ions : Microtox bioluminescence assay », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 15, p. 275-281.
- NORDBERG, M. (1998). « Metallothioneins : Historical review and state of knowledge », *Talanta*, vol. 46, p. 243-254.
- ONASAKA, S. *et al.* (1987). « Induced synthesis of metallothionein by ascorbic acid in mouse liver », *Toxicology*, vol. 43, p. 251-259.
- OVERNELL, J.C. BERGER et K. WILSON (1981). « Partial amino acid sequence of metallothionein from plaice (*Pleuronectes platessa*) », *Biochemistry Society Transactions*, vol. 9, p. 217-218.
- PADRÓS, J., É. PELLETIER et C.A. DE OLIVEIRA RIBEIRO (2004). « Les interactions multiples en écotoxicologie : le cas du benzo(a)pyrène et du tributylétain chez l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*) », dans É. Pelletier, P.G.C. Campbell et F. Denizeau (édit.), *Écotoxicologie moléculaire : principes fondamentaux et perspectives de développement*, Sainte-Foy, Presses de l'Université du Québec, p. 257-299.
- PAGENKOPF, G. K. (1983). « Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes : role of complexation, pH, and water hardness », *Environmental Science and Technology*, vol. 17, p. 342-347.
- PALMITER, R.D. (1998). « The elusive function of metallothioneins », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, vol. 95, p. 8428-8430.
- PALMITER, R.D. (1994). « Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1 », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, vol. 91, p. 1219-1223.
- PARENT, L., M.R. TWISS et P.G.C. CAMPBELL (1996). « Influences of natural dissolved organic matter on the interaction of aluminum with the microalga *Chlorella* : A test of the free-ion model of trace metal toxicity », *Environmental Science and Technology*, vol. 30, p. 1713-1720.
- PHINNEY, J.T. et K.W. BRULAND (1997). « Trace metal exchange in solution by the fungicides Ziram and Maneb (dithiocarbamates) and subsequent uptake of lipophilic organic zinc, copper and lead complexes into phytoplankton cells », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 16, p. 2046-2053.
- POWELL, S.R. (2000). « The antioxidant properties of zinc », *Journal of Nutrition* (Suppl.), vol. 130, p. 1447S-1454S.

- RAUSER, W.E. (1993). « γ -glutamylcysteinyl isopeptides : Structure, synthesis and metal-binding complexes », dans K.T. Suzuki *et al.* (édit.), *Metallothionein III : Biological Roles and Medical Implications*, Bâle, Birkhäuser Verlag, p. 225-242.
- RENNER, R. (1997). « Rethinking water quality standards for metals toxicity : A better understanding of the how natural waters inhibit metal uptake may change current regulatory limits », *Environmental Science and Technology*, vol. 31, p. 466-468.
- ROESIJADI, G. (1996). « Metallothionein and its role in toxic metal regulation », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 113C, p. 117-123.
- ROESIJADI, G. (1992). « Metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals », *Aquatic Toxicology*, vol. 22, p. 81-114.
- ROESIJADI, G. et G.W. FELLINGHAM (1987). « Influence of Cu, Cd, and Zn preexposure on Hg toxicity in the mussel *Mytilus edulis* », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 44, p. 680-684.
- ROY, R.L. et P.G.C. CAMPBELL (1997). « Decreased toxicity of Al to juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) in acidic soft water containing natural organic matter : A test of the free-ion model », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 16, p. 1962-1969.
- SANTORE, R.C. *et al.* (2001). « Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *Daphnia* », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 20, p. 2397-2402.
- SANTOVINO, G., P. IRATO et E. PICCINNI (2000). « Regulation of metallothionein (MT) in *Tetrahymena* : Induction of MT-mRNA and protein by cadmium exposure », *European Journal of Protistology*, vol. 36, p. 437-442.
- SCHAMPHELAERE, K.A.C. et C. JANSSEN (2002). « A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for *Daphnia magna* : The effects of calcium, magnesium, sodium and pH », *Environmental Science and Technology*, vol. 36, p. 48-54.
- SCHLENK, D., Y.S. ZHANGH and J. NIX (1995). « Expression of hepatic metallothionein messenger RNA in feral and caged fish species correlates with muscle mercury levels », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 31, p. 282-286.
- SHEARS, M.A. et G.L. FLETCHER (1984). « Hepatic metallothionein in the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) », *Canadian Journal of Zoology*, vol. 63, p. 1602-1609.
- SIMKISS, K. et M.G. TAYLOR (1995). « Transport of metals across membranes », dans A. Tessier et D.R. Turner (édit.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, Chichester, John Wiley and Sons, p. 1-44.
- STILLMAN, M.J. (1995). « Metallothioneins », *Co-ordination Chemistry Reviews*, vol. 144, p. 461-511.
- STILLMAN, M.J., C.F. SHAW et K.T. SUZUKI (édit.) (1992). « Metallothioneins. Synthesis, structure and properties of metallothioneins, phytochelatins, and metal-thiolate complexes », New York, VCH.
- SULAIMAN, N., S. GEORGE et M.D. BURKE (1991). « Assessment of sublethal pollutant impact on flounders in an industrialized estuary using hepatic biochemical indices », *Marine Ecology Progress Series*, vol. 68, p. 207-212.
- SUNDA, W.G. (1991). « Trace metal interactions with marine phytoplankton », *Biological Oceanography*, vol. 6, p. 411-442.
- SUNDA, W.G. et P.A. GILLESPIE (1979). « The response of a marine bacterium to cupric ion and its use to estimate cupric ion activity in seawater », *Journal of Marine Research*, vol. 37, p. 761-777.
- SUNDA, W.G. et S.A. HUNTSMAN (1983). « Effect of competitive interactions between Mn and Cu on cellular Mn and growth in estuarine and oceanic species of the diatom *Thalassiosira* », *Limnology and Oceanography*, vol. 28, p. 924-934.
- SUNDA, W.G. et J.A.M. LEWIS (1978). « Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga *Monochrysis lutheri* », *Limnology and Oceanography*, vol. 23, p. 870-876.
- SUTER, G.W. (1993). *Ecological Risk Assessment*, Boca Raton, FL, Lewis Publishers, 538 p.

- SUZUKI, K.T., N. IMURA et M. KIMURA (édit.) (1993). « Metallothionein III. Biological roles and medical implications », Bâle, Birkhäuser Verlag.
- SYLVESTRE, M. *et al.* (2004). « La dépollution des POP : les nouveaux outils de la biologie moléculaire à la rescousse des biotechnologies environnementales », dans É. Pelletier, P.G.C. Campbell et F. Denizeau (édit.), *Écotoxicologie moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développement*, Sainte-Foy, Presses de l'Université du Québec, p. 109-160.
- TATARA, C. P. *et al.* (1997). « Predicting relative metal toxicity with ion characteristics : *Caenorhabditis elegans* LC50 », *Aquatic Toxicology*, vol. 39, p. 279-290.
- TEMPLETON, D.M. *et al.* (2000). « Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches », *Pure and Applied Chemistry*, vol. 72, p. 1453-1470, <www.iupac.org/publications/pac/2000/7208/7208templeton.html>.
- THOMAS, J.P., G.J. BACHOWSKI et A.W. GIROTTI (1986). « Inhibition of cell membrane lipid peroxidation by cadmium- and zinc-metallothioneins », *Biochimica Biophysica Acta*, vol. 884, p. 448-461.
- THURMAN, E.M. (1985). *Organic Geochemistry of Natural Waters*, Dordrecht, Pays-Bas, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers (Kluwer Academic Publishers Group), 497 p.
- TIPPING, E. (2002). *Cation Binding by Humic Substances*, Environmental Chemistry Series, Cambridge, Cambridge University Press, 434 p.
- TORREBLANCA, A. *et al.* (1996). « Effect of 20-hydroxyecdysone administration on zinc, copper and metallothionein levels in *Procambarus clarkia* », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 113C, p. 201-204.
- TURNER, D.R. (1995). « Problems in trace metal speciation modeling », dans A. Tessier et D.R. Turner (édit.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, Chichester, John Wiley and Sons, p. 149-203.
- UNGER, M.E. *et al.* (1991). « Primary structure of molluscan metallothionein deduced from PCR-amplified cDNA and mass spectrometry of purified proteins », *Biochimica Biophysica Acta*, vol. 1074, p. 371-377.
- VALLEE, B.L. et W. MARET (1993). « The functional potential and potential functions of metallothioneins : A personal perspective », dans K.T. Suzuki, N. Imura et M. Kimura (édit.), *Metallothionein III*, Bâle, Birkhäuser Verlag, p. 1-27.
- VIARENGO, A. (1989). « Heavy metals in marine invertebrates : mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level », *CRC Critical Reviews in Aquatic Science*, vol. 1, p. 295-317.
- VIGNEAULT, B. et P.G.C. CAMPBELL (2004). « Cadmium uptake by algae in the presence of humic substances », *Journal of Phycology* (soumis).
- VIGNEAULT, B. *et al.* (2000). « Permeability changes in model and phytoplankton membranes in the presence of aquatic humic substances », *Environmental Science and Technology*, vol. 34, p. 3907-3913.
- WALLACE, W.G. et G.R. LOPEZ (1997). « Bioavailability of biologically sequestered cadmium and the implications of metal detoxification », *Marine Ecology Progress Series*, vol. 147, p. 149-157.
- WOOD, C.M. (2001). « Toxic responses of the gill », dans D. Schlenk et W.H. Benson (édit.), *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts*, New York, Taylor and Francis, p. 1-89.
- WOOD, J.M. (1976). « Les métaux toxiques dans l'environnement », *La Recherche*, vol. 70, p. 711-719.
- WRIGHT, J. *et al.* (2000). « Levels of cellular glutathione and metallothionein affect the toxicity of oxidative stressors in an established carp cell line », *Marine Environmental Research*, vol. 50, p. 503-508.
- WRIGHT, D.A. et P.M. WELBOURN (2002). « Environmental Toxicology », Cambridge, Cambridge University Press, 656 p.

LA MÉTALLOTHIONÉINE

Un biomarqueur d'exposition au cadmium pour les invertébrés d'eau douce

BERNADETTE PINEL-ALLOUL

*GRIL, Département des sciences biologiques,
Université de Montréal*

OLIVIER PERCEVAL

*GRIL, Département des sciences biologiques,
Université de Montréal*

ANIK GIGUÈRE

*Université du Québec,
INRS Eau, Terre et Environnement*

YVES COUILLARD

*Environnement Canada,
Division de l'évaluation des produits chimiques*

PETER G.C. CAMPBELL

*Université du Québec,
INRS Eau, Terre et Environnement*

LANDIS HARE

*Université du Québec,
INRS Eau, Terre et Environnement*

RÉSUMÉ

Cette étude a été conçue pour évaluer les effets du cadmium sur le bivalve d'eau douce *Pyganodon grandis*, choisi comme espèce sentinelle. On cherchait à établir des relations de type exposition → bioaccumulation → effets chez des bivalves exposés au Cd dans leur milieu naturel. Des spécimens du bivalve furent récoltés dans une dizaine de lacs de la région de Rouyn-Noranda, au Québec. Ces lacs ont été choisis de façon à maximiser le gradient de contamination en Cd, tout en minimisant la variation des facteurs écologiques pouvant avoir un effet confondant sur les réponses des bivalves indigènes au gradient de contamination. La concentration en Cd^{2+} libre, calculée à partir des équilibres sédiments-eaux, a été utilisée pour évaluer l'exposition au Cd ($[\text{Cd}^{2+}]$: 0,005-0,96 nM). La métallothionéine a été mesurée dans les branchies des bivalves ($[\text{MT}]$: 18-340 nmol-sites- g^{-1} p. sec), et la répartition subcellulaire du Cd entre différentes fractions cytosoliques a été évaluée par chromatographie d'exclusion sur gel (HPM = ligands cytosoliques de poids moléculaire élevé, > 18 kDa; FPM = ligands cytosoliques de poids moléculaire faible, < 1,8 kDa; MT = métallothionéine). Divers autres biomarqueurs ont été mesurés au niveau cellulaire : la concentration en malondialdéhyde (MDA) dans les branchies et dans la glande digestive; l'activité des enzymes glutathion-peroxydase et glutathion-réductase dans la glande digestive; contenu en lipides des gonades. D'autre part, l'état de santé des populations de *P. grandis* a été diagnostiqué sur la base des variables de dynamique des populations, soit la densité et la biomasse dans la zone littorale des lacs, les paramètres de croissance (K : taux de croissance instantanée; ∞ : longeur asymptotique théorique), la production annuelle, le ratio de la production à la biomasse (ratio P/B), le temps de renouvellement de la population (inverse du ratio P/B) et la fécondité cumulée.

Les concentrations en Cd et en MT dans le cytosol des branchies augmentaient en fonction du gradient de contamination en Cd^{2+} . Malgré cette augmentation, la distribution du Cd entre les différents complexes cytosoliques demeurait relativement constante : 80 % dans la fraction Cd-MT, 7 % dans la fraction Cd-FPM et 13 % dans la fraction Cd-HPM. Pour ces organismes exposés au Cd de manière chronique, il n'y avait donc pas de « seuil » d'exposition à partir duquel la distribution du Cd commençait à être perturbée. Cependant, la présence du Cd dans les fractions Cd-FPM et Cd-HPM suggère que sa détoxification était imparfaite, c'est-à-dire que *P. grandis* a été soumis à un stress causé par le Cd même à des concentrations externes en Cd relativement modestes.

D'autre part, notre étude a permis de relier l'accumulation de Cd dans le cytosol des branchies des bivalves à un stress oxydant au niveau des membranes cellulaires, manifesté par la production de malondialdéhyde, un indicateur de peroxydation lipidique des membranes cellulaires, sans toutefois démontrer un lien direct avec la production de MT ou des formes de Cd liées aux ligands intracellulaires. Elle montre aussi un lien apparent entre le mauvais état de santé des populations de bivalves dans les lacs les plus contaminés et la contamination en Cd^{2+} dans le milieu, et l'augmentation de Cd lié aux ligands de haut poids moléculaire (Cd-HPM). Ceci pourrait indiquer que la répartition du Cd entre les ligands intracellulaires offre un potentiel de diagnostic des effets néfastes au niveau des populations. Il semble cependant difficile dans le cadre de cette étude de cas d'assigner à la MT ou à d'autres biomarqueurs potentiels (Cd-HPM, Cd-FPM), un rôle prédictif d'effets écotoxicologiques sur l'état des populations de bivalves, à cause des effets confondants des facteurs écologiques sur les réponses des populations. Néanmoins, cette étude de cas fournit un cadre écotoxicologique intégré pour l'application de biomarqueurs et/ou d'approches diagnostiques à la problématique de contamination par les métaux traces en région minière.

1. INTRODUCTION

1.1. CONTAMINATION MÉTALLIQUE DANS LES ÉCOSYSTÈMES AQUATIQUES

Les apports et les flux de plusieurs métaux traces dans les écosystèmes aquatiques ont fortement augmenté notamment à cause de l'expansion des activités minières et métallurgiques (Pacyna et Pacyna, 2001). Parmi les quatre métaux traces d'intérêt prioritaire (Cd, Cu, Pb, Zn) autres que les organométaux (p. ex., méthyl-Hg), le cadmium est un métal non essentiel qui présente un grand intérêt pour l'application de biomarqueurs à cause de l'importance de ses sources anthropiques et de sa toxicité pour les humains et les organismes terrestres et aquatiques (Campbell *et al.*, 1985; Yeats et Bewers, 1987; Environnement Canada et Santé Canada, 1994; Malley, 1996; Campbell et Couillard, 2004, chapitre 1 du présent volume).

Au niveau mondial, les émissions anthropiques de cadmium dans l'atmosphère excèdent de 3 à 10 fois les émissions naturelles (Yeats et Bewers, 1987; Nriagu et Pacyna, 1988). Ainsi, les apports industriels de Cd en provenance de la métallurgie des métaux non ferreux et de l'usage des combustibles fossiles varient de 3 100 à 12 000 t·an⁻¹ tandis que les apports naturels dus aux feux de forêt et au volcanisme sont estimés à 1 300 t·an⁻¹ (Nriagu et Pacyna, 1988; Garrett, 2000). Au Canada, les sources anthropiques de Cd se chiffrent à 160 t·an⁻¹ et proviennent de la fonte et du raffinage des métaux, de l'utilisation des combustibles fossiles pour l'énergie et de l'incinération des déchets solides (Environnement Canada et Santé Canada, 1994). S'ajoutent à ces contributions des apports diffus de cadmium liés aux retombées atmosphériques et aux précipitations acides, qui entraînent sa mise en circulation à partir du milieu terrestre (Tessier *et al.*, 1994). La contamination en Cd des eaux en Ontario et au Québec résulte de la mobilisation accrue du Cd par ces activités industrielles; les concentrations en surface varient de < 20 pM (< 2 ng·L⁻¹) dans les milieux non pollués jusqu'à des maximums de 5 à 40 nM (600 à 4 800 ng·L⁻¹) dans des secteurs très pollués comme la région minière de Sudbury (Stephenson et Mackie, 1988; Malley, 1996). Le devenir du cadmium dans les écosystèmes aquatiques dépend de nombreux processus physiques, chimiques et biologiques complexes (Tessier, 1992; Tessier et Turner, 1995; Chapman *et al.*, 1998), mais finalement, le cadmium introduit dans l'environnement aquatique se retrouve en grande partie associé aux sédiments de fond (p. ex., 93 % des ajouts expérimentaux faits dans un lac du Bouclier canadien se retrouvent dans les sédiments – voir Lawrence *et al.*, 1996) où il devient une menace potentielle pour les invertébrés benthiques.

Aux termes de la Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999) (LCPE 1999), le cadmium (Cd) est inscrit à la Liste des substances d'intérêt prioritaire. Sa toxicité pour l'homme et les animaux de laboratoire

est bien connue (Environnement Canada et Santé Canada, 1994). En eau douce, on a de bonnes estimations des concentrations de Cd dans l'eau, les sédiments et certains invertébrés tels que les bivalves et les larves d'insectes (Malley *et al.*, 1993; Couillard *et al.*, 1993; Hare, 1992; Hare et Tessier, 1996, 1998; Andrès *et al.*, 1999; Croteau *et al.*, 2002). Cependant, on connaît encore très mal sa toxicité chronique *in situ*, la majorité des études toxicologiques ayant été réalisées en laboratoire. Traditionnellement, la toxicité des métaux traces pour les organismes aquatiques a été évaluée par des tests de toxicité en laboratoire et, dans une moindre mesure, par des observations *in situ* des populations indigènes exposées. La capacité des tests de toxicité à prédire, seuls, les effets des métaux toxiques sur des populations en milieu naturel a souvent été remise en cause (Kimball et Levin, 1985; Cairns et McCormick, 1992; Luoma, 1995), le contexte expérimental en laboratoire étant souvent très éloigné des conditions réelles d'exposition des populations en milieu naturel. D'un autre côté, les études sur la bioaccumulation et la toxicité des métaux en milieu naturel sont difficiles à interpréter à cause des effets confondants de nombreuses variables géochimiques, physiologiques et écologiques qui influencent la biodisponibilité des métaux et leurs effets toxiques potentiels sur les invertébrés aquatiques (Langston et Spence, 1995). Une approche alternative et complémentaire impliquant l'utilisation des indicateurs biochimiques ou « biomarqueurs », tels que la métallothionéine, pour évaluer l'exposition et la toxicité des métaux, a été développée pour les organismes dulcicoles et marins (Klaverkamp *et al.*, 1991; Lagadic *et al.*, 1994, 1997a, 1997b; Ringwood *et al.*, 1999; Cajaraville *et al.*, 2000; Cosson et Amiard, 2000). Au Canada, le programme d'évaluation des techniques de mesures d'impacts en milieu aquatique (AETE) préconise aussi l'utilisation de biomarqueurs (la métallothionéine conjointement avec d'autres outils) dans le cadre spécifique de la surveillance des effets des effluents miniers (Couillard, 1997). Par ailleurs, le nouveau règlement canadien sur les effluents des mines de métaux rend obligatoire une étude de suivi des effets sur l'environnement (ESEE) pour les exploitations actives. Le document-guide de l'ESEE mentionne la métallothionéine comme un des outils ou biomarqueurs pouvant être utilisés à divers étapes du suivi environnemental tout en indiquant que l'emploi des biomarqueurs pour prédire des effets toxiques n'a pas encore franchi l'étape de validation expérimentale sur le terrain (Environnement Canada, 2002).

1.2. CONCEPT DE BIOMARQUEUR

Le concept de biomarqueur se définit comme une réponse au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportementale d'un organisme suite à l'exposition présente ou passée à un polluant (Lagadic *et al.*, 1997a). Au niveau de l'organisme, la réponse moléculaire,

biochimique ou physiologique peut se mesurer dans l'individu lui-même au niveau de ses cellules, organes (foie, rein, branchies, etc.) ou phanères (griffes, poils, plumes, etc.) (Huggett *et al.*, 1992; van Gestel et van Brummelen, 1996). Toutefois, un biomarqueur mesuré au niveau individuel ne trouve sa signification écotoxicologique que s'il permet aussi d'expliquer et de prédire les effets toxiques des polluants à d'autres niveaux de l'organisation biologique, depuis l'individu jusqu'aux populations et communautés (Lagadic *et al.*, 1997a).

Dans le contexte d'une pollution métallique, les effets biologiques des métaux toxiques présents dans l'environnement sont provoqués par l'interaction du métal avec un récepteur biologique à la surface ou à l'intérieur de l'organisme vivant (voir Campbell et Couillard, 2004, chapitre 1). On suppose que les concentrations de métaux requises pour déclencher ces réponses sont bien inférieures à celles qui provoquent une crise dans l'organisme cible ou une dégradation visible de l'écosystème. Ainsi, idéalement, la détection et la quantification des réponses moléculaires, biochimiques ou physiologiques à l'intérieur de l'organisme vis-à-vis une exposition chronique à des métaux pourraient servir d'indicateur précoce, sensible et spécifique d'un stress environnemental (CNRC, 1985). Qu'ils interviennent dans le maintien de l'homéostasie ou qu'ils traduisent des perturbations fonctionnelles, la possibilité d'utiliser les biomarqueurs comme marqueurs précoces de dysfonctionnement ultérieur au niveau des populations et des communautés apparaît comme une approche particulièrement attrayante (van Gestel et van Brummelen, 1996; Lagadic *et al.*, 1997a; Schlenk, 1999). Cependant, dans l'état actuel des connaissances, les biomarqueurs ne sont généralement considérés que comme des indicateurs de la présence (actuelle ou passée) de polluants dans le milieu et dans les organismes, leur validation pour la prédiction d'effets toxiques sur les organismes et les populations n'étant jusqu'à maintenant pas encore clairement établie (Lagadic *et al.*, 1994; Depledge et Fossi, 1994; Couillard, 1997; Adams *et al.*, 2001).

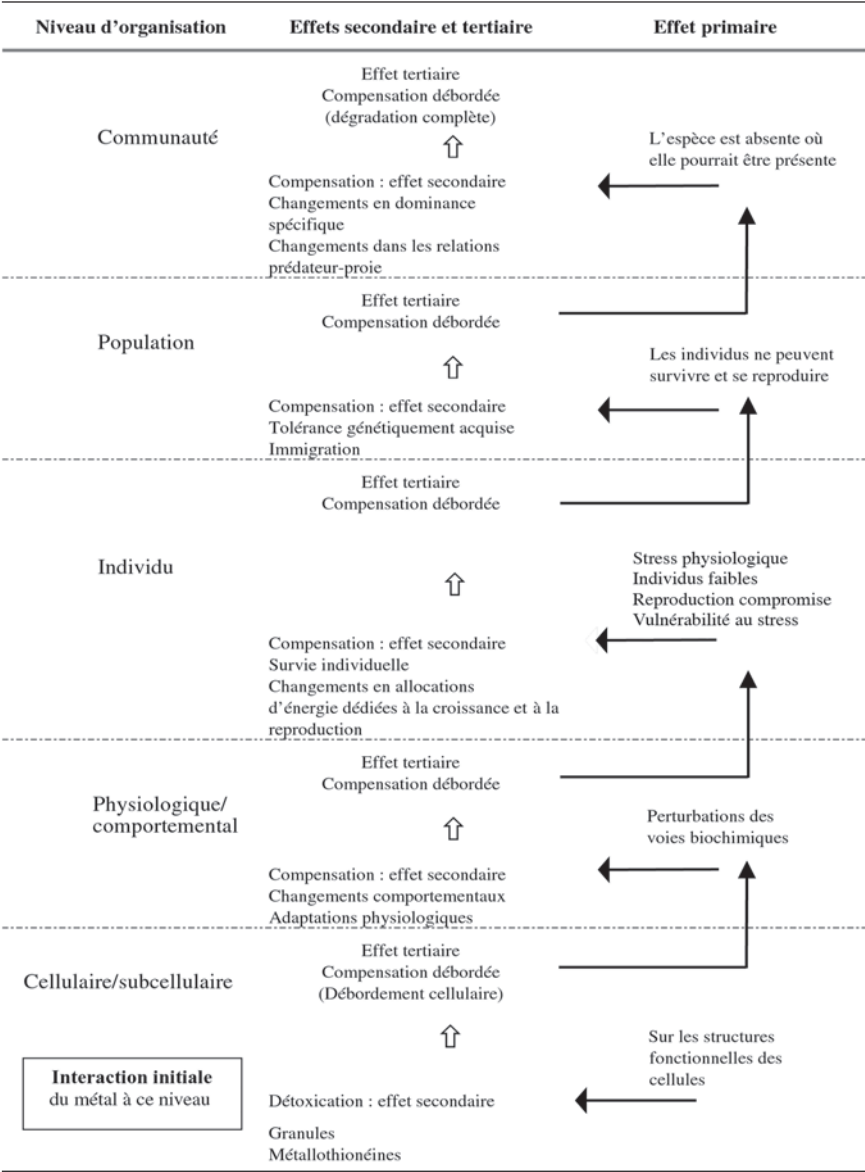
1.3. DÉMARCHE ÉCOTOXICOLOGIQUE HOLISTIQUE ET HIÉRARCHIQUE

Seule une approche « multiparamétrique » et « hiérarchique », comprenant des mesures des métaux toxiques dans le milieu et les organismes, l'utilisation d'un ou plusieurs biomarqueurs et la détection d'effets toxiques à différents niveaux de l'organisation biologique (cellule, individu, population, communauté), devrait permettre de fournir une image suffisamment réaliste des effets toxiques des métaux sur l'état de santé des organismes, des populations et des écosystèmes (Clements et Kiffney, 1994; van Gestel et van Brummelen, 1996; Lagadic *et al.*, 1997b; Adams *et al.*, 2001). Dans cette perspective, de nombreux auteurs insistent sur la

nécessité de relier les réponses biochimiques ou physiologiques à l'intérieur des organismes à la fois à des mesures réelles d'exposition aux polluants et à des mesures de leur toxicité à des niveaux élevés de l'organisation biologique (population, communauté : Depledge et Fossi, 1994 ; Engel et Vaughan, 1996 ; McCarty et Munkittrick, 1996 ; den Besten, 1998).

Dans le cadre d'une contamination par des métaux toxiques, le concept de biomarqueur s'intègre à une approche holistique et hiérarchique selon laquelle la toxicité d'un métal peut se traduire par un continuum complexe de réponses biochimiques et physiologiques chez les organismes entraînant des réponses écotoxicologiques chez les populations et les communautés (Luoma, 1995 ; Munkittrick et McCarty, 1995). La figure 2.1 schématise ce continuum de réponses aux différents niveaux d'organisation biologique, depuis la cellule jusqu'aux populations et communautés des écosystèmes. On suppose qu'un individu sain soumis à des concentrations croissantes de métaux toxiques verra son état de santé se détériorer progressivement. Ainsi, pour des doses de métaux toxiques peu élevées et/ou des temps d'exposition assez courts, l'effet primaire initial du métal sur les fonctions cellulaires induira des mécanismes de détoxification au niveau subcellulaire, considérés comme des effets secondaires (production de métallothionéines, granules/lysosomes). Ces mécanismes permettront de compenser l'action des métaux, notamment en limitant leur toxicité. Quand les doses internes et/ou les temps d'exposition augmentent, ces mécanismes de détoxification deviennent insuffisants pour limiter l'action des métaux toxiques. Il y a alors un phénomène de débordement cellulaire et les métaux accumulés dans le cytosol, sous forme dissoute non liée à la métallothionéine et non stockée dans les granules, auront des effets tertiaires potentiellement toxiques (pour le modèle de débordement cellulaire, voir section 2.3.3. dans Campbell et Couillard, 2004 (chapitre 1); Couillard *et al.*, 1995b ; Baudrimont *et al.*, 1999). L'état de santé des individus exposés évolue alors vers une dégradation irréversible des fonctions physiologiques de l'organisme, ce qui pourrait se traduire par des effets délétères au niveau des individus, puis des populations et des communautés. Chaque niveau de l'organisation biologique comprend une étape de détoxification/compensation de nature comportementale et/ou physiologique chez les organismes, de nature génétique ou écologique chez les populations et communautés. Les effets délétères se produiraient si les mécanismes de compensation sont débordés ou que les processus de détoxification/compensation entraînent des coûts bioénergétiques secondaires trop élevés, limitant la croissance et la reproduction des organismes. Ces réponses toxicologiques à des niveaux élevés de l'organisation biologique peuvent avoir des conséquences importantes sur la survie des populations au sein des communautés.

Figure 2.1
Effet de l'introduction d'un métal toxique dans l'environnement*



* Approche hiérarchique et illustration des relations entre l'introduction d'un métal toxique dans un écosystème et la détection et la quantification des effets à différents niveaux hiérarchiques de l'organisation des populations d'organismes aquatiques. À chaque niveau d'organisation, le métal génère une réponse en trois stades : primaire, secondaire ou détoxification/compensation, et tertiaire (adapté de Luoma 1995 et de CNRC 1985).

La mesure des effets toxicologiques au niveau des populations et des communautés revêt donc une grande pertinence écologique pour prédire à long terme l'impact des métaux toxiques sur l'état de santé des écosystèmes (Engel et Vaughan, 1996; Lagadic *et al.*, 1997a; Ringwood *et al.*, 1999). Toutefois, une réponse à un niveau dans l'organisation biologique n'est pas forcément suivie d'une réponse au niveau supérieur, si les mécanismes de compensation ne sont pas débordés ou si le niveau d'exposition aux métaux toxiques est limité par certains facteurs environnementaux. Ainsi, au fur et à mesure que l'on progresse au sein de l'organisation biologique, il devient de plus en plus difficile de mettre en évidence des relations de cause à effet entre la présence des métaux et les réponses des populations (Luoma, 1995; Engel et Vaughan, 1996; Ringwood *et al.*, 1999). En effet, la réponse des organismes et des populations aux métaux toxiques est influencée par d'autres facteurs écologiques tels que la chimie des eaux, le régime thermique, le niveau d'oxygénation et l'abondance des ressources et des prédateurs. Ces facteurs peuvent confondre l'interprétation des réponses toxicologiques des organismes et des populations en présence de métaux toxiques.

L'idée de comparer les effets toxiques des polluants en interaction avec les autres facteurs écologiques est encore très rarement abordée en écotoxicologie (Munkittrick et McCarty, 1995). Il s'agit pourtant d'une avenue de recherche cruciale et incontournable dans l'optique de caractériser et de valider des biomarqueurs utiles pour l'évaluation des effets des polluants en milieu naturel au niveau des populations et des communautés. Récemment, Chapman (2002) recommandait une meilleure intégration des études écologiques et toxicologiques afin de mieux définir les risques écotoxicologiques de la présence des contaminants dans les milieux naturels.

2. LA MÉTALLOTHIONÉINE COMME BIOMARQUEUR D'EXPOSITION ET DE TOXICITÉ

2.1. APPROCHE ÉCOTOXICOLOGIQUE INTÉGRÉE

Des études écotoxicologiques récentes s'inscrivant dans une démarche « multiparamétrique » et « hiérarchique », telle que définie précédemment, ont permis d'évaluer l'utilisation de la métallothionéine (MT) comme biomarqueur d'exposition au cadmium (Cd) et d'effets toxiques, chez des invertébrés aquatiques de lacs d'une région minière du Québec (Abitibi) (Couillard *et al.*, 1993, 1995a, 1995b, 2003; Tessier *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1999; Croteau *et al.*, 2002; Perceval *et al.*, 2002, 2003; Giguère *et al.*, 2003). Tel que recommandé par Adams *et al.* (2001) et Chapman (2002), les effets

confondants des facteurs écologiques sur les réponses toxicologiques des organismes ont été minimisés et pris en considération dans ces études (Perceval *et al.*, 2002 ; Couillard *et al.*, 2003).

Les bivalves sont considérés comme de bons bioindicateurs de la contamination métallique en eau douce (Malley *et al.*, 1993 ; Metcalfe-Smith, 1994). Le bivalve d'eau douce *Pyganodon grandis* (Say, 1829), choisi comme espèce sentinelle dans le cadre de notre étude en région minière, est largement répandu en Amérique du Nord, à travers tout le bassin intérieur canadien et les États-Unis (Clarke, 1981). Ce bivalve est commun dans la zone littorale des lacs et parfois plus rare en rivière ; il tolère des eaux relativement peu productives et faiblement alcalines (Huebner *et al.*, 1990). Chez *P. grandis*, les sexes sont généralement séparés (avec certains cas d'hermaphrodisme) et la maturité sexuelle est atteinte vers l'âge de 4 à 5 ans (Hanson *et al.*, 1989). La fertilisation et le développement des larves ont lieu assez tôt au cours de l'été (Huebner, 1980). Au nord de l'aire de distribution (Nord du Québec), les larves sont conservées dans les marsupiums branchiaux maternels durant tout l'hiver et relâchées au printemps suivant (Lewis, 1985). Le cycle de développement larvaire passe par un stade parasitaire obligatoire sur les branchies des poissons. *P. grandis* est considéré comme un parasite généraliste, ayant plus d'une vingtaine d'espèces différentes de poissons comme hôtes potentiels (Watters, 1994). Les prédateurs connus sont le rat musqué (*Ondatra zibethicus*), la loutre (*Lutra canadensis*), le vison (*Mustela vison*) et certains poissons (Tyrrell et Hornbach, 1998).

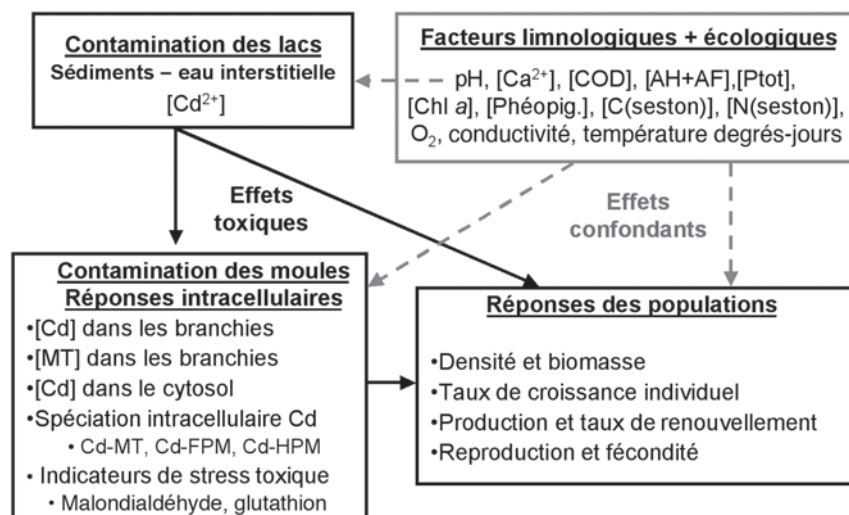
L'approche écotoxicologique intégrée appliquée pour l'espèce sentinelle *Pyganodon grandis* (Bivalvia, Unionacea), est schématisée dans la figure 2.2. Elle comprend les étapes suivantes :

- l'évaluation de la biodisponibilité du cadmium *in situ* dans la colonne d'eau immédiatement au dessus des sédiments à partir des équilibres de sorption sédiments-eau (Tessier *et al.*, 1993) et selon le Modèle du ligand biotique (Campbell, 1995 ; Di Toro *et al.*, 2001), en tenant compte de l'exposition à l'ion métallique $[Cd^{2+}]$ et de l'influence de facteurs limnologiques tels que le pH, le calcium dissous $[Ca^{2+}]$, le carbone organique dissous [COD] et les acides humiques et fulviques [AH+AF] sur la biodisponibilité du cadmium ;
- la mesure de la contamination des bivalves basée sur la concentration de cadmium dans les branchies et la production de métallothionéine [MT] au niveau subcellulaire (cytosol des branchies) ;
- la mesure de la spéciation intracellulaire du cadmium et de sa répartition entre les différents ligands cytosoliques (Cd-MT : Cd lié aux protéines s'apparentant aux métallothionéines, Cd-FPM : Cd lié aux

ligands de faible poids moléculaire, Cd-HPM : Cd lié aux ligands de haut poids moléculaire) afin de tester le modèle de « débordement cellulaire » ou de « cytotoxicité » ;

Figure 2.2

Approche écotoxicologique intégrée*



* Schéma de la démarche écotoxicologique suivie dans le cadre des études de cas sur la validation de la MT comme biomarqueur d'exposition et de toxicité du cadmium chez la moule *Pyganodon grandis*.

- la détermination des relations dose-réponse entre le niveau d'exposition au cadmium [Cd²⁺] dans le milieu, l'accumulation de [Cd] et la biosynthèse (nette) de la [MT] dans l'organisme, afin de valider la MT comme biomarqueur d'exposition au cadmium ;
- la mesure des effets toxiques du cadmium à différents niveaux de l'organisation biologique depuis les réponses biochimiques au niveau intracellulaire (malondialdéhyde, molécules impliquées dans la réponse à un stress oxydant : glutathion-réductase et glutathion-peroxydase) jusqu'aux réponses des populations (densité, biomasse, paramètres de croissance, production annuelle, ratio P/B, fécondité cumulée) ;

- la détermination des relations dose-réponse entre les réponses toxiques intracellulaires (malondialdéhyde, glutathion-réductase et glutathion-peroxydase) et les concentrations de [Cd] et [MT] dans le cytosol des branchies des bivalves, afin de tester la MT comme biomarqueur d'effets toxiques précoces au niveau cellulaire ;
- la détermination des relations entre les réponses des populations et les concentrations de Cd et MT dans les branchies, en tenant compte de la spéciation intracellulaire du Cd, afin de tester le modèle de cytotoxicité cellulaire (« débordement cellulaire », voir la section 2.3.3 de Campbell et Couillard, 2004, chapitre 1) et d'évaluer l'utilisation de la MT comme biomarqueur d'effets toxiques du cadmium à un niveau élevé de l'organisation biologique (population) ;
- la détermination d'effets potentiellement confondants des facteurs limnologiques et écologiques sur les réponses des organismes et des populations.

Cette démarche prend en compte les derniers développements des méthodes d'évaluation du risque écotoxicologique (Chapman, 2002). Elle vise à déterminer *in situ* à des niveaux réels d'exposition **a)** les relations entre la contamination du milieu et de l'organisme et l'induction du biomarqueur (MT), et **b)** les relations entre les concentrations de cadmium et du biomarqueur MT au niveau subcellulaire et les réponses toxicologiques chez les organismes ainsi qu'au niveau des populations, tout en tenant compte des effets des facteurs confondants dans l'environnement naturel. Une telle démarche est essentielle pour :

- déterminer le seuil critique de contamination en cadmium dans le milieu au-dessous duquel il n'y aura pas d'effets délétères sur les individus et les populations dans les milieux récepteurs ;
- évaluer l'utilisation de la MT comme biomarqueur d'exposition et d'effets toxiques des métaux chez les invertébrés benthiques ;
- établir de nouveaux outils et de nouvelles normes mieux adaptés à la réalité écotoxicologique du milieu récepteur et des organismes exposés aux rejets miniers.

L'étude de cas qui est décrite dans ce chapitre vise à développer un modèle écotoxicologique et des perspectives d'application pour le suivi des impacts des activités minières en milieu naturel. Elle se base en particulier sur les réponses toxicologiques au niveau des individus et des populations du bivalve d'eau douce *Pyganodon grandis*. Les résultats obtenus avec d'autres espèces sentinelles (larves d'insectes aquatiques et poissons) dans la même région d'étude ou ailleurs ne seront rapportés qu'à titre comparatif.

2.2. RAPPEL DU RÔLE DE LA MT COMME BIOMARQUEUR D'EXPOSITION AU CADMIUM

Plusieurs études sur la bioaccumulation du cadmium et l'induction de la MT chez les invertébrés aquatiques ont mis en évidence le rôle de la métallothionéine (MT) comme biomarqueur de l'exposition au cadmium en milieu naturel. Nos études dans la région minière de Rouyn-Noranda (Québec) (tableau 2.1) démontrent :

- l'existence de relations dose-réponse ($r = 0,50-0,94$) entre les concentrations de MT dans le bivalve *Pyganodon grandis* ou dans les larves du diptère *Chaoborus* spp., et le niveau de contamination du milieu en cadmium (Cd^{2+}), tel qu'estimé à partir d'un modèle géochimique basé sur les équilibres de sorption sédiments-eau (Tessier, 1992 ; Tessier *et al.*, 1993) ;
- l'existence de relations dose-réponse ($r = 0,68-0,96$) entre les concentrations de MT dans le bivalve *Pyganodon grandis* ou les larves du diptère *Chaoborus* spp. et de l'éphémère *Hexagenia limbata*, et la quantité de Cd bioaccumulée dans l'organisme ;
- une faible variation des concentrations de MT dans les branchies de *Pyganodon grandis* durant la saison estivale, ainsi qu'en fonction de la taille, de l'âge et de l'indice de condition des organismes, relativement à celles enregistrées le long du gradient environnemental en Cd (Couillard *et al.*, 1995a ; Kalhok et Cyr, 1997 ; Wang *et al.*, 1999).

Le premier et le deuxième points démontrent que la MT est un biomarqueur d'exposition qui répond de façon dose-dépendante aux variations des concentrations de cadmium dans le milieu environnant et dans les organismes. Par ailleurs, ces études montrent que la MT ne répond pas aux gradients de contamination en métaux essentiels (Cu et Zn), puisque ces métaux sont l'objet d'une régulation plus étroite par les organismes (voir chapitre 1). Le troisième point suggère que les facteurs endogènes et saisonniers sont des sources de variation moins importantes que la biodisponibilité du métal en ce qui concerne la biosynthèse de MT, renforçant ainsi son rôle de biomarqueur d'exposition aux métaux non essentiels comme le cadmium.

Le rôle de la MT comme biomarqueur d'exposition au Cd a aussi été clairement démontré lors d'études de transplantation (d'un site non pollué à un site pollué) pour les bivalves d'eau douce *Pyganodon grandis* dans les lacs de la même région (Couillard *et al.*, 1995a, 1995b) et *Corbicula fluminea* dans la rivière Lot (France) (Baudrimont *et al.*, 1999), et également pour les bivalves marins (*Crassostrea giga*, *Macoma balthica*) (Amiart-Triquet *et al.*, 1998 ; Mouneyrac *et al.*, 2000). Des études en laboratoire avec des bivalves (*Mytilus galloprovincialis*, *Ruditapes decussatus*) et des gastéropodes (*Littorina littorea*) marins le montrent également (Bebianno et

Tableau 2.1

Relations entre la MT chez différentes espèces d'invertébrés et le niveau de cadmium dans le milieu (Cd²⁺) et dans les organismes (Cd dans le corps entier ou les branchies)*

Organismes	Relations	r	Concentrations	Références
Moules <i>Pygmodon grandis</i> 11 lacs 1989	MT branchies - Cd ²⁺ MT org. - Cd ²⁺ MT org. - Cd branchies MT org. - Cd org.	0,79 0,75 0,77 0,83	[Cd ²⁺] : 0,8-2,8 (nM) [Cd] branchies : 260-2400 (nmol/g. ps.) [Cd] org. : 170-1150 (nmol/g. ps.) [MT] branchies : 100-408 (nmol sites de liaison du Hg/g. ps.) [MT] org. : 163-414 (nmol sites de liaison du Hg/g. ps.)	Couillard <i>et al.</i> , 1993
<i>Pygmodon grandis</i> 2 lacs, expérience de transplantation	MT org. - Cd org.	0,82	[Cd ²⁺] : 0,28-2,2 (nM) [Cd] org. : 178-1560 (nmol/g. ms) [MT] org. : 154-596 (nmol sites de liaison du Hg/g. ps.)	Couillard <i>et al.</i> , 1995a
<i>Pygmodon grandis</i> 10 lacs 1994	MT branchies - Cd ²⁺ MT branchies - Cd cytosol	0,94 0,96	[Cd ²⁺] : 0,17-2,2 (nM) [Cd] cytosol : 34-189 (nmol/g. ms) [MT]branchies : 92-271 (nmol sites de liaison du Hg/g. ps.)	Wang <i>et al.</i> , 1999
<i>Pygmodon grandis</i> 24 lacs (37 stations) 1997	MT branchies - Cd ²⁺ MT branchies - Cd branchies	0,52 0,83	[Cd ²⁺] : 0,005-0,97 (nM) [Cd] branchies : 19-2370 (nmol/g. ms) [MT]branchies : 18-344 (nmol sites de liaison du Hg/g. ps.)	Couillard <i>et al.</i> , 2003
<i>Pygmodon grandis</i> 10 lacs (18 stations) 1998	MT branchies - Cd ²⁺ MT branchies - Cd cytosol	0,50 0,78	[Cd ²⁺] : 0,003-0,927 (nM) [Cd] cytosol : 18-168 (nmol/g. ms) [MT]branchies : 39-254 (nmol sites de liaison du Hg/g. ps.)	Giguère <i>et al.</i> , 2003
Larves d'éphémères <i>Hexagenia limbata</i> 1989-1994	MT org. - Cd org.	0,86	[Cd ²⁺] : 0,12-2,23 (nM) [Cd] org. : 41-504 (nmol/g. ms) [MT] org. : 18-106 (nmol sites de liaison du Hg/g. ps.)	Couillard <i>et al.</i> , 2003
Larves de diptères <i>Chaoborus</i> spp. 1999	MT org. - Cd ²⁺ MT org. - Cd org.	0,89 0,68	[Cd ²⁺] : 0,03-8,7 (nM) [Cd]org. : 4,3-141 (nmol/g) [MT]org. : 100-270 (nmol sites de liaison du Hg/g. ps.)	Crôteau <i>et al.</i> , 2002

* Démonstration de l'utilisation de la métallothionéine (MT) comme biomarqueur d'exposition au cadmium (Cd) chez les invertébrés d'eau douce (r de Pearson, P < 0,01).

Langston, 1995; Bebianno et Serafim, 1998). L'induction de la MT est spécifique à chaque organe (branchies, reins, glande digestive), mais la réponse de la MT au gradient de contamination en Cd est plus nette dans les branchies. Cet organe semble donc le plus approprié pour le dosage de la MT chez les bivalves d'eau douce ou marins (Langston *et al.*, 1998; Gagné *et al.*, 2002).

Les études réalisées en milieu naturel avec des poissons comme espèce sentinelle soutiennent aussi l'utilisation de la MT comme biomarqueur d'exposition aux métaux traces. Ainsi les concentrations de MT dans le foie et le tissu interénal des perchaudes de la région minière de Rouyn-Noranda sont reliées au gradient de contamination polymétallique en Zn, Cu et Cd (Laflamme *et al.*, 2000). Olsvik *et al.* (2001) ont également validé l'utilisation de la MT dans le foie et les reins de la truite brune (*Salmo trutta*) comme biomarqueur d'exposition aux métaux dans des rivières contaminées par le Cd, le Zn et le Cu.

2.3. ÉTUDE DE CAS : CARACTÉRISATION LIMNOLOGIQUE ET TOXICOLOGIQUE

L'étude de cas présentée dans le cadre de ce chapitre a été réalisée de 1996 à 1999 dans la région minière de Rouyn-Noranda (Abitibi, Québec : 48°15'N, 79°00'W), située à 600 km au nord-ouest de Montréal. L'existence dans la région de Rouyn-Noranda d'un gradient spatial de contamination atmosphérique par les métaux traces (Cd, Cu, Zn, Pb) selon la direction des vents dominants, ainsi que la présence, le long de ce gradient, de populations du bivalve *Pyganodon grandis* ont conditionné ce choix (Couillard *et al.*, 1993). Dans cette région, la contamination des lacs par les métaux est liée à l'activité minière, en particulier la présence d'une importante fonderie de cuivre à Rouyn-Noranda et l'existence de parcs à résidus miniers, ainsi qu'aux émissions atmosphériques des industries de transformation du minerai.

En 1997, une étude exhaustive des variables limnologiques et toxicologiques dans 20 lacs (37 stations) de la région (Perceval *et al.*, 2002) a permis de caractériser :

- le gradient de contamination en cadmium dans les sédiments lacustres ($[Cd^{2+}]$: 0,005-0,96 nM) et dans les branchies des bivalves ($[Cd]$: 19-2 400 nmol·g⁻¹p. sec) ;
- la concentration de métallothionéine à l'état stationnaire dans les branchies des bivalves ($[MT]$: 18-340 nmol-sites de liaison du Hg·g⁻¹p. sec) selon le gradient de contamination en Cd dans le milieu et chez les organismes ;

- la variabilité inter-lac des facteurs limnologiques tels que la transparence de l'eau (Secchi), la température, l'oxygénation (O₂), la chimie de l'eau (pH, conductivité, calcium, phosphore total, carbone organique dissous, acides humiques et fulviques), et l'abondance et la qualité de la nourriture en suspension (chlorophylle *a*, phéopigments, carbone et azote dans le seston) à l'interface eau-sédiments au niveau des sites de récolte des bivalves.

De façon à minimiser les effets confondants de ces facteurs limnologiques sur la biodisponibilité du cadmium et les réponses toxicologiques des bivalves, une procédure de sélection de lacs a été développée en 1998 pour identifier, parmi les 20 lacs initiaux, 10 lacs ayant les caractéristiques limnologiques les plus semblables possibles mais offrant le même gradient initial de contamination en cadmium. La méthode de sélection des lacs est décrite en détail par Perceval *et al.* (2002). La sélection des lacs a permis de réduire le coefficient de variation moyen des facteurs limnologiques de 42 % à 26 % tout en maintenant le même niveau (84 %) de variation des facteurs toxicologiques.

En 1998, une étude intensive sur les 10 lacs sélectionnés (18 stations) a permis de déterminer les relations entre la contamination en Cd du milieu et **1)** la bioaccumulation de Cd dans les branchies des bivalves *Pyganodon grandis*, **2)** la concentration cytosolique du biomarqueur MT, **3)** la spéciation intracellulaire du Cd entre les ligands cytosoliques et **4)** les réponses des populations de bivalves, en ayant minimisé, a priori, par la procédure de sélection des lacs les effets confondants des facteurs limnologiques. Les résultats de cette étude, qui a permis d'évaluer l'utilisation de la MT comme biomarqueur d'effets toxiques du cadmium au niveau cellulaire chez l'individu (Giguère *et al.*, 2003) et au niveau des populations (Perceval *et al.*, 2003), sont résumés dans les sections 2.4 et 2.5.

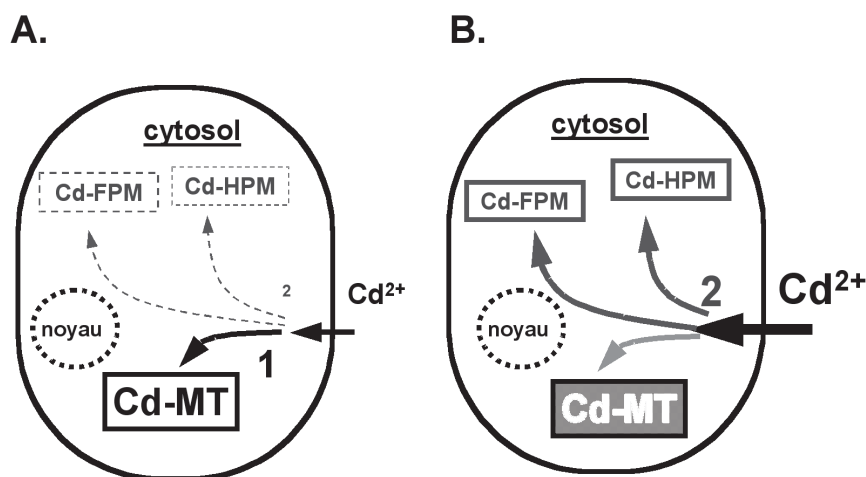
2.4. ÉVALUATION DE LA MT COMME BIOMARQUEUR DES EFFETS TOXIQUES DU CADMIUM AU NIVEAU DE LA CELLULE ET DE L'ORGANISME

La première réponse observée au niveau intracellulaire lors d'une exposition à un métal non essentiel (le cadmium) est la mobilisation de mécanismes de détoxification permettant de lier le métal à des ligands intracellulaires de façon à en réduire la toxicité (voir la section 2.3.3 du chapitre 1). Sous forme dissoute, les ligands intracellulaires dans le cytosol peuvent être opérationnellement répartis en trois classes : **1)** les protéines s'apparentant aux métallothionéines (MT), **2)** les ligands de haut poids moléculaire (L-HPM) et **3)** les ligands de faible poids moléculaire (L-FPM). Dans le cytosol, le cadmium peut se lier à ces trois ligands pour former

des complexes : Cd-MT, Cd-HPM, Cd-FPM (figure 2.3). En milieu naturel, les expériences de transplantation (Couillard *et al.*, 1995a,b ; Wang *et al.*, 1999 ; Baudrimont *et al.*, 1999) ont montré qu'en cas d'exposition à de faibles concentrations de cadmium, le mécanisme de détoxification induit une augmentation des trois complexes avec une dominance du complexe Cd-MT très stable et non toxique, sans saturation des capacités de l'organisme de synthétiser de la MT (figure 2.3A). Toutefois, si le niveau d'exposition augmente brusquement et que l'entrée de Cd dans la cellule dépasse les capacités de l'organisme à détoxifier le métal en le liant à la MT, la spéciation intracellulaire du Cd s'orientera vers la formation de complexes Cd-HPM et Cd-FPM (figure 2.3B). Ces complexes étant moins stables et plus facilement biodisponibles, ils pourraient alors déclencher des effets toxiques délétères au niveau des cellules chez l'organisme exposé.

Figure 2.3

Modèles de cytotoxicité (ou de débordement) cellulaire*



* Exposition en milieu naturel à de faibles (A) ou de fortes (B) concentrations de cadmium (Cd^{2+}) associée à la répartition du cadmium entre les ligands intracellulaires (MT : ligands apparentés aux métallothionéines HPM : ligands de haut poids moléculaire ; FPM : ligands de faible poids moléculaire).

L'étude intensive dans les 10 lacs de la région minière (incluant 18 stations) a permis de tester ce modèle de toxicité cellulaire en relation avec la manifestation d'un stress toxique dans les cellules branchiales du bivalve *Pyganodon grandis* exposées à un gradient de Cd^{2+} (0,003 à 0,93 nM) (Giguère *et al.*, 2003). Pour tester ce modèle et évaluer la MT comme biomarqueur d'effet toxique au niveau intracellulaire, on a mesuré

plusieurs variables toxicologiques et biochimiques selon les méthodes décrites succinctement au tableau 2.2 et présentées en détail dans Giguère *et al.* (2003). Pour cette étude au niveau inférieur de l'organisation biologique (cellule et organisme), on a pris en considération :

- le niveau d'exposition au cadmium dans le milieu exprimé par la concentration de l'ion libre Cd^{2+} estimée à l'interface sédiment-eau ;
- la bioaccumulation de Cd dans le cytosol des branchies et sa répartition entre les différents ligands intracellulaires (Cd-MT, Cd-FPM, Cd-HPM) ;
- la concentration totale de MT dans le cytosol des branchies ;
- les réponses au niveau cellulaire, évaluées selon la synthèse dans la glande digestive de molécules impliquées dans la réponse à un stress antioxydant (glutathion-peroxydase, glutathion-réductase) ou d'après un indice de lipoperoxydation des membranes cellulaires suite à un stress oxydant (malondialdéhyde) ;
- les réponses énergétiques chez l'organisme, soit la concentration de lipides dans les gonades.

En premier lieu, le rôle de la MT comme biomarqueur d'exposition au cadmium chez les bivalves *Pyganodon grandis* est confirmé. En effet, les concentrations de MT dans le cytosol des branchies reflètent bien le niveau de contamination du milieu par l'ion métallique Cd^{2+} ($r = 0,50$; $P \leq 0,001$) et les concentrations de Cd total dans le cytosol des branchies des bivalves ($r = 0,78$; $P \leq 0,001$) (figures 2.4A, 2.4B), tel que rapporté dans les études antérieures (tableau 2.1).

Deuxièmement, le modèle de débordement cellulaire par saturation du mécanisme de détoxification de la MT n'est pas corroboré par notre étude, où le gradient de contamination en Cd^{2+} dans le milieu est inférieur à 1 nM (0,003-0,93 nM). En effet, on observe une augmentation continue des trois complexes le long du gradient de contamination en Cd cytosolique (figure 2.4C) et une augmentation linéaire du complexe Cd-MT en fonction de l'induction de MT (figure 2.4D). Malgré cette augmentation, la distribution du Cd entre les différents complexes cytosoliques est demeurée relativement constante : 80 % dans la fraction Cd-MT, 7 % dans la fraction Cd-FPM et 13 % dans la fraction Cd-HPM. Pour ces organismes, exposés au Cd de manière chronique, il n'y avait donc pas de « seuil » d'exposition à partir duquel la distribution du Cd commençait à être perturbée. Cependant, la présence du Cd dans les fractions Cd-FPM et Cd-HPM suggère que sa détoxification était imparfaite, c'est-à-dire que *P. grandis* a été soumis à un stress causé par le Cd même à des concentrations externes en Cd relativement modestes. Par ailleurs, une étude menée dans la même région en 1994 (Wang *et al.*, 1999), sur un gradient plus large de contamination en cadmium (0,005-2,4 nM), indique des

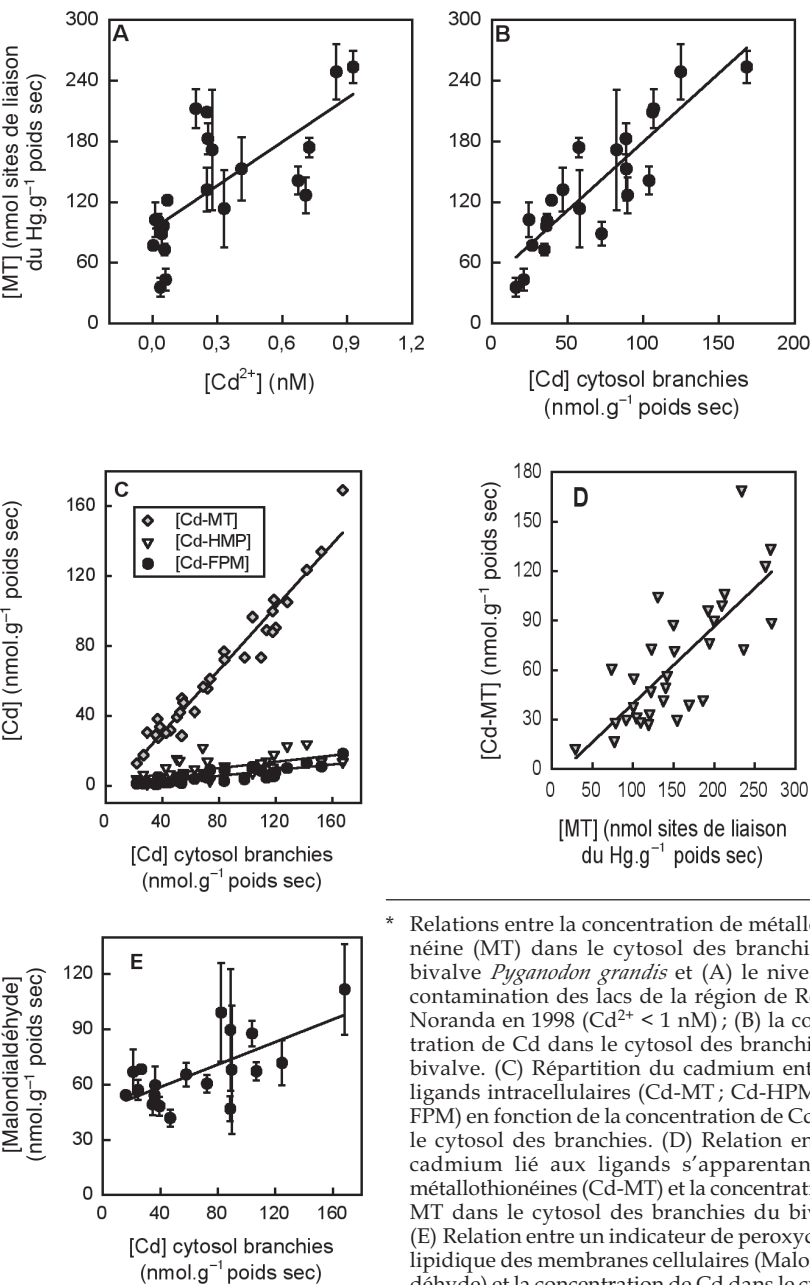
Tableau 2.2**Méthodes de mesure de la contamination au cadmium**

Variables	Méthodologies
Contamination^a du milieu, Cd²⁺	Couche superficielle oxyde des sédiments (0,5 cm), 3 carottes de sédiments par station
Couillard <i>et al.</i> , 1993	Extraction séquentielle du Cd
Tessier <i>et al.</i> , 1993	Estimation de la concentration de l'ion libre Cd ²⁺ selon un modèle géochimique basé sur l'équilibre de sorption de Cd ²⁺ entre l'eau et les sédiments
Tessier, 1992	
Contamination de l'organisme dans les branchies	12 moules par station (75-85 mm)
<i>Cd dans le cytosol</i>	Dissection des branchies (triplicats de 4 branchies)
<i>MT dans le cytosol</i>	Conservation sous atmosphère d'azote à -80 °C
Couillard <i>et al.</i> , 1993	Homogénéisation des branchies à 4 °C dans un tampon Tris
Dutton <i>et al.</i> , 1993	Séparation du cytosol par centrifugation
Giguère <i>et al.</i> , 2003	Analyse du Cd par ICP-MS Analyse de la MT par méthode de saturation au ²⁰³ Hg
Répartition intracellulaire du Cd dans le cytosol des branchies	Fractionnement du Cd cytosolique par HPLC
<i>Cd-MT Cd-FPM</i>	Elution sur colonne d'exclusion stérique
<i>Cd-HPM</i>	Trois fractions récupérées : L-HPM : 245-18 kDa MT : 18-1,8kDa L-FPM : < 1,8 kDa
Wang <i>et al.</i> , 1999	Analyse du Cd dans chaque fraction par GFAAS
Giguère <i>et al.</i> , 2003	
Réponses toxicologiques^b	Dissection glande digestive
<i>Glande digestive</i>	Conservation à -80 °C
<i>Malondialdéhyde (MDA)</i>	Homogénéisation dans du tampon Tris et mesure de la MDA au moyen de l'acide thiobarbiturique par colorimétrie
Giguère <i>et al.</i> , 2003	
Sunderman <i>et al.</i> , 1985	
<i>Glutathion-peroxydase</i>	Homogénéisation dans du tampon phosphate et mesure par suivi de la cinétique enzymatique au moyen de la spectrophotométrie
<i>Glutathion-réductase</i>	
Lawrence et Burk, 1976	
Carlberg et Mannervick, 1985	
<i>Gonades</i>	Homogénéisation dans du tampon phosphate
<i>Lipides</i>	Analyse des lipides totaux
Frings <i>et al.</i> , 1972	

a) la contamination du milieu et de l'organisme *Pyganodon grandis* par le cadmium dans 10 lacs de la région minière de l'Abitibi, et b) les réponses toxicologiques biochimique et énergétique au niveau cellulaire chez l'organisme *Pyganodon grandis*. Pour les détails, voir Giguère *et al.*, 2003.

Figure 2.4

Concentration de métallothionéine*



* Relations entre la concentration de métallothionéine (MT) dans le cytosol des branchies du bivalve *Pyganodon grandis* et (A) le niveau de contamination des lacs de la région de Rouyn-Noranda en 1998 ($\text{Cd}^{2+} < 1 \text{ nM}$); (B) la concentration de Cd dans le cytosol des branchies du bivalve. (C) Répartition du cadmium entre les ligands intracellulaires (Cd-MT; Cd-HMP, Cd-FPM) en fonction de la concentration de Cd dans le cytosol des branchies. (D) Relation entre le cadmium lié aux ligands s'apparentant aux métallothionéines (Cd-MT) et la concentration de MT dans le cytosol des branchies du bivalve. (E) Relation entre un indicateur de peroxydation lipidique des membranes cellulaires (Malondialdéhyde) et la concentration de Cd dans le cytosol des branchies du bivalve.

perturbations dans la spéciation intracellulaire du cadmium dans le cytosol des branchies de *Pyganodon grandis* exposés à des concentrations de $\text{Cd}^{2+} > 1 \text{ nM}$. La concentration de Cd sous forme de complexes Cd-FPM augmente de façon marquée dans les branchies des bivalves des deux lacs les plus pollués ayant des concentrations de $\text{Cd}^{2+} > 1 \text{ nM}$. Dans ces lacs, les branchies des bivalves présentent des signes de nécrose, indiquant un effet toxique potentiel chez les organismes.

Le long du gradient de contamination observé en 1998 ($[\text{Cd}^{2+}] < 1 \text{ nM}$), le stress toxique au niveau cellulaire s'est traduit par une augmentation de la malondialdéhyde (MDA), produit de la peroxydation lipidique des membranes, en fonction de l'accumulation de Cd dans le cytosol des branchies (figure 2.4E). Une hausse des concentrations de MDA après une exposition au Cd en laboratoire ou lors d'expériences de transplantation a déjà été rapportée par Couillard *et al.* (1995b) et Cossu *et al.* (2000) chez les bivalves Unionidés, et par Viarengo *et al.* (1990) chez les moules bleues. En 1990, chez le bivalve *Pyganodon grandis* transplanté pendant 400 jours d'un lac peu pollué ($[\text{Cd}^{2+}] : 0,28 \text{ nM}$) à un lac 10 fois plus pollué ($[\text{Cd}^{2+}] : 2,2 \text{ nM}$), l'augmentation de la MDA coïncidait avec l'augmentation de Cd-FPM dans le cytosol des branchies, suggérant ainsi un lien entre le débordement des mécanismes de compensation liés à la MT, l'augmentation des formes de Cd liés à des ligands plus faibles (Cd-FPM) et l'apparition de stress oxydant au niveau cellulaire (Couillard *et al.*, 1995b).

Notre étude de cas réalisée en 1998 sur le bivalve *P. grandis* suggère que la MT pourrait être utilisée comme biomarqueur d'effets de peroxydation lipidique au niveau cellulaire (avec production de malondialdéhyde) des niveaux de contamination en cadmium $< 1 \text{ nM}$ en milieu naturel. Cependant, les autres indicateurs biochimiques de stress oxydant au niveau cellulaire (glutathion-péroxydase, glutathion-réductase dans la glande digestive) et les indicateurs énergétiques (lipides totaux dans les gonades) chez le bivalve *Pyganodon grandis* n'ont pas répondu au gradient de contamination ambiante en $\text{Cd}^{2+} < 1 \text{ nM}$ et de biosynthèse de MT (Giguère *et al.*, 2003).

2.5. VALIDATION DE LA MT COMME BIOMARQUEUR DES EFFETS DES MÉTAUX AU NIVEAU DES POPULATIONS

2.5.1. Contexte écotoxicologique

Précédemment, nous avons démontré à partir d'études récentes en milieu minier le rôle de la métallothionéine (MT) comme biomarqueur d'exposition et de bioaccumulation du cadmium chez les invertébrés d'eau douce

(section 2.2). Le défi actuel est d'évaluer la MT comme biomarqueur d'effets toxiques au niveau supérieur de l'organisation biologique (Chapman, 2002 ; McCarty *et al.*, 2002 ; Beyer et Audet, 2002). Il y a encore peu d'évidence de l'existence de relations dose-réponse entre la production de MT et les réponses toxicologiques au niveau intracellulaire en milieu naturel (voir section 2.4). Il est encore plus difficile de relier les réponses des populations et des communautés à la contamination ambiante par les métaux traces, compte tenu des effets confondants des autres facteurs environnementaux qui peuvent modifier non seulement la biodisponibilité et la prise en charge des métaux, mais aussi la physiologie des organismes, la dynamique des populations et la structure des communautés. À notre connaissance, une seule étude, portant sur les réponses des populations de crapet soleil (*Lepomis auritus*) et de la communauté entière de poissons en amont et aval d'un effluent contaminé en mercure et BPC, aurait permis de mettre en évidence, dans les stations contaminées relativement au site de référence, une suite de réponses biochimiques (MFO, créatinine, triglycérides), physiologiques (hormones de reproduction, lipides totaux), démographiques (taux de croissance, taille moyenne des femelles) et écologiques (diversité, indice d'intégrité biologique) aux différents niveaux de l'organisation biologique (Adams *et al.*, 2000). Notre étude de cas est la première tentative de relier les réponses du bivalve d'eau douce *Pyganodon grandis*, à différents niveaux de l'organisation biologique, à la contamination en cadmium du milieu naturel. Après avoir présenté les réponses au niveau cellulaire (section 2.4), nous évaluons ici les effets de la contamination en cadmium au niveau des populations (Perceval *et al.*, 2003).

2.5.2. Variables toxicologiques

Dans le cadre de l'étude intensive réalisée en 1998 dans la région minière de Rouyn-Noranda, on a évalué les changements des variables démographiques des populations de *Pyganodon grandis* dans un sous-ensemble de 9 lacs en fonction 1) du gradient de contamination dans le milieu, 2) de la bioaccumulation du Cd et de sa spéciation intracellulaire et 3) de l'induction de MT dans le cytosol des branchies. Un petit lac atypique (Renaud) de très faible profondeur (< 1,5 m) et envahi par les plantes aquatiques n'a pas été retenu parmi les 10 lacs sélectionnés pour l'étude au niveau cellulaire. Le tableau 2.3 indique le niveau de contamination du milieu et des organismes, la concentration en MT à l'état stationnaire et la répartition du Cd cytosolique entre les trois ligands intracellulaires dans les branchies des bivalves de chacun des lacs (pour les méthodes, voir le tableau 2.2).

Tableau 2.3
Concentrations de cadmium*

Lac (code) (nb. stations)	[Cd ²⁺] (nM)	[Cd] cytosol (nM·g ⁻¹ p. sec)	[MT] (nM sites liaison du Hg·g ⁻¹ p. sec)	[Cd-HPM] (nM·g ⁻¹ p. sec)	[Cd-MT] (nM·g ⁻¹ p. sec)	[Cd-FPM] (nM·g ⁻¹ p. sec)
Bousquet (BO) (3)	0,605	90,55	182	16,71	73,19	5,88
Caron (CA) (1)	0,295	46,80	132	10,32	34,61	1,87
Dufay (DU) (3)	0,283	76,32	149	5,55	65,05	5,65
Évain (ÉV) (2)	0,052	55,91	105	3,08	45,85	6,83
Héva (HÉ) (1)	0,812	168,33	253	13,60	151,54	14,54
Joannès (JO) (3)	0,234	104,36	201	9,10	88,94	5,21
Ollier (OL) (2)	0,049	18,45	39	3,76	12,79	1,13
Opasatica (OP) (4)	0,039	29,87	93	2,12	30,83	1,21
Vaudray (VA) (1)	0,659	103,81	141	11,46	77,76	8,12

* Mesures des valeurs moyennes des concentrations de Cd dans le milieu [Cd²⁺] et dans le cytosol des branchies de *Pagannodon grandis* ([Cd] cytosol), de la production de MT et de la spéciation du Cd dans les ligands intracellulaires (Cd-HPM : fraction du cadmium lié aux ligands de haut poids moléculaire ; Cd-MT : fraction du cadmium lié à des ligands s'apparentant à la métallothionéine ; Cd-FPM : fraction du cadmium lié aux ligands de faible poids moléculaire) dans les 9 lacs sélectionnés pour l'étude des effets toxiques au niveau des populations.

2.5.3. État des populations et qualité environnementale des habitats

L'état de santé des populations de *Pyganodon grandis* a été diagnostiqué sur la base des variables de dynamique des populations, soit la densité et la biomasse dans la zone littorale des lacs, les paramètres de croissance (K : taux de croissance instantanée ; L^∞ : longueur asymptotique théorique), la production annuelle, le ratio de la production à la biomasse (ratio P/B), le temps de renouvellement de la population (inverse du ratio P/B) et la fécondité cumulée. Les méthodes utilisées pour estimer les variables démographiques des populations de moules sont résumées dans le tableau 2.4 et présentées en détail dans Perceval *et al.* (2003). Le tableau 2.5 présente les valeurs des variables de population des bivalves dans chacun des lacs. Les variables de densité, de biomasse, de production et de fécondité sont étroitement corrélées ($r = 0,71-0,96$), tandis que le ratio P/B et les paramètres de croissance (L^∞ , K) fournissent une réponse indépendante des autres variables.

Tel que suggéré par Chapman (2002), une étude écotoxicologique au niveau des populations doit prendre en considération les facteurs environnementaux des habitats naturels. Dans le cadre de cette étude, nous avons tenu compte des effets confondants de la chimie de l'eau (pH, Ca, COD) sur la biodisponibilité du cadmium et de certains facteurs écologiques, en particulier l'abondance et la qualité de la matière en suspension filtrée par les moules (Chl.a, C Sest, N Sest), la quantité de chaleur accumulée durant l'été (degrés-jours) à l'interface eau-sédiments au niveau des sites de récolte des bivalves, qui peut influencer leur croissance, et l'abondance des poissons hôtes dans le milieu, qui conditionne le développement et la dispersion des larves (ou glochidies). Le tableau 2.6 présente les caractéristiques morphométriques et limnologiques des lacs (voir Perceval *et al.*, 2002 et le tableau 2.4 pour les méthodes).

2.5.4. Relations entre l'état des populations et les variables toxicologiques

Pour évaluer l'utilisation de la MT comme biomarqueur d'effets toxiques au niveau des populations et tester le modèle de cytotoxicité cellulaire (figure 2.3), les relations entre les variables des populations (tableau 2.5) et les variables toxicologiques (tableau 2.3) ont été évaluées par des corrélations (r de Pearson) sur les données transformées (log-log ou racine carrée), en appliquant la correction de Bonferroni pour tests multiples (Perceval *et al.*, 2003). La signification statistique des coefficients de corrélation a été testée par permutation (Legendre et Legendre, 1998).

L'abondance des populations de *Pyganodon grandis*, en densité et en biomasse, ainsi que leur production et leur fécondité cumulée diminuent en fonction du gradient de contamination en Cd^{2+} dans les lacs à l'étude (figures 2.5 a-d). Les plus faibles valeurs ont été observées dans les lacs

Tableau 2.4

Méthodes de mesure des variables démographiques*

Variables	Méthodologies
Densité littorale <i>(nb. individus.m⁻²)</i> Perceval <i>et al.</i> , 2002 Downing, 1992 Hanson <i>et al.</i> , 1988 Huebner <i>et al.</i> , 1990 Perceval <i>et al.</i> , 2003 Cochran, 1977	Récolte de moules par aspiration des sédiments en plongée dans des quadrats de 1 × 1 m (juillet-août 1998) et par recherche visuelle dans des segments de 10 × 2 m (septembre 1999) le long de transects au niveau de la zone littorale des lacs selon un plan d'échantillonnage aléatoire stratifié (3 strates : 0-2 m, 2-4 m, 4-6 m ; 13 à 33 transects par lac). Une profondeur maximale de 6 m a été choisie comme limite inférieure de la distribution des moules. 17-675 moules récoltées selon cette méthode dans chaque lac. Échantillon de 120 moules de différentes tailles prélevé dans chaque lac pour la détermination des relations longueur-âge et longueur-poids ainsi que de la fécondité cumulée. La précision sur les densités moyennes est de 30 %.
Biomasse littorale <i>(poids vivant) (g.m⁻²)</i> <i>(poids sec somatique) (g.m⁻²)</i> Hanson <i>et al.</i> , 1988 Perceval <i>et al.</i> , 2003	Estimation des relations longueurs-poids sur un sous-échantillon de 50 individus de différentes tailles. Poids vivant = poids frais avec coquille. Poids sec somatique = poids sec des viscères après séchage à 60 °C pendant 36 h. Calcul de la biomasse totale par lac à partir de la fréquence relative des différentes classes d'âge au sein des populations, de la longueur moyenne de la coquille pour les différentes classes d'âge et des relations longueur-poids appropriées.
Taux de croissance instantané (an⁻¹) Longueur asymptotique théorique (mm) McCuaig et Green, 1983 Hinch <i>et al.</i> , 1986 Morris et Corkum, 1999 Perceval <i>et al.</i> , 2003	Mesure des longueurs totales à chaque annulus de croissance sur un sous-échantillon de 100 moules de différentes tailles. Estimation des paramètres des régressions de Walford pour chacun des lacs et calcul des paramètres L_{∞} (longueur asymptotique théorique) et K (taux de croissance instantané de Brody) de l'équation de croissance de von Bertalanffy.
Production <i>(poids vivant) (g.m⁻².an⁻¹)</i> <i>(poids sec somatique) (g.m⁻².an⁻¹)</i> Hanson <i>et al.</i> , 1988 Perceval <i>et al.</i> , 2003	Estimation de la biomasse moyenne de chaque classe d'âge et mesure de l'accroissement de la biomasse annuelle entre chaque classe d'âge. Estimation de la production annuelle en biomasse par sommation des accroissements de biomasse des classes d'âge sans tenir compte de la mortalité.

Tableau 2.4 (suite)**Méthodes de mesure des variables démographiques***

Variables	Méthodologies
Taux de renouvellement (ratio P/B) Perceval <i>et al.</i> , 2003	Rapport entre la production et la biomasse annuelle
Fécondité individuelle (<i>nb. larves-femelle gravide⁻¹</i>) Fécondité cumulée (<i>nb. larves·m⁻²</i>) Aldridge, 1999	Détermination du sexe ratio : femelles gravides avec larves glochidies, femelles non gravides, mâles. Comptage au microscope du nombre de glochidies par femelle gravide. Estimation de la fécondité individuelle en fonction de la taille. Estimation de fécondité cumulée par sommation du nombre total de glochidies produites par m ² par les différentes classes d'âge.
Chaleur accumulée <i>Degrés-jours</i> Young et Young, 1998 Perceval <i>et al.</i> , 2003	Enregistrement de la température à toutes les 2 heures entre juin et septembre à l'aide de sondes thermométriques miniatures (Onset Computer Corp.) placées dans un contenant étanche à 10 cm au dessus des sédiments superficiels de chaque station de récolte des moules. Une température de 10 °C a été utilisée comme seuil inférieur pour le calcul du nombre de degrés-jours. Cette température coïncide avec l'émergence des moules des sédiments après la période d'hibernation. Calcul des degrés-jours selon la méthode rectangulaire.
Poissons hôtes Perceval <i>et al.</i> , 2003	Échantillonnage des poissons littoraux avec des seines (50 × 33 m ; 9 mm de taille de mailles). 10 coups de seine par lac correspondant chacun à des surfaces échantillonnées de 400-600 m ² et à des profondeurs de 0,5 à 3 m. L'efficacité des captures dans les seines a été vérifiée par un plongeur. Énumération des poissons et estimation des abondances en captures par unité d'effort (CPUE) : 1 unité d'effort = 1 coup de seine.

* Mesures des variables démographiques des populations de *Pyganodon grandis*, calcul de la chaleur accumulée au cours de l'été et échantillonnage des communautés de poissons dans la zone littorale de 9 lacs de la région minière de Rouyn-Noranda. Pour les détails, voir Perceval *et al.*, 2002 et 2003.

Tableau 2.5
Caractéristiques démographiques dans les lacs sélectionnés*

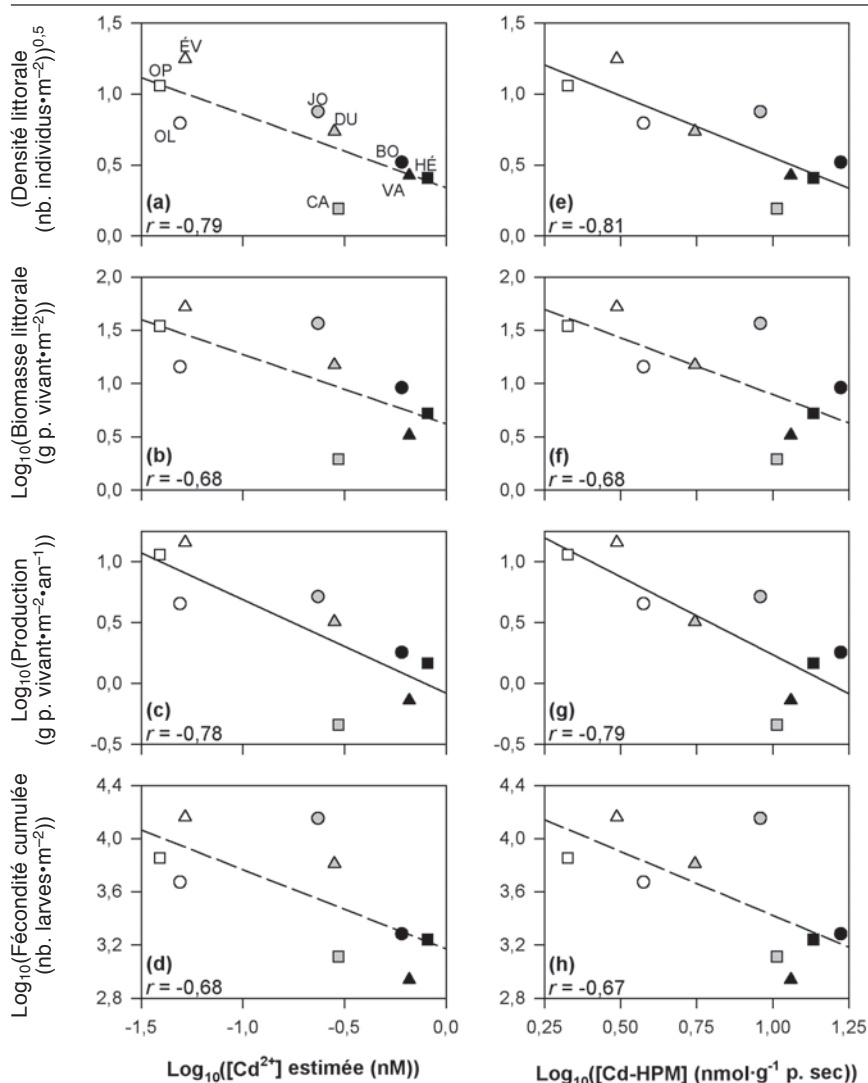
Lac (nb. stations)	Densité (nb. ind. \cdot m ⁻²)	Biomasse (p. vivant) (g \cdot m ⁻²)	Production (p. vivant) (g \cdot m ⁻² \cdot an ⁻¹)	P/B	L ∞ (mm)	K (an ⁻¹)	Biomasse (p. secs somatiques) (g \cdot m ⁻²)	Production (p. secs somatiques) (g \cdot m ⁻² \cdot an ⁻¹)	P/B	Fécondité cumulée (nb. larves \cdot m ⁻²)
Bousquet (3)	0,27	9,17	1,80	0,20	126,61	0,10	0,24	0,05	0,19	1 926
Caron (1)	0,04	1,95	0,46	0,23	116,63	0,22	0,04	0,01	0,23	1 297
Dufay (3)	0,54	14,98	3,21	0,21	88,92	0,24	0,31	0,06	0,20	6 456
Évain (2)	1,56	52,29	14,41	0,28	111,92	0,23	1,13	0,32	0,28	14 549
Héva (1)	0,17	5,27	1,47	0,28	102,37	0,25	0,11	0,03	0,27	1 744
Joannès (3)	0,77	36,79	5,18	0,14	110,97	0,15	0,74	0,09	0,12	14 225
Ollier (2)	0,63	14,38	4,52	0,31	133,61	0,11	0,28	0,09	0,31	4 719
Opasatica (4)	1,12	34,75	11,48	0,33	110,27	0,22	0,59	0,19	0,32	7 155
Vaudray (1)	0,18	3,27	0,73	0,22	92,64	0,16	0,05	0,01	0,22	869

* Densité et biomasse (moyennes des campagnes d'échantillonnage de 1998 et 1999), production et taux de renouvellement (P/B) (en terme de poids total vivant et de poids secs somatiques), paramètres des courbes de croissance (L ∞ : longueur asymptotique théorique, K: taux de croissance instantané) et fécondité cumulée des populations de *Pygodon grandis* dans la zone littorale des 9 lacs sélectionnés. Les méthodes d'analyse des variables démographiques sont résumées au tableau 2.4.

Héva (HÉ), Bousquet (BO) et Vaudray (VA), les plus contaminés en cadmium ($[Cd^{2+}] > 0,6$ nM), tandis que les plus fortes valeurs ont été notées dans les lacs Opasatica (OP), Ollier (OL) et Évain (ÉV), 10 fois moins contaminés ($[Cd^{2+}] < 0,05$ nM) (tableau 2.3). Le lac Caron (CA), avec un niveau de contamination intermédiaire ($[Cd^{2+}] = 0,3$ nM), similaire à celui des lacs Joannès (JO) et Dufay (DU), abrite la population la moins abondante, la moins productive et la moins féconde, en terme de fécondité cumulée. Cette réponse atypique pourrait être due à la morphométrie du lac Caron, caractérisée par une très grande surface (12 km^2) et par une zone littorale réduite (15 % de la surface du lac) avec une pente moyenne de la zone littorale abrupte (34 %), une configuration d'habitat peu propice à l'installation de peuplements de bivalves (tableau 2.6). Les autres lacs sont en général de plus petite taille (sauf les lacs Opasatica et Vaudray) avec une zone littorale étendue sur plus de 50 % de la surface totale et en pente douce inférieure à 11 %.

Les paramètres de croissance des populations indiquent que le taux de croissance instantanée (K) est plus faible dans les lacs Vaudray, Bousquet, Joannès et Ollier ($K < 0,200 \text{ an}^{-1}$) et plus fort dans les lacs Opasatica, Héva, Évain, Dufay et Caron ($K > 0,200 \text{ an}^{-1}$) (tableau 2.5). La longueur asymptotique théorique des populations (L^∞) est la plus faible dans les populations des lacs Vaudray et Dufay ($L^\infty < 100 \text{ mm}$) et la plus forte dans les lacs Ollier et Bousquet ($L^\infty > 125 \text{ mm}$) (tableau 2.5). Toutefois, les variations de ces paramètres de croissance ne semblent pas reliées au gradient de contamination des lacs ou des organismes (Perceval *et al.*, 2003). La longueur asymptotique théorique reçoit plutôt l'influence positive du niveau de minéralisation des lacs (*i.e.*, concentration de calcium dissous dans la colonne d'eau) et de la quantité et la qualité de la nourriture disponible (C Sest et N Sest) ($r = 0,78$ et $0,76$, $P < 0,016$) (Perceval *et al.*, 2003).

La métallothionéine n'offre pas un bon potentiel comme biomarqueur d'effets toxiques du Cd au niveau des populations puisque la plupart des variables ne sont pas corrélées avec la concentration de MT dans les branchies des bivalves, bien que les corrélations suggèrent une détérioration de l'état des populations avec la production de MT (tendances négatives non significatives). Seule, la productivité des populations (ratio P/B) diminue en fonction des concentrations de Cd et de MT dans le cytosol des branchies (figures 2.6 a-b). Le ratio P/B varie de 0,14 à 0,33, ce qui signifie que les populations renouvellent leur biomasse, au pire, seulement tous les 7 ans (lac Joannès) ou, au mieux, tous les 3 ans (lac Opasatica). Les populations des lacs les moins contaminés (Opasatica, Ollier, Évain) affichent les meilleures productivités (P/B : 0,28-0,32, soit, les temps de renouvellement les plus courts), mais on observe de faibles

Figure 2.5**Réactions des populations de bivalves au niveau de contamination***

* Relations entre les réponses des populations du bivalve *Pyganodon grandis* (densité, biomasse, production, fécondité cumulée) dans la zone littorale de 9 lacs de la région de Rouyn-Noranda en 1998, en fonction du niveau de contamination du milieu (Cd²⁺: a-d) estimé selon un modèle géochimique d'équilibre de sorption à l'interface eau-sédiment (Tessier, 1992), et la concentration de cadmium lié aux ligands de haut poids moléculaire (Cd-HPM: e-h) dans le cytosol des branchies du bivalve. Les symboles géométriques (cercle, carré, triangle) indiquent les lacs peu contaminés en blanc (OP, ÉV, OL), moyennement contaminés en gris (JO, DU, CA) et très contaminés (BO, VA, HÉ) en noir (voir tableau 2.3 pour les abréviations des noms des lacs).

Tableau 2.6
Caractéristiques morphométriques et limnologiques des 9 lacs sélectionnés*

Lac (nb. stations)	Aire lac (km ²)	Aire zone littorale (km ²)	Pente zone littorale (%)	pH ^a	Ca (mg·L ⁻¹)	COD (mg·L ⁻¹)	Chl a (µg·L ⁻¹)	C Sest (mg C·L ⁻¹)	N Sest (mg N·L ⁻¹)	Degrés- jours
Bousquet (3)	2,32	1,15	11,1	6,50	4,26 ± 0,35	16,2 ± 3,6	1,44 ± 0,54	0,64 ± 0,37	0,150 ± 0,175	715
Caron (1)	12,25	1,87	34,2	6,97	11,60 ± 1,66	10,4 ± 2,2	1,26 ± 0,38	0,32 ± 0,21	0,081 ± 0,106	669
Dufay (3)	4,36	2,94	5,8	6,81	2,99 ± 0,19	9,6 ± 0,3	2,11 ± 0,64	0,55 ± 0,17	0,061 ± 0,032	752
Évain (2)	2,05	1,17	4,9	7,48	6,83 ± 0,28	7,7 ± 0,7	2,12 ± 1,31	0,37 ± 0,22	0,050 ± 0,047	847
Héva (1)	2,37	2,19	1,6	6,15	2,10 ± 0,15	9,9 ± 0,6	2,21 ± 0,79	0,74 ± 0,23	0,092 ± 0,045	755
Joannès (3)	4,45	2,00	4,6	7,24	6,90 ± 0,21	11,2 ± 1,3	1,94 ± 0,77	0,43 ± 0,10	0,044 ± 0,025	758
Ollier (2)	0,79	0,65	2,8	7,52	12,37 ± 0,63	7,8 ± 0,9	1,71 ± 0,34	0,50 ± 0,22	0,057 ± 0,044	817
Opasatica (4)	9,75	5,98	2,5	7,60	8,42 ± 0,29	7,9 ± 2,3	1,40 ± 0,36	0,38 ± 0,10	0,053 ± 0,027	771
Vaudray (1)	7,37	3,17	5,7	6,65	3,28 ± 0,32	9,0 ± 0,4	1,11 ± 0,57	0,34 ± 0,09	0,033 ± 0,003	706

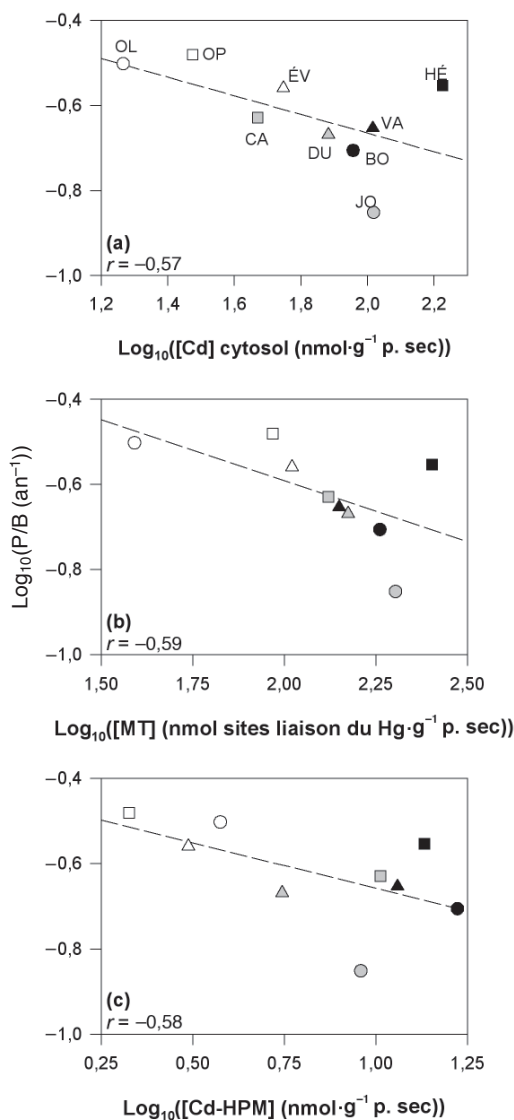
* Les méthodes d'estimation des variables morphométriques et limnologiques sont décrites par Perceval *et al.* (2002) et dans le tableau 2.4.
Note: La pente de la zone littorale a été déterminée à l'aide de cartes bathymétriques ; elle correspond à la moyenne des pentes individuelles ($\eta = 41-671$, selon l'aire du lac) calculée en fonction de la différence en élévation entre la bordure du lac et l'isobathe de 6 m divisée par la plus courte distance entre les deux. Pour le calcul de l'ion libre [Cd²⁺], on a récolté par plongée la couche superficielle oxygénée des sédiments dans chaque station à 2 périodes (juin 1997 et juin 1998) et des échantillons d'eau au dessus des sédiments à 6 périodes (juin, juillet, août et septembre 1997 ; juin et septembre 1998). Les valeurs des variables limnologiques (à l'exception des degrés-jours) sont la moyenne (\pm écart-type) de 6 échantillons récoltés en 1997 et 1998. Les données de température de 3 stations de la zone littorale (au lieu de 1) ont servi à calculer le nombre de degrés-jours pour *P. grandis* aux lacs Caron et Vaudray. ^a-log₁₀(moyenne [H⁺]).

productivités ($P/B : 0,12-0,2$, soit des temps de renouvellement plus longs) autant dans les populations de lacs très (Vaudray et Bousquet) ou modérément (Joannès) contaminés. Par ailleurs, la population du lac Héva, le plus fortement contaminé, a une bonne productivité ($P/B = 0,27$), comparable à celle d'Évain ($P/B = 0,28$), un lac peu contaminé (tableaux 2.3 et 2.5).

Le meilleur biomarqueur des effets délétères du Cd sur l'état de santé des populations de bivalves est la concentration de Cd liée aux ligands de haut poids moléculaire (Cd-HPM). Ainsi, à l'exception des paramètres des courbes de croissance de von Bertalanffy (L_∞ et K) qui ne sont pas reliés aux variables toxicologiques, la baisse de l'abondance et la biomasse, de la production, du ratio P/B et de la fécondité cumulée des populations est associée à une augmentation du complexe Cd-HPM dans le cytosol des branchies des organismes (figures 2.5e-h ; figure 2.6c). Ceci indiquerait un lien entre le mauvais état de santé des populations de bivalves et l'augmentation du Cd cytosolique lié aux ligands HPM dans le cytosol des branchies, phénomène pouvant suggérer un manque d'efficacité des mécanismes de détoxification liés à la MT chez les populations les plus exposées au cadmium. En effet, les plus fortes concentrations de Cd-HPM ont été notées dans les lacs les plus contaminés (Vaudray, Bousquet et Héva : $[Cd^{2+}] > 0,6 \text{ nM}$; Cd-HPM $> 11,6 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ p. sec}$) où les réponses des populations sont généralement les moins bonnes (figures 2.5 et 2.6). Dans le lac Joannès, où le niveau de contamination est intermédiaire ($[Cd^{2+}] = 0,23 \text{ nM}$), et où les populations sont en bon état (figure 2.5), la concentration de Cd lié à la MT ($89 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ p. sec}$) est similaire au niveau rencontré dans les lacs les plus contaminés ($73-151 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ p. sec}$), mais celle de Cd lié aux ligands de haut poids moléculaire (Cd-HPM) est plus faible ($9 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ p. sec}$) que dans les lacs contaminés ($11-17 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1} \text{ p. sec}$) (tableau 2.3).

Notre étude des populations démontre l'importance de déterminer la spéciation du Cd entre les ligands intracellulaires afin de mettre en évidence la forme la plus appropriée du biomarqueur. Le complexe Cd-HPM semble un meilleur biomarqueur d'effets délétères au niveau des populations que la MT elle-même, même si ces deux fractions subcellulaires ont une certaine corrélation (section 2.4). Les réponses des populations dans les milieux les plus contaminés sont reliées à un changement dans la spéciation intracellulaire du Cd correspondant à l'augmentation du Cd lié aux ligands HPM (figures 2.5e-h ; figure 2.6c).

Figure 2.6
Productivité des populations de bivalves en fonction de la contamination*



* Relations entre la productivité (ratio P/B) des populations du bivalve *Pyganodon grandis* dans la zone littorale de 9 lacs de la région de Rouyn-Noranda en 1998, en fonction de la concentration de Cd (a), de MT (b) et de Cd lié aux ligands de haut poids moléculaire (Cd-HPM: c) dans le cytosol des branchies du bivalve. Les symboles géométriques (cercle, carré, triangle) indiquent les lacs peu contaminés en blanc (OP, EV, OL), moyennement contaminés en gris (JO, DU, CA) et très contaminés (BO, VA, HÉ) en noir (voir tableau 2.3 pour les abréviations des noms des lacs).

2.5.5. Discussion

Les études visant à évaluer *in situ* les effets toxiques du cadmium au niveau des populations d'invertébrés aquatiques sont encore très rares, la plupart des études ayant été réalisées en laboratoire ou dans le cadre d'expériences de transplantation. Ainsi Jensen *et al.* (2001) ont étudié en laboratoire les effets du cadmium sur les traits de vie (taux de croissance, temps et taille à la première reproduction, fécondité, taille à la naissance) de 4 clones d'un petit gastéropode *Potamogyrus antipodarum* à des niveaux d'exposition variant de 3,6 à 13 nM Cd dans l'eau et de 32 à 130 nM Cd·g⁻¹ p. sec dans les sédiments. L'exposition au cadmium durant 60 jours à des concentrations supérieures à 65 nM Cd·g⁻¹ p. sec dans les sédiments a eu des effets négatifs sur certains traits de vie, en particulier le taux de croissance, mais la tolérance au Cd et les réponses démographiques étaient très variables d'un clone à l'autre. Lors d'expériences de transplantation du bivalve *Corbicula fluminea* pendant 150 j dans des sites faiblement ou fortement pollués de la rivière Lot (France), Andrès *et al.* (1999) ont observé une inhibition de la croissance dans les sites les plus pollués. Dans notre région d'étude en 1990, les bivalves *Pyganodon grandis* ont aussi manifesté une inhibition de croissance et une baisse de leur indice de condition (poids du corps/poids de la coquille) après leur transplantation du lac Opasatica ([Cd²⁺] : 0,28 nM) au lac Vaudray ([Cd²⁺] : 2,2 nM) (Couillard *et al.*, 1995b). Chez les invertébrés marins, des études en laboratoire ont montré un effet délétère du Cd sur la croissance et la reproduction du polychète *Neanthes arenaceodentata* à des concentrations de [Cd²⁺] > 10 nM lorsque les formes complexes de Cd-MT et Cd-FPM ou Cd-HPM augmentaient (Jenkins et Sanders, 1986 ; Jenkins et Mason, 1988). McGreer (1982) a aussi étudié les impacts des métaux traces sur les populations naturelles du bivalve *Macoma balthica*. Cependant, aucune de ces études n'a évalué en parallèle les relations entre la production de MT, la spéciation intracellulaire du Cd et les changements dans les populations à des niveaux d'exposition chronique en milieu naturel.

Notre étude de cas semble indiquer pour la première fois l'existence de relations statistiques entre des effets délétères au niveau des populations du bivalve *Pyganodon grandis* et le niveau d'exposition au cadmium en milieu naturel (Cd²⁺), ainsi que l'occurrence de Cd lié de façon non spécifique à des ligands de haut poids moléculaire (Cd-HPM) dans le cytosol des organismes. Cependant, compte tenu des effets multiples et interactifs des autres facteurs environnementaux en milieu naturel, il est essentiel de tester si les relations observées ne sont pas causées par des interactions indirectes avec d'autres facteurs environnementaux pouvant avoir un effet confondant. Même si nous avons appliqué une procédure de sélection de lacs visant à minimiser la variabilité des facteurs limnologiques, il reste encore une variabilité naturelle résiduelle au niveau

des facteurs limnologiques et écologiques qui peut confondre les réponses des organismes et des populations. C'est ce que nous allons examiner dans la section suivante.

2.6. EFFETS CONFONDANTS DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX EN MILIEU NATUREL

En eau douce, plusieurs facteurs environnementaux extrinsèques (dans le milieu) ou intrinsèques (chez les organismes) peuvent moduler la biodisponibilité du cadmium et la biosynthèse de métallothionéine (voir Campbell et Couillard, 2004, chapitre 1) et affecter ensuite directement ou indirectement les réponses biologiques des organismes aux métaux traces.

Selon le Modèle du ligand biotique, le transport membranaire du cadmium et son accumulation dans le cytosol des invertébrés en eau douce devraient être influencés par les concentrations de protons (H^+) et de cations majeurs (Ca^{2+} , Mg^{2+}) qui compétitionnent avec l'ion métallique Cd^{2+} pour les sites de liaison membranaires, et par la présence de matière organique dissoute (COD, AH + AF) (voir Campbell et Couillard, 2004, chapitre 1). L'influence de ces compétiteurs est liée aux variations de la qualité chimique de l'eau qui peuvent modifier la prise en charge du cadmium et sa toxicité potentielle (Amyot *et al.*, 1994 ; Bervoets et Blust, 1999 ; Croteau *et al.*, 2002). En milieu naturel, on a montré que le calcium est un compétiteur du Cd aux sites d'absorption membranaire chez plusieurs espèces de bivalves (*Elliptio complanata*, *Pyganodon grandis*) (Wang et Evans, 1993 ; Perceval *et al.*, 2002 ; Couillard *et al.*, 2003), d'amphipodes (*Hyalella azteca*, *Gammarus fasciatus*) (Stephenson et Mackie, 1988 ; Amyot *et al.*, 1994), et des larves de Diptères (*Chaoborus* sp., *Chironomus staegeri*) (Hare et Tessier, 1996 ; Craig *et al.*, 1999). La présence de matière organique dissoute et la salinité en milieu marin peuvent aussi diminuer la biodisponibilité du cadmium (Evans et Lasenby, 1993 ; Croteau *et al.*, 1998 ; Mouneyrac *et al.*, 1998 ; Oste *et al.*, 2001). Finalement, Stewart (1999) a montré dans le cadre d'expériences en mésocosmes que la présence d'une contamination polymétallique (Cu, Zn, Pb, Ni) peut diminuer la prise en charge et la bioaccumulation du Cd chez le bivalve *Pyganodon grandis*. Les variations de ces facteurs dans les sites d'études en milieu naturel doivent donc être limitées et prises en considération si l'on veut mieux décrire les réponses des organismes au gradient de contamination en cadmium.

Parmi les facteurs intrinsèques aux organismes, la taille et l'âge, le sexe, le cycle de reproduction et le type de nutrition sont aussi susceptibles de moduler la bioaccumulation du cadmium et la biosynthèse de MT (Groulx et Lasenby, 1992 ; Amyot *et al.*, 1994 ; Metcalfe-Smith *et al.*, 1995 ; Mouneyrac *et al.*, 1998 ; Amiard-Triquet *et al.*, 1998). Toutefois, chez

le bivalve *Pyganodon grandis*, les variations saisonnières de la MT sont beaucoup plus faibles que celles observées le long d'un gradient de contamination polymétallique en région minière (Couillard *et al.*, 1995a ; Wang *et al.*, 1999). En outre, les résultats obtenus par Kalhok et Cyr (1997) dans une étude conduite sur les populations naturelles de *P. grandis* dans la région de Rouyn-Noranda démontrent que, au sein d'un même lac, les concentrations de MT dans les tissus mous des bivalves ne varient pas de façon significative avec la taille, l'âge ou l'indice de condition des individus.

Les effets relatifs de l'exposition au cadmium et des facteurs naturels, et de leurs interactions, sur la bioaccumulation de cadmium et la synthèse de métallothionéine chez les invertébrés benthiques ont rarement été évalués en milieu naturel. Récemment, Couillard *et al.* (2003) ont analysé les effets des interactions compétitives impliquant les cations majeurs (Ca^{2+} , Mg^{2+}), les métaux (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+}) et l'ion hydrogène (H^+) sur la prise en charge du cadmium (Cd^{2+}) et la concentration de métallothionéine (MT) chez deux organismes sentinelles (le bivalve *Pyganodon grandis* et la larve d'éphémère *Hexagenia limbata*) dans la région minière de Rouyn-Noranda. Pour le bivalve, le calcium (Ca^{2+}) apparaît le principal compétiteur du Cd au niveau des sites d'absorption, tandis que l'ion hydrogène (H^+) est le seul compétiteur chez la larve d'éphémère. Lorsque l'on tenait compte de ces facteurs confondants, les modèles reliant les concentrations de MT chez les organismes au niveau de la contamination du milieu (Cd^{2+}) étaient significativement améliorés. Les mêmes effets confondants ont été mis en évidence par Perceval *et al.* (2002) dans les 20 lacs étudiés en 1997 dans la région minière de Rouyn-Noranda. La sélection des 10 lacs pour l'étude intensive en 1998, ayant minimisé les variations inter-lac dans la chimie de l'eau (*i.e.*, pH et Ca), a permis d'obtenir une très bonne prédiction des concentrations de Cd ($R^2 = 0,74$; $P < 0,0001$) et de MT ($R^2 = 0,62$; $P < 0,0001$) dans les branchies du bivalve *P. grandis* à partir des concentrations de l'ion libre (Cd^{2+}), en tenant compte des effets de ces facteurs confondants (pH et Ca) (Perceval *et al.*, 2002). Ces études suggèrent également qu'il n'est pas possible d'extrapoler les réponses d'un invertébré qu'on a choisi comme organisme sentinelle aux autres espèces d'invertébrés de la communauté puisqu'à un niveau similaire de contamination en cadmium, la prise en charge du Cd et la production de MT sont différentes d'une espèce à l'autre et d'un habitat à l'autre.

Lorsque l'on traite des réponses des *populations* d'invertébrés aquatiques, les interactions avec les facteurs environnementaux deviennent encore plus complexes, car la dynamique des populations est influencée non seulement par certaines caractéristiques chimiques de l'eau (p. ex., le calcium pour les mollusques et crustacés) mais aussi par de nombreux

autres facteurs écologiques (p. ex., disponibilité et qualité de la nourriture, présence de poissons-hôte et de prédateurs). Dans le cadre de notre étude de cas, les effets confondants des facteurs environnementaux ont été évalués, comparativement aux relations observées avec les variables toxicologiques (Perceval *et al.*, 2003). L'étude montre qu'il existe, tel que montré auparavant (section 2.5), des corrélations négatives ($r = -0,58$ à $-0,81$; $P < 0,05$) entre les variables des populations (densité et biomasse, production et fécondité, ratio P/B) et le niveau de contamination du milieu (Cd^{2+}) et/ou le Cd lié aux ligands de haut poids moléculaire (Cd-HPM) dans le cytosol des branchies de *P. grandis* (tableau 2.7). Toutefois, ces mêmes variables (sauf le ratio P/B) présentent par ailleurs des corrélations positives plus élevées ($r = 0,75$ - $0,87$; $P < 0,05$) avec la chaleur accumulée dans la zone littorale des lacs, une variable qui n'avait pas été mesurée à tous les sites lors de l'étude extensive de 1997 et qui ne fut finalement pas prise en compte pour la sélection des lacs pour l'étude intensive de 1998. Les lacs les moins pollués (Opasatica, Ollier, Évain) sont ceux qui ont accumulé le plus de chaleur en 1998 dans la zone littorale, tandis que les lacs Vaudray et Bousquet, les plus pollués, et le lac Caron, avec une zone littorale à pente abrupte, ont accumulé moins de chaleur dans la zone littorale. Il existe donc une relation inverse entre la chaleur accumulée dans la zone littorale et le niveau de contamination des lacs en cadmium (Cd^{2+}) ($r = -0,71$; $P < 0,05$), qui confond nos résultats. Lorsque l'on contrôle les effets de la chaleur accumulée dans la zone littorale des lacs entre les lacs sur les différentes variables des populations, à l'aide de corrélations partielles (Legendre et Legendre, 1998), il n'y a plus de relations significatives entre les variables des populations et le niveau de contamination (Cd^{2+}) ou le biomarqueur (Cd-HPM) ($r = -0,36$ et $-0,40$; $P > 0,05$) (Perceval *et al.*, 2003). Les effets confondants dus au régime thermique des lacs dans la zone littorale doivent cependant être considérés avec réserve, car il y a une différence maximum de 21 % entre la plus haute et la plus petite valeur de chaleur accumulée en zone littorale (en degrés-jours) dans les lacs, ce qui laisse suggérer que les températures moyennes estivales de nos lacs doivent différer de peu (1 ou 2 °C). Eu égard à l'influence considérable que la variable degré-jour a au point de vue statistique, il y aurait lieu de s'assurer que cette influence correspond bien à une influence réelle au point de vue biologique. Par ailleurs, le nombre ou l'abondance des espèces de poissons hôtes n'a pas d'influence sur les réponses des populations (tableau 2.7).

En ce qui concerne les autres facteurs environnementaux (pH, Ca, Chl. *a*, C Sest et N Sest) dont on avait minimisé la variabilité par la procédure de sélection des lacs, très peu d'entre eux (sauf le pH, et la chlorophylle pour la fécondité cumulée) présentent de relation statistique significative avec les réponses des populations (tableau 2.7). L'effet du

Tableau 2.7
Effets de la contamination du milieu sur les populations*

	Densité (nb. ind.·m ⁻²)	Biomasse (p. vivant) (g·m ⁻²)	Production (p. vivant) (g·m ⁻² ·an ⁻¹)	Ratio P/B	Fécondité cumulée (nb. larves·m ⁻²)
(A) Variables toxicologiques					
[Cd ²⁺] (nM)	- 0,79	- 0,68	- 0,78	- 0,52	- 0,68
[Cd-HPM] (nM·g ⁻¹ p. sec)	- 0,81	- 0,68	- 0,79	- 0,58	- 0,67
(B) Facteurs du milieu contrôlés					
pH	0,74	0,65	0,69	0,27	0,69
Ca (mg·L ⁻¹)	0,27	0,21	0,25	0,20	0,31
Chl <i>a</i> (µg·L ⁻¹)	0,44	0,54	0,52	- 0,03	0,63
C Sest. (mg C·L ⁻¹)	- 0,15	0,01	0,00	- 0,02	- 0,06
N Sest. (mg N·L ⁻¹)	- 0,40	- 0,27	- 0,26	0,01	- 0,30
(C) Facteurs du milieu non contrôlés					
Chaleur accumulée (degrés-jours)	0,86	0,80	0,87	0,40	0,75
Nombre d'espèces de poissons hôtes	0,26	0,28	0,35	0,36	0,38
Abondance des poissons hôtes	0,28	0,14	0,25	0,50	- 0,02

* Relations (r de Pearson sur les données transformées : log-log ou racine carrée) entre les variables des populations (densité et biomasse, production et ratio P/B, fécondité cumulée) et (A) le niveau de contamination du milieu (Cd²⁺) et la concentration du biomarqueur potentiel (Cd-HTM dans le cytosol des branchies) chez le bivalve *Pygospio grandis*, et (B) les facteurs du milieu dont les effets confondants ont été minimisés en 1998 par la procédure de sélection des lacs (pH, Ca, Chl. *a*, C Sest, N Sest), et ceux qui n'ont pas pu être contrôlés (chaleur accumulée dans la zone littorale, abondance et nombre d'espèces de poissons hôtes).

pH (positif) est difficile à dissocier de l'effet du gradient de contamination en cadmium puisque le pH est utilisé pour estimer les concentrations de l'ion libre Cd^{2+} (Tessier *et al.*, 1993) et qu'à faible pH, la concentration ambiante en Cd^{2+} augmente. La quantité d'algues en suspension a par contre un effet positif sur la fécondité cumulée des populations dans certains lacs (Dufay, Évain, Joannès) où les concentrations de Chl. *a* sont supérieures ou égales à $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Cependant, la fécondité est faible au lac Héva, qui a des niveaux de Chl. *a* similaire (tableaux 2.5 et 2.6).

Cette étude indique qu'en dépit de la sélection des lacs visant à diminuer les effets des facteurs confondants, il est encore très difficile de démontrer l'existence de relation dose-réponse entre l'état des populations et des biomarqueurs potentiels de la contamination des organismes (MT et Cd-HPM). En milieu naturel, les facteurs écologiques sont très complexes et difficiles à contrôler a priori et ils ont souvent une influence primordiale sur l'état des populations, ce qui masque et confond les relations avec les métaux traces.

3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

À partir de cette étude de cas en région minière réalisée de 1996 à 1999, il apparaît que la métallothionéine (MT) est effectivement un excellent biomarqueur d'exposition et de contamination chez les invertébrés d'eau douce (moules et larves d'insectes), comme cela a été montré pour les invertébrés marins (Langston *et al.*, 1998). Notre étude souligne l'importance de tenir compte des effets confondants liés aux caractéristiques chimiques de l'eau, en particulier de la concentration de calcium dissous en milieu alcalin pour les bivalves et des ions hydrogènes en milieu acide pour les larves d'insectes, pour bien définir les réponses cellulaires (Cd et MT dans le cytosol) des organismes en fonction du gradient de contamination en Cd^{2+} (Perceval *et al.*, 2002; Couillard *et al.*, 2003).

Notre étude de cas, réalisée dans des lacs où les concentrations ambiantes de Cd^{2+} étaient inférieures à 1 nM, ne démontre pas de perturbation dans la répartition subcellulaire du Cd, alors que de telles perturbations étaient évidentes antérieurement (1994) dans les lacs les plus contaminés, avec des concentrations ambiantes en Cd^{2+} de 2 nM (Wang *et al.*, 1999). L'étude actuelle montre plutôt un accroissement proportionnel des différentes formes de Cd liés à la MT ou aux ligands HPM et FPM le long du gradient de contamination en Cd ($< 1 \text{ nM}$), et ce même dans les lacs faiblement contaminés. Notre étude fait ressortir l'importance de déterminer la répartition intracellulaire du Cd entre les ligands cytosoliques pour mieux définir les effets toxiques au niveau des organismes et des populations.

Les résultats obtenus au niveau de la toxicité cellulaire dans le cadre de notre étude de cas, ainsi que les travaux précédents de Wang *et al.* (1999) et de Couillard *et al.* (1995a,b), fournissent une certaine somme d'éléments appuyant le potentiel de la MT et de la répartition subcellulaire du Cd entre les ligands intracellulaires comme biomarqueurs prédictifs du risque toxicologique au niveau cellulaire et de l'état de santé des individus. Notre étude de cas a permis de lier l'accumulation de Cd dans le cytosol des branchies des bivalves à un stress oxydant au niveau des membranes cellulaires, sans toutefois démontrer de lien direct avec la production de MT ou des formes de Cd liées aux ligands intracellulaires. La réponse toxicologique au niveau cellulaire apparaissait plus importante au début des années 1990, lorsque le niveau de contamination des lacs était plus élevé (Wang *et al.*, 1999). On observait alors une diminution de la masse sèche des branchies associée à une nécrose et l'accroissement du Cd lié aux ligands de faible poids moléculaire (Cd-FPM) chez les bivalves des lacs les plus contaminés ($\text{Cd}^{2+} > 1 \text{ nM}$). L'association entre un tel dommage et la pression de contamination d'un métal trace exercée au niveau individuel peut quelquefois être une des données déterminantes d'une évaluation de risque écotoxicologique au niveau d'un site (Beyer et Audet, 2002).

Il semble cependant difficile dans le cadre de cette étude de cas d'assigner à la MT ou à d'autres biomarqueurs potentiels, comme le Cd associé aux ligands de haut poids moléculaire (Cd-HPM) ou de faible poids moléculaire (Cd-FPM), un rôle prédictif d'effets écotoxicologiques sur l'état des populations de bivalves. Notre étude de cas montre un lien apparent entre le mauvais état de santé des populations de bivalves dans les lacs les plus contaminés et la contamination en Cd^{2+} dans le milieu, et l'augmentation de Cd lié aux ligands de haut poids moléculaire (Cd-HPM). Ceci pourrait indiquer que la répartition du Cd entre les ligands intracellulaires offre un potentiel de diagnostic des effets néfastes au niveau des populations. Toutefois, bien que nous ayons minimisé a priori la variabilité des facteurs écologiques dans le cadre de notre étude, les relations négatives observées entre certaines variables de population (abondance, production, ratio P/B et fécondité cumulée) et soit le niveau d'exposition (Cd^{2+}), soit un biomarqueur potentiel (Cd-HPM), semblent indirectement reliées à une relation inverse entre la chaleur accumulée dans la zone littorale des lacs et le niveau de contamination des lacs. Il n'a donc pas été possible de mettre en évidence un lien direct entre le biomarqueur MT et les réponses des populations.

Les réponses atténuées observées en 1998 par rapport au début de la décennie 1990 peuvent s'expliquer par le contexte environnemental changeant de la région de Rouyn-Noranda au cours des 10-15 dernières années.

La détection au début de la décennie 1990 d'un fort gradient environnemental en métaux traces dans les lacs de la région minière de Rouyn-Noranda, ainsi que la présence de populations de bivalves dans la majorité de ces lacs, fournissait un cadre très approprié pour tester le biomarqueur MT en milieu naturel. Avec les efforts de mitigation consentis par les entreprises minières de la région, ce gradient environnemental de contamination s'est beaucoup atténué au cours de la décennie et n'a probablement pas fourni les conditions optimales pour réaliser la présente évaluation. Dans les présentes conditions, on peut s'attendre à ce que la pression de contamination exercée par le Cd décroisse en influence et que les facteurs écologiques gagnent en importance comme éléments structurants des populations de bivalves des lacs de la région. Dès lors, les biomarqueurs MT et subcellulaires ne sauraient refléter adéquatement les réponses numériques des populations de bivalves au changement de leur milieu ambiant.

Notre étude de cas soutient le constat fait par Lagadic *et al.* (1997c) sur la signification écotoxicologique des biomarqueurs. Même si les bases conceptuelles et scientifiques de l'utilisation de biomarqueurs tels que la MT sont bien établies pour l'évaluation diagnostique et prédictive des effets du cadmium au niveau cellulaire chez les invertébrés marins et d'eau douce, le manque de connaissances sur les effets confondants des facteurs écologiques en milieu naturel limite beaucoup la signification écotoxicologique de la MT comme biomarqueur d'effets toxiques au niveau des populations et des communautés. Dans un même souffle, les présents travaux fournissent des indications précieuses du cadre écotoxicologique intégré dans lequel fonctionneront le mieux les biomarqueurs et/ou approches diagnostiques générales (Environnement Canada, 2002) en regard d'une problématique de contamination par les métaux traces en région minière.

RÉFÉRENCES

- ADAMS, S.M., J.P. GIESY, L.A. TREMBLAY et C.T. EASON (2001). « The use of biomarkers in ecological risk assessment : Recommendations from the Christchurch conference on Biomarkers in Ecotoxicology », *Biomarkers*, vol. 6, p. 1-6.
- ADAMS, S.M., M.S. GREELEY et M.G. RYON (2000). « Evaluating effects of contaminants on fish health at multiple levels of biological organization : Extrapolating from lower to higher levels », *Human and Ecological Risk Assessment*, vol. 6, n° 1, p. 15-27.
- AMIART-TRIQUET, C., S. ALTMANN, J.-C. AMIARD, C. BALLAN-DUFRAŒAIS, P. BAUMARD, H. BUDZINSKI, C. CROUZET, P. GARRIGUES, E. HIS, A.Y. JEANTET, R. MENASRIA, P. MORA, C. MOUNEYRAC, J.F. NARBONNE et J.F. PAVILLON (1998). « Fate and effects of micropollutants in the Gironde estuary, France : A multidisciplinary approach », *Hydrobiologia*, vol. 373/374, p. 259-279.
- AMYOT, M., B. PINEL-ALLOUL et P.G.C. CAMPBELL (1994). « Abiotic and seasonal factors influencing trace metal levels (Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn) in the freshwater amphipod *Gammarus fasciatus* in two fluvial lakes of the St. Lawrence river », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 51, p. 2003-2016.
- ANDRÉS, S., M. BAUDRIMONT, Y. LAPAQUELLERIE, F. RIBEYRE, N. MAILLET, C. LATOUCHE et A. BOUDOU (1999). « Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France) : I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 18, p. 2462-2471.
- BAUDRIMONT, M., S. ANDRÉS, J. MÉTIVAUD, Y. LAPAQUELLERIE, F. RIBEYRE, N. MAILLET, C. LATOUCHE et A. BOUDOU (1999). « Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France) : II. Metallothionein response to metal exposure », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 18, p. 2472-2477.
- BEBIANNO, M.J. et W.J. LANGSTON (1995). « Induction of metallothionein synthesis in the gill and kidney of *Litorina littorea* exposed to cadmium », *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, vol. 75, p. 173-186.
- BEBIANNO, M.J. et M.A. SERAFIM (1998). « Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus* », *The Science of the Total Environment*, vol. 214, p. 123-131.
- BERVOETS, L. et R. BLUST (1999). « Bioavailability of cadmium and zinc to midge larvae under natural and experimental conditions : Effects of some environmental factors », *Belgian Journal of Zoology*, vol. 129, n° 1, p. 269-284.
- BEYER, W.N. et D. AUDET (2002). « Moving from the individual to the population level in environmental risk assessments », *SETAC Globe*, vol. 3, p. 28-29.
- CAIRNS, J., Jr. et P.V. MCCORMICK. (1992). « Developing an ecosystem-based capability for ecological risk assessments », *The Environmental Professional*, vol. 14, p. 186-196.
- CAJARAVILLE, M.P., M.J. BEBIANO, J. BLASCO, C. PORTE, C. SARASQUETE et A. VIARENGO (2000). « The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula : A practical approach », *The Science of the Total Environment*, vol. 247, p. 295-311.
- CAMPBELL, P.G.C. (1995). « Interactions between trace metals and organisms : Critique of the free-ion activity model », dans A. Tessier et D. Turner (dir.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, Chichester, J. Wiley and Sons, p. 45-102.
- CAMPBELL, P.G.C. et Y. COUILLARD (2003). « Prise en charge et détoxication des métaux chez les organismes aquatiques », dans E. Pelletier, P.G.C. Campbell et F. Denizeau (dir.), *Écotoxicologie moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développement*. Sainte-Foy, Presses de l'Université du Québec, p. 9-61.
- CAMPBELL, P.G.C., J.N. GALLOWAY et P. STOKES (1985). *Acid Deposition - Effects on Geochemical Cycling and Biological Availability of Trace Elements*, Washington, National Academy Press, 83 p.

- CARLBERG, I. et B. MANNÉRIK (1985). « Glutathione reductase », *Methods in Enzymology*, vol. 113, p. 484-490.
- CENTRE NATIONAL DE RECHERCHES DU CANADA (CNRC) (1985). *The Role of Biochemical Indicators in the Assessment of Aquatic Ecosystem Health – Their Development and Validation*, Ottawa, CNRC, publication 24371, 119 p.
- CHAPMAN, P.M. (2002). « Integrating toxicology and ecology: Putting the “eco” into ecotoxicology », *Marine Pollution Bulletin*, vol. 44, p. 7-15.
- CHAPMAN, P.M., F. WANG, C. JANSSEN, G. PERSOONE et H.E. ALLEN. (1998). « Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: Binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 55, p. 2221-2243.
- CLARKE, A.H. (1981). *The freshwater molluscs of Canada*, Ottawa, National Museum of Natural Sciences, National Museums of Canada.
- CLEMENTS, W.H. et P.M. KIFFNEY (1994). « Assessing contaminant effects at higher levels of biological organization », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 13, n° 3, p. 357-359.
- COCHRAN, W.G. (1977). *Sampling techniques*, 3^e éd., Chichester, John Wiley and Sons, 428 p.
- COSSON, R.P. et J.C. AMIARD (2000). « Use of metallothioneins as biomarkers of exposure to metals », dans L. Lagadic *et al.* (dir.), *Use of Biomarkers for Environmental Quality Assessment*, Enfield, NH, Science Publishers, p. 79-112.
- COSSU, C., A. DOYOTTE, M. BABUT, A. EXINGER et P. VASSEUR (2000). « Antioxydant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 45, p. 106-121.
- COUILLARD, Y. (avec la collaboration de L. St-Cyr) (1997). *Évaluation technique de la métallothionéine comme biomarqueur en vue de son utilisation par l'industrie minière*. Programme d'évaluation des techniques de mesure d'impacts en milieu aquatique (ETIMA), Projet ETIMA 2.2.1., préparé pour Ressources naturelles Canada, CANMET. 191 p.
- COUILLARD, Y., P.G.C. CAMPBELL et A. TESSIER (1993). « Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient », *Limnology and Oceanography*, vol. 38, p. 299-313.
- COUILLARD, Y., P.G.C. CAMPBELL, A. TESSIER, J. PELLERIN-MASSICOTTE et J.C. AUCLAIR (1995a). « Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. I. Temporal changes in metallothionein and metal (Cd, Cu, and Zn) concentrations in soft tissues », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 52, p. 690-702.
- COUILLARD, Y., P.G.C. CAMPBELL, J. PELLERIN-MASSICOTTE et J.C. AUCLAIR. (1995b). « Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. II. Metallothionein response to Cd and Zn exposure, evidence of cytotoxicity, and links to effects at higher levels of biological organisation », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 52, p. 703-715.
- COUILLARD, Y., A. GIGUÈRE, P.G.C. CAMPBELL, B. PINEL-ALLOUL et L. HARE (2003). « Relating cadmium and metallothionein concentrations in freshwater invertebrates to ambient cadmium concentrations in their natural environments », *Journal of Aquatic Ecosystem Health* (en préparation).
- CRAIG, A., L. HARE et A. TESSIER (1999). « Experimental evidence for cadmium uptake via calcium channels in the aquatic insect *Chironomus staegeri* », *Aquatic Toxicology*, vol. 44, p. 255-262.
- CROTEAU, M.-N., L. HARE, P.G.C. CAMPBELL et Y. COUILLARD (2002). « Metallothionein like metal-binding proteins in the biomonitor *Chaoborus*: Occurrence and relationship to ambient metal concentrations in lakes », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 21, p. 737-741.

- CROTEAU, M.-N., L. HARE, et A. TESSIER. (2002). « Influence of temperature on Cd accumulation by species of the biomonitor *Chaoborus* », *Limnology and Oceanography*, vol. 47, n° 2, p. 505-514.
- CROTEAU, M.-N., L. HARE et A. TESSIER (1998). « Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lakes », *Environmental Science and Technology*, vol. 32, p. 1348-1353.
- CURRIE, R.S., D.C.G. MUIR, W.L. FAIRCHILD, M.H. HOLOKA et R.E. HECKY (1998). « Influence of nutrient additions on cadmium bioaccumulation by aquatic invertebrates in littoral enclosures », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 17, n° 12, p. 2435-2443.
- DEN BESTEN, P.J. (1998). « Concepts for the implementation of biomarkers in environmental monitoring », *Marine Environmental Research*, vol. 46, n°s 1-5, p. 253-256.
- DEPLEDGE, M.H. et M.C. FOSSI (1994). « The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates », *Ecotoxicology*, vol. 3, p. 161-172.
- DI TORO, D.M., H.E. ALLEN, H.L. BERGMAN, J.S. MEYER, P.R. PAQUIN et R.C. SANTORE (2001). « Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 20, p. 2383-2396.
- DOWNING, J.A. et W.L. DOWNING (1992). « Spatial aggregation, precision, and power in surveys of freshwater mussel populations », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 49, p. 985-991.
- DUTTON, M.D., M. STEPHENSON et J.F. KLAVERKAMP, (1993). « A mercury saturation assay for measuring metallothionein in fish », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 12, p.1193-1202.
- ENGEL, D.W. et D.S. VAUGHAN (1996). « Biomarkers, natural variability, and risk assessment : Can they coexist ? », *Human and Ecological Risk Assessment*, vol. 2, p. 257-262.
- EVANS, R.D et D.C. LASENBY (1993). « Bioconcentration of cadmium in aquatic invertebrates : Geochemical, physiological and behavioural influences », *Water Pollution Research Journal of Canada*, vol. 28, p 237-251.
- ENVIRONNEMENT CANADA (2002). *Guide pour l'étude du suivi des effets sur l'environnement aquatique par les mines de métaux*. Chapitre 5 : Étude de la communauté d'invertébrés benthiques. Ottawa, Environnement Canada.
- ENVIRONNEMENT CANADA et SANTÉ CANADA (1994). *Canadian Environmental Protection Act Priority Substances List Assessment Report : Cadmium and Its Compounds*. Ottawa, Environnement Canada et Santé Canada.
- FRINGS, C.S., T.W. FENDLEY, R.T. DUNN et C.A. QUEEN (1972). « Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phosphovanillin reaction », *Clinical Chemistry*, vol. 18, p. 673-674.
- GAGNÉ, F., C. BLAISE, I. AOYAMA, R. LUO, C. GAGNON, Y. COUILLARD, P.G.C. CAMPBELL et M. SALAZAR. (2002). « Biomarker study of a municipality effluent plume in two species of freshwater mussels », *Environmental Toxicology*, vol. 17, p. 149-159.
- GARRETT, R.G. (2000). « Natural sources of metals to the environment », *Human and Ecological Risk Assessment*, vol. 6, p. 945-963.
- GIGUÈRE, A., Y. COUILLARD, P.G.C. CAMPBELL, O. PERCEVAL, L. HARE, B. PINEL-ALLOUL et J. PELLERIN. (2003). « Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient », *Aquatic Toxicology*, vol. 64, n° 2, p 185-200.
- GROULX, G.R. et D.C. LASENBY (1992). « Temporal and spatial variation in the amount of cadmium in the phantom midge larvae (*Chaoborus* spp.) », *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 23, p. 370-374.
- HANSON, J.M., W.C. MACKAY et E.E. PREPAS (1989). « Effect of size-selective predation by muskrats (*Ondatra zibethicus*) on a population of unionid clams (*Anodonta grandis simpsoniana*) », *Journal of Animal Ecology*, vol. 58, p. 15-28.
- HANSON, J.M., W.C. MACKAY et E.E. PREPAS (1988). « Population size, growth, and production of a unionid clam, *Anodonta grandis simpsoniana*, in a small, deep Boreal forest lake in central Alberta », *Canadian Journal of Zoology*, vol. 66, p. 247-253.

- HARE, L. (1992). « Aquatic insects and trace metals : Bioavailability, bioaccumulation, and toxicity », *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 22, p. 327-369.
- HARE, L. et A. TESSIER (1998). « The aquatic insect *Chaoborus* as a biomonitor of trace metals in lakes », *Limnology and Oceanography*, vol. 43, p. 1850-1859.
- HARE, L. et A. TESSIER (1996). « Predicting animal cadmium concentrations in lakes », *Nature*, vol. 380, p. 430-432.
- HINCH, S.G., R.C. BAILEY et R.H. GREEN (1986). « Growth of *Lampsilis radiata* (Bivalvia : Unionidae) in sand and mud : A reciprocal transplant experiment », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 43, p. 548-552.
- HUEBNER, J.D. (1980). « Seasonal variation in two species of unionid clams from Manitoba, Canada : Biomass », *Canadian Journal of Zoology*, vol. 58, p. 1980-1983.
- HUEBNER, J.D., D.F. MALLEY et K. DONKERSLOOT (1990). « Population ecology of the freshwater mussel *Anodonta grandis grandis* in a Precambrian Shield lake », *Canadian Journal of Zoology*, vol. 68, p. 1931-1941.
- HUGGETT, R.J., R.A. KIMERLE, P.A. MEHRLE et H.L. BERGMAN (dir.) (1992). *Biomarkers—Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*, SETAC Special Publications Series, Chelsea, MI, Lewis Publishers.
- JENKINS, K.D. et A.Z. MASON (1988). « Relationships between subcellular distributions of cadmium and perturbations in reproduction in the polychaete *Neanthes arenaceodentata* », *Aquatic Toxicity*, vol. 12, p. 229-244.
- JENKINS, K.D. et B.M. SANDERS (1986). « Relationships between free cadmium ion activity in seawater, cadmium accumulation and subcellular distribution, and growth in polychaetes », *Environmental Health Perspectives*, vol. 65, p. 205-210.
- JENSEN, A., V.E. FORBES et E.D. PARKER JR. (2001). « Variation in cadmium uptake, feeding rate, and life-history effects in the gastropod *Potamogyrus antipodarum*: Linking toxicant effect on individuals to the population level », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 20, n° 11, p. 2503-2513.
- KALHOK, S. et H. CYR. (1997). *Does Metallothionein Concentration in a Freshwater Mussel Vary with Its Size, Age, and Condition?* Poster presentation, Society of Canadian Limnologists (SCL), Ottawa, janvier.
- KIMBALL, K.D. et S.A. LEVIN. (1985). « Limitations of laboratory bioassays : The need for ecosystem-level testing », *Bioscience*, vol. 35, p. 165-171.
- KLAVERKAMP, J.F., H.S. DUTTON, R.V. MAJEWSKI, R.V. HUNT et L.J. WESSON. (1991). « Evaluating the effectiveness of metal pollution controls in a smelter by using metallothionein and other biological responses in fish », dans M.C. Newman et A.W. McIntosh (dir.), *Metal Ecotoxicology: Concepts and Application*, Chelsea, MI, Lewis Publishers, p. 33-64.
- LAFLAMME, J.-S., Y. COUILLARD, P.G.C. CAMPBELL et A. HONTELA (2000). « Interrenal metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu, and Zn exposure in yellow perch, *Perca flavescens*, from Abitibi lakes », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 57, p. 1692-1700.
- LAGADIC, L., T. CAQUET et F. RAMADE (1994). « The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities », *Ecotoxicology*, vol. 3, p. 193-208.
- LAGADIC, L., T. CAQUET et J.-C. AMIARD (1997a). « Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions », dans L. Lagadic, T. Caquet, J.-C. Amiard et F. Ramade (dir.), *Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux*, Paris, Masson, p. 1-9.
- LAGADIC, L., T. CAQUET et J.-C. AMIARD (1997b). « Intérêt d'une approche multiparamétrique pour le suivi de la qualité de l'environnement », dans L. Lagadic, T. Caquet, J.-C. Amiard et F. Ramade (dir.), *Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux*, Paris, Masson, p. 393-401.
- LAGADIC, L., T. CAQUET, J.-C. AMIARD et F. RAMADE (dir.) (1997c). *Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux*, Paris, Masson.

- LANGSTON, W.J., M.J. BEBIANNO et G.R. BURT (1998). « Metal handling strategies in molluscs », dans W.J. Langston et M.J. Bebianno (dir.), *Metal Metabolism in Aquatic Environments*, Londres, Chapman and Hall, p. 219-283.
- LANGSTON, W.J. et S.K. SPENCE (1995). « Biological factors involved in metal concentrations observed in aquatic organisms », dans A. Tessier et D. Turner (dir.), *Trace Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, Chichester, John Wiley and Sons, p. 407-478.
- LAWRENCE, R.A. et R.F. BURK (1976). « Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 71, p. 952-958.
- LAWRENCE, S.G., M.H. HOLOKA, R.V.C. HUNT et R.H. HESSLEIN (1996). « Multi-year experimental additions of cadmium to a lake epilimnion and resulting water column cadmium concentrations », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 53, p. 1876-1887.
- LEGENDRE, P. et L. LEGENDRE (1998). *Numerical Ecology*, 2^e éd., Amsterdam, Elsevier.
- LEWIS, J.B. (1985). « Breeding cycle of the freshwater mussel *Anodonta grandis* Say », *Canadian Journal of Zoology*, vol. 63, p. 2477-2478.
- LUOMA, S.N. (1995). « Prediction of metal toxicity in nature from bioassays: Limitations and research needs », dans A. Tessier et D.R. Turner (dir.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, Chichester, John Wiley and Sons, p. 609-659.
- MALLEY, D.F. (1996). « Cadmium whole-lake experiment at the Experimental Lakes Area: An anachronism ? », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 53, p. 1862-1870.
- MALLEY, D.F., J.F. KLAVERKAMP, S.B. BROWN et P.S.S. CHANG (1993). « Increase in metallothionein in freshwater mussels *Anodonta grandis grandis* exposed to cadmium in the laboratory and the field », *Water Pollution Research Journal of Canada*, vol. 28, p. 253-273.
- MCCARTY, L.S. et K.R. MUNKITTRICK (1996). « Environmental biomarkers in aquatic toxicology: Fiction, fantasy, or functional ? », *Human and Ecological Risk Assessment*, vol. 2, p. 268-274.
- MCCARTY, L.S., M. POWER et K.R. MUNKITTRICK (2002). « Bioindicators versus biomarkers in ecological risk assessment », *Human and Ecological Risk Assessment*, vol. 8, n° 1, p. 159-164.
- MCCUAIG, J.M. et R.H. GREEN (1983). « Unionid growth curves derived from annual rings: A baseline model for Long Point Bay, Lake Erie », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 40, p. 436-442.
- MCGREER, E.R. (1982). « Factors affecting the distribution of the bivalve *Macoma balthica* (L.) on a mudflat receiving sewage effluent, Fraser River Estuary, British Columbia », *Marine Environmental Research*, vol. 7, p. 131-149.
- METCALFE-SMITH, J.L. (1994). « Influence of species and sex on metal residues in freshwater mussels (Family Unionidae) from the St. Lawrence River, with implications for biomonitoring programs », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 13, p. 1433-1443.
- METCALFE-SMITH, J.L., R.H. GREEN et L.C. GRAPENTINE (1995). « Influence of biological factors on concentrations of metals in the tissues of freshwater mussels (*Elliptio complanata* and *Lampsilis radiata radiata*) from the St. Lawrence river », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 53, p. 205-219.
- MORRIS, T.J. et L. CORKUM (1999). « Unionid growth patterns in rivers of different riparian vegetation », *Freshwater Biology*, vol. 42, p. 59-68.
- MOUNEYRAC, C., J.-C. AMIARD et C. AMIARD-TRIQUET (1998). « Effects of natural factors (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc, and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters *Crassostrea gigas* from a polluted estuary », *Marine Ecology Progress Series*, vol. 162, p. 125-135.

- MOUNEYRAC, C., A. GEFFARD, J.-C. AMIARD et C. AMIARD-TRIQUET (2000). « Metallothionein-like proteins in *Macoma balthica*: Effects of metal exposure and natural factors », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 57, p. 34-42.
- MUNKITTRICK, K.R. et L.S. MCCARTY (1995). « An integrated approach to aquatic ecosystem health: Top-down, bottom-up, or middle-out ? », *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, vol. 4, p. 77-90.
- NRIAGU, J.O. et J.M. PACYNA (1988). « Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals », *Nature*, vol. 333, p. 134-139.
- OLSVIK, P.A., K. HINDAR, K.E. ZACHARIASSEN et R.A. ANDERSEN (2001). « Brown trout (*Salmo trutta*) metallothionein as biomarkers for metal exposure in two Norwegian rivers », *Biomarkers*, vol. 6, p. 274-288.
- OSTE, L.A., J. DOLFING, W.-C. MA et T.M. LEXMOND (2001). « Cadmium uptake by earthworms as related to the availability in the soil and the intestine », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 20, n° 8, p. 1785-1791.
- PACYNA, J.M. et E.G. PACYNA (2001). « An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide », *Environmental Review*, vol. 9, p. 269-298.
- PERCEVAL, O., Y. COUILLARD, B. PINEL-ALLOUL, G. MÉTHOT, A. GIGUÈRE, P.G.C. CAMPBELL et L. HARE. (2003). « Cadmium accumulation and metallothionein synthesis in freshwater bivalves (*Pyganodon grandis*): Relation with population responses », *Journal of Aquatic Ecosystem Health* (en préparation).
- PERCEVAL, O., B. PINEL-ALLOUL, G. MÉTHOT, Y. COUILLARD, A. GIGUÈRE, P.G.C. CAMPBELL et L. HARE. (2002). « Cadmium accumulation and metallothionein synthesis in freshwater bivalves (*Pyganodon grandis*): Relative influence of the metal exposure gradient versus limnological variability », *Environmental Pollution*, vol. 118, p. 5-17.
- RINGWOOD, A.H., M.J. HAMEEDI, R.E. LEE, M. BROUWER, E.C. PETERS, G.I. SCOTT, S.N. LUOMA et R.T. DIGIULIO (1999). « Bivalve biomarkers workshop: Overview and discussion group summaries », *Biomarkers*, vol. 4, p. 361-399.
- SCHLENK, D. (1999). « Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments », *Marine Pollution Bulletin*, vol. 39, p. 48-53.
- STEPHENSON, M. et G.L. MACKIE (1988). « Multivariate analysis of correlations between environmental parameters and cadmium concentrations in *Hyalella azteca* (Crustacea, Amphipoda) from central Ontario lakes », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 45, p. 1705-1710.
- STEWART, A.R. (1999). « Accumulation of Cd by a freshwater mussel (*Pyganodon grandis*) is reduced in the presence of Cu, Zn, Pb, and Ni », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 56, p. 467-478.
- SUNDERMAN, F.W., A. MARZOUK, S.M. HOPFER, O. ZAHARIA et M.C. REID (1985). « Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats », *Annals of Clinical and Laboratory Science*, vol. 15, p. 229-236.
- TESSIER, A. (1992). « Sorption of trace elements on natural particles in oxic environments », dans J. Buffle et H.P. van Leeuwen (dir.), *Environmental Particles*, vol. 1, *Environmental, Analytical and Physical Chemistry Series*, Boca Raton, FL, Lewis Publishers, p. 425-453.
- TESSIER, A., J. BUFFLE et P.G.C. CAMPBELL. (1994). « Uptake of trace metals by aquatic organisms », dans J. Buffle et R.R. De Vitre (dir.), *Chemical and Biological Regulation of Aquatic Systems*, Boca Raton, FL, Lewis Publishers, p. 199-232.
- TESSIER, A., Y. COUILLARD, P.G.C. CAMPBELL et J.C. AUCLAIR (1993). « Modelling Cd partitioning in oxic lake sediments and Cd concentrations in the freshwater bivalve *Anodonta grandis* », *Limnology and Oceanography*, vol. 38, p. 1-17.
- TESSIER, A et D. TURNER (dir.) (1995). *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, Chichester, John Wiley and Sons.
- TYRRELL, M. et D.J. HORNBAACH. (1998). « Selective predation by muskrats on freshwater mussels in 2 Minnesota rivers », *Journal of the North American Benthological Society*, vol. 17, p. 301-310.

- VAN GESTEL, C.A.M. et T.C. VAN BRUMMELEN (1996). « Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology : Calls for a redefinition of terms », *Ecotoxicology*, vol. 5, p. 217-225.
- VIARENGO, A., L. CANESI, M. PERTICA, G. POLI, M.N. MOORE et M. ORUNESCU (1990). « Heavy metals effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* », *Lam. Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 97, pp 37-42.
- WANG, D., Y. COUILLARD, P.G.C. CAMPBELL et P. JOLICŒUR (1999). « Changes in subcellular metal partitioning in the gills of freshwater bivalves (*Pyganodon grandis*) living along an environmental cadmium gradient », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 56, p. 774-784.
- WANG, Y. et R. D. EVANS (1993). « Influence of calcium concentrations on cadmium uptake by the freshwater mussel *Elliptio complanata* », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 50, p. 2591-2596.
- WATTERS, G.T. (1994). *An Annotated Bibliography of the Reproduction and Propagation of the Unionoidea (Primarily of North America)*, Columbus, Ohio Biological Survey Miscellaneous Contributions Number 1, 142 p.
- YEATS, P.A. et J.M. BEWERS (1987). « Evidence for anthropogenic modification of global transport of cadmium », dans J.O. Nriagu et J.B. Sprague (dir.), *Cadmium in the Aquatic Environment*, New York, John Wiley and Sons, p. 19-34.
- YOUNG, L.J. et J.H. YOUNG (1998). *Statistical Ecology : A Population Perspective*, Boston, Kluwer Academic Press.

CHAPITRE

3

LA DÉPOLLUTION DES POP

**Les nouveaux outils de la biologie moléculaire
à la rescousse des biotechnologies
environnementales**

MICHEL SYLVESTRE

INRS-Institut Armand-Frappier

DIANE BARRIAULT

INRS-Institut Armand-Frappier

MARIE-MICHÈLE PLANTE

INRS-Institut Armand-Frappier

CATHERINE SIMARD

INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Les composés organiques d'origine naturelle ne s'accumulent pas dans la biosphère, car les micro-organismes peuvent les dégrader efficacement. Cependant, l'accumulation de composés toxiques comme les BPC, les HAP, les dioxines, etc. dans les tissus d'organismes vivants indiquent que certains polluants ne sont pas minéralisés efficacement dans l'environnement. Cette persistance diffuse est due à l'absence de voies cataboliques microbiennes efficaces pour dégrader ces polluants. Du fait que ces composés apparus avec l'ère industrielle soient récents, les micro-organismes n'ont pas encore appris à les dégrader. Ces composés organiques persistants (POP) représentent un problème majeur pour l'environnement.

L'utilisation de procédés de dégradation microbienne des POP nécessitera une intervention humaine d'abord pour accélérer le processus évolutif conduisant au développement de voies cataboliques efficaces. Les stratégies de développement de ces voies de dégradation nécessitent une bonne compréhension des mécanismes biochimiques et génétiques régissant ces dégradations. Nous décrirons l'exemple des travaux visant à élucider la voie catabolique des biphenyles polychlorés (BPC) et à augmenter leur potentiel catabolique envers ces composés.

Les bactéries dégradent les BPC par la voie métabolique du biphenyle. Cette voie comprend quatre étapes enzymatiques qui les transforment en chlorobenzoates correspondants. Les chlorobenzoates sont ensuite minéralisés par une autre voie métabolique. Dans l'ordre, les BPC sont d'abord hydroxylés sur deux atomes de carbone *ortho-meta* adjacents, par la dioxygénase du biphenyle ; le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyle produit est ensuite réaromatisé par une déshydrogénase ; le catéchol qui en résulte est scindé par une dioxygénase en acide 2-hydroxy-6-oxo-6-phénylhexa-2,4-diénoïque qui est hydrolysé pour former l'acide benzoïque. Les enzymes de cette voie catabolique ont été isolées et caractérisées afin d'identifier leurs limites cataboliques. La biologie moléculaire a fourni des outils indispensables pour accélérer notre compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la dégradation des BPC. Le spectre de congénères BPC dégradés par les différentes bactéries est en grande partie déterminé par la spécificité de la première enzyme de la voie, mais les autres enzymes imposent aussi des restrictions au spectre de BPC qui peuvent être dégradés. Dans ce document, nous résumerons nos connaissances actuelles des paramètres biochimiques des quatre enzymes du tronçon catabolique requis pour la conversion de BPC en chlorobenzoates. Une emphase particulière sera donnée aux paramètres qui influencent leurs interactions avec les congénères BPC ainsi qu'aux moyens à notre disposition pour augmenter leur potentiel catabolique. Dans ce contexte, nous décrirons nos travaux qui visaient à mieux connaître les paramètres cinétiques de la dioxygénase du biphenyle ainsi qu'à développer des variants plus performants de cette enzyme par ingénierie génétique. Un outil important qui a été développé récemment est l'évolution moléculaire *in vitro*. Nous avons fait appel à cet outil pour développer des dioxygénases du biphenyle et les résultats rapportés indiquent que cette approche est très prometteuse. Enfin, nous discuterons des problèmes associés à l'utilisation des organismes modifiés génétiquement dans les procédés de décontamination et des solutions que nous offre la biologie moléculaire pour rendre ces procédés plus sécuritaires.

1. INTRODUCTION

Plusieurs procédés de dépollution basés sur la participation active des micro-organismes ont été mis au point au cours des dix dernières années. Ces procédés sont efficaces pour réhabiliter les sites contaminés par des polluants labiles. Cependant, certains polluants comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ou les biphényles polychlorés (BPC) résistent à la dégradation microbienne, rendant difficile l'application de ces biotechnologies environnementales. Ces polluants organiques persistants (POP) s'accumulent dans la chaîne alimentaire et présentent un danger pour les écosystèmes. La dégradation des POP est un processus complexe qui nécessite l'apport d'enzymes microbiennes spécialisées, dont la dioxygénase du biphenyle. L'incapacité de ces enzymes à dégrader efficacement certains polluants est en grande partie responsable de la persistance de ces polluants. Le chapitre sera consacré à décrire comment les plus récents développements de la biologie moléculaire peuvent servir à mieux comprendre l'écologie microbienne des procédés de dépollution et faciliter le développement de nouvelles approches d'intervention biotechnologique pour dépolluer les POP. Nous verrons entre autres comment ces outils moléculaires ont facilité les investigations visant à mieux comprendre les mécanismes réactionnels responsables de la transformation biologique des polluants et visant à élaborer des stratégies faisant appel à des approches rationnelles et aléatoires, pour développer des procédés biotechnologiques efficaces de destruction de ces polluants.

2. BIODISPOSITION DES COMPOSÉS XÉNOBIOTIQUES PAR LES BACTÉRIES DE L'ENVIRONNEMENT

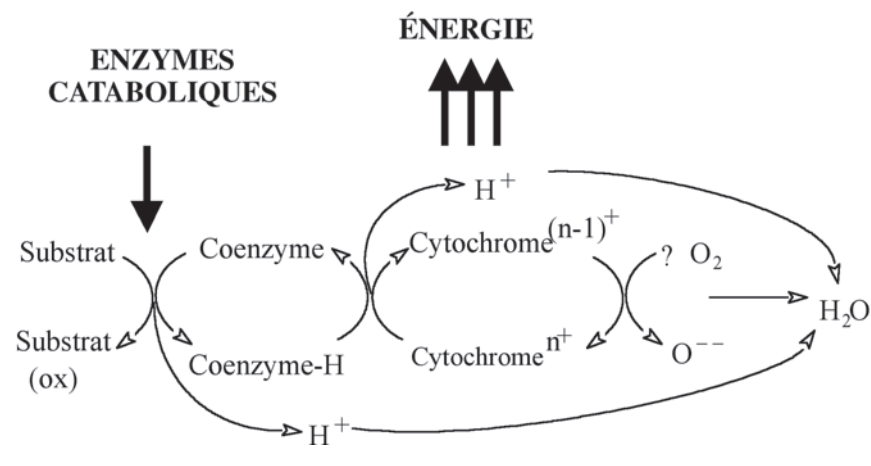
Les micro-organismes du sol et des environnements aquatiques sont les principaux agents responsables de la minéralisation de la matière organique. Ce processus sert à régénérer les éléments essentiels à la reconstitution de la biosphère. En réalité, la biosphère compte un nombre incommensurable de composés organiques dont la majorité reste à identifier. Par exemple, on estime que 1 g de sol contiendrait au moins 100 000 composés divers dont on ignore encore la structure. De nouveaux composés apparaissent alors que d'autres disparaissent de la biosphère, suivant la dynamique de l'évolution des espèces. De façon générale, les composés d'origine naturelle ne s'accumulent pas dans la biosphère à cause de la capacité des micro-organismes à développer des voies biochimiques efficaces pour leur dégradation (McClure *et al.*, 1991 ; Liu et Suflita, 1993).

Déjà au début du XX^e siècle, les microbiologistes reconnaissaient que les bactéries ont le potentiel de dégrader la majorité des composés organiques rejetés dans l'environnement. Cependant, plusieurs facteurs environnementaux affectent la capacité des micro-organismes à dégrader les xénobiotiques, entraînant leur persistance. Ainsi plusieurs activités humaines conduisent à l'accumulation de composés organiques d'origine synthétique ou naturelle dans les écosystèmes qui nous entourent, causant des foyers de pollution.

2.1. CAPACITÉ DES MICRO-ORGANISMES À DÉGRADER LES XÉNOBIOTIQUES

Rappelons que le métabolisme des micro-organismes prototrophiques requiert la présence d'un composé organique servant de donneur d'électrons et de source de carbone pour fabriquer les constituants cellulaires. Les électrons libérés au cours du processus d'oxydation de substrat organique sont ensuite transférés le long d'une chaîne de transporteurs d'électrons jusqu'à un accepteur final qui, pour les organismes aérobies, est l'oxygène (figure 3.1 ; voir aussi planche 1). En conditions anoxiques, l'accepteur d'électrons peut être le fer, le cuivre, le nitrate, le sulfate, le dioxyde de carbone, etc. ou un autre composé organique. Outre le carbone, la synthèse des constituants cellulaires nécessite plusieurs autres composés, dont l'azote, le phosphore, le fer, le magnésium, le calcium, le sodium, le soufre et plusieurs autres éléments essentiels à la croissance. Lorsqu'une source de carbone est introduite dans un écosystème microbien, sa dégradation dépend de la présence de ces autres ingrédients en quantité adéquate. Par exemple, lorsqu'une source de carbone facilement assimilable comme un sucre est introduite dans un écosystème, la dégradation sera rapide initialement, mais elle cessera aussitôt qu'un des ingrédients requis pour la croissance sera épuisé. L'azote, le phosphore et l'oxygène sont souvent les ingrédients le plus rapidement épuisés. L'épuisement des ingrédients essentiels à la croissance microbienne est une raison importante expliquant la persistance de composés organiques comme les dérivés du pétrole dans les écosystèmes (Liu et Suflita, 1993).

Le processus d'oxydation des substrats organiques peut aussi générer des métabolites toxiques ou inhibiteurs qui vont restreindre les capacités cataboliques des micro-organismes impliqués dans la dégradation du polluant. Ce phénomène a surtout été observé dans le cas de composés organiques synthétiques comme les chlorobenzoates (Reineke et Knackmuss, 1988) et les BPC à faible teneur en chlore (Sondossi *et al.*, 1992).

Figure 3.1**Métabolisme des organismes prototrophiques aérobies**

La biodisponibilité est un autre paramètre important qui peut contribuer à la persistance d'un composé organique dans l'environnement. Plusieurs phénomènes peuvent influencer la biodisponibilité d'un composé organique. Entre autres, les composés lipophiles ne peuvent pas atteindre facilement les enzymes microbiennes impliquées dans leur dégradation, les enzymes cataboliques étant généralement intracellulaires ou périplasmiques. Plusieurs études montrant l'influence positive des agents tensioactifs synthétiques ou biologiques ont clairement démontré que la solubilité dans l'eau constitue un facteur important influençant la biodégradation des composés organiques (Providenti *et al.*, 1993). Un autre phénomène qui influence la biodisponibilité des composés organiques est la sorption qui résulte de l'interaction du composé organique avec la matrice du sol. Le phénomène de sorption varie considérablement selon la nature du polluant et la composition du sol. Ce phénomène s'accroît avec le temps conduisant à une presque inaccessibilité du polluant après quelques années de persistance dans le sol (Alexander, 2000). L'augmentation de la sorption du polluant en fonction du temps serait due en principe, à la migration graduelle des molécules du polluant à l'intérieur des nanopores des particules de sol. Bien que ce phénomène contribue à la persistance des polluants facilement dégradables comme les hydrocarbures, ce phénomène a un effet bénéfique en étant responsable de la réduction de la charge toxique du sol. En effet, bien que le polluant persiste dans le sol, il n'est pas disponible pour les organismes qui ingèrent les particules de sol (Alexander, 2000).

Un autre facteur important qui contribue à la persistance des polluants dans les sols et sédiments est relié au transport des micro-organismes dans le sol. En effet, pour qu'il y ait dégradation d'un polluant, il est nécessaire que la bactérie entre en contact physique avec le polluant. Les enzymes diffuses dans les sols et les sédiments peuvent participer à la dégradation des polluants (Bollag, 1992). Cependant, on estime que ce rôle est limité du fait que les enzymes sont instables à l'extérieur des cellules et que la plupart des enzymes cataboliques sont intracellulaires et ne sont pas excrétées par les cellules. La diffusion des enzymes résulte de la mort et la lyse des cellules.

Plusieurs facteurs environnementaux et génétiques influencent le déplacement des micro-organismes dans les sols (Murphy et Tate, 1996). Les facteurs affectant le mouvement des micro-organismes dans les sols comprennent, entre autres, la nature et la composition du sol, la teneur en eau, le mouvement de l'eau, la force ionique, la quantité et le comportement de la zooflore du sol (Murphy et Tate, 1996). De plus, des études récentes montrent l'importance de la flore végétale et de son système racinaire sur la croissance et la migration des micro-organismes autant que sur la migration des polluants dans les sols (Salt *et al.*, 1998; Liste et Alexander, 2000). Enfin d'autres études ont démontré que la chimiotaxie peut influencer le déplacement des bactéries vers les polluants (Parales *et al.*, 2000a).

Parmi les autres facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la dégradation des composés organiques polluants, on compte la présence d'autres polluants toxiques comme les métaux lourds ou les phénols sur le site contaminé. En effet la plupart des sites contaminés contiennent un mélange de contaminants; souvent, on y trouve des métaux lourds qui sont toxiques pour les bactéries (Providenti, Lee et Trevors, 1993). Enfin, la concentration du polluant lui-même peut être un facteur limitant sa dégradation. Certains contaminants comme les polychlorophénols sont très toxiques et leur dégradation est impossible lorsque leur concentration est au-dessus du seuil de toxicité. Par contre, certains autres polluants sont présents en concentration trop faible pour soutenir la croissance des bactéries présentes. Les polluants faiblement solubles dans l'eau sont présents en très faible concentration dans la phase aqueuse du sol, résultant en une trop faible concentration disponible pour la croissance des micro-organismes (Alexander, 2000). Cependant, d'autres exemples de composés très solubles dans l'eau peuvent persister dans les sols s'ils sont présents en concentration trop faible (Alexander, 1973).

Outre les facteurs environnementaux, plusieurs facteurs de nature physiologique peuvent influencer la dégradation microbienne des polluants. Entre autres, la présence d'inducteurs appropriés peut grandement

influencer la dégradation des polluants. En effet, les voies cataboliques sont inductibles, c'est-à-dire que les enzymes catalysant la dégradation des polluants sont exprimées en présence d'un inducteur qui est généralement le substrat à dégrader ou l'un de ses métabolites. Ainsi la voie catabolique du biphenyle qui sert à dégrader les BPC à faible teneur en chlore (voir plus bas) ne s'exprime qu'en présence de biphenyle (Barriault et Sylvestre, 1993). Les chlorobiphenyles qui sont incapables d'induire cette voie ne peuvent être dégradés qu'en présence de biphenyle dans le milieu. Un autre phénomène important qui influence la dégradation des polluants est le co-métabolisme. Comme nous l'avons indiqué plus haut, la croissance microbienne nécessite l'apport d'un substrat organique qui sert de source de carbone et d'énergie. Il arrive que les voies cataboliques microbiennes puissent transformer certains analogues de leur substrat naturel sans toutefois que cette transformation soit assez efficace pour fournir les électrons nécessaires pour suppléer à leur besoin énergétique. Le phénomène qui consiste à dégrader un substrat sans en retirer d'énergie est appelé co-métabolisme. Il va sans dire que pour que les bactéries puissent convertir un substrat organique par co-métabolisme, elles doivent avoir accès à une autre source de carbone (donneur d'électrons) qui fournit l'énergie nécessaire à leur croissance. Plusieurs polluants organiques, dont les BPC à faible teneur en chlore et les HAP, plusieurs herbicides et pesticides sont dégradés par co-métabolisme.

2.2. CAPACITÉ D'ADAPTATION DES MICRO-ORGANISMES DANS UN NOUVEL ENVIRONNEMENT

La versatilité nutritionnelle des bactéries, c'est-à-dire leur capacité de dégrader une variété considérable de composés organiques et leur capacité à apprendre rapidement à dégrader de nouveaux composés organiques est contrôlée par un ensemble de facteurs génétiques, biochimiques et écologiques. Les gènes régissant la dégradation des composés organiques présents dans la nature sont souvent localisés sur des plasmides qui sont des éléments extrachromosomiques facilement mobilisables (transférables) entre les bactéries (Wallace et Sayler, 1992). Par conséquent, lorsqu'un gène nouveau, mutant, permettant la dégradation d'un nouveau composé apparaît, celui-ci peut être transmis rapidement à plusieurs autres bactéries appartenant à des groupes taxonomiques différents.

Un autre phénomène important dans le développement de bactéries capables de dégrader de nouveaux composés chimiques est la capacité de ces organismes à travailler en consortium pour effectuer la dégradation (Liu et Suflita, 1993). Ainsi, des bactéries différentes peuvent travailler ensemble à dégrader un composé efficacement. Par exemple, la dégradation des BPC requiert deux voies cataboliques (voir plus loin). Une

première voie transforme le BPC en chlorobenzoates correspondants (Furukawa, 1982; Unterman, 1996; Sylvestre, 1995). Une seconde voie minéralise les chlorobenzoates. Les bactéries aérobies dégradent un nombre restreint de congénères BPC; elles dégradent surtout les congénères à faible teneur en chlore. Entre autres, certaines bactéries sont capables de transformer les monochlorobiphényles en monochlorobenzoates, mais, elles ne possèdent pas la voie catabolique des chlorobenzoates. L'accumulation des chlorobenzoates dans le milieu de croissance conduit à la formation de métabolites toxiques qui inhibent la dégradation des chlorobiphényles (Hernandez *et al.*, 1991; Sondossi *et al.*, 1992). Cependant, il est possible de développer des consortiums bactériens qui ensemble dégradent efficacement les congénères à faible teneur en chlore autant en milieu liquide que dans les sols (Furukawa et Chakrabarty, 1982; Sylvestre et Fauteux, 1982; Barriault et Sylvestre, 1993; Hickey *et al.*, 1993). Dans la nature, les bactéries travaillent en consortium non seulement à l'intérieur d'une même niche écologique, mais elles peuvent travailler ensemble entre niches écologiques très différentes. Ainsi, dans le cas des BPC, il est reconnu que les bactéries anaérobies des sédiments aquatiques peuvent effectuer une réaction de déshalogénéation réductrice qui conduit au remplacement des atomes de chlore par des atomes d'hydrogène. Cette réaction a pour effet d'alléger la teneur en chlore des congénères BPC et de les rendre plus disponibles à la dégradation par les bactéries aérobies en surface des sédiments. Ce système a servi de modèle pour concevoir des bioréacteurs à deux phases aérobie/anaérobie qui viseraient la dégradation des mélanges de BPC à haute teneur en chlore. Malheureusement, toutefois, la déshalogénéation réductrice est un processus très lent dont les mécanismes moléculaires sont encore inconnus (pour un examen de la question, voir Sylvestre, 1995; Abramowicz, 1994; Suflita et Townsend, 1995; Abramowicz et Olson, 1995). De plus, ce processus conduit à l'accumulation de congénères non désirables comme les 3,3',4,4'- et 2,2',6,6'-tétrachlorobiphényles ainsi que le 2,6-dichlorobiphényle, qui résistent à la déshalogénéation réductrice (Maltseva *et al.*, 1999) ainsi qu'à la dégradation par les bactéries aérobies. Il faudra encore beaucoup d'efforts de recherche pour optimiser ce procédé. Cependant, comme on le verra plus loin, il est possible de développer par génie génétique des oxygénases qui peuvent dégrader ces congénères persistants. Cependant, comme on le verra plus loin, la biologie moléculaire et le génie génétique nous offrent des outils permettant de développer des enzymes plus efficaces, capables de dégrader ces congénères persistants.

3. LES POP, UNE MENACE POUR L'ENVIRONNEMENT

La persistance d'un grand nombre de polluants est causée par l'un ou l'autre ou par un ensemble des facteurs énumérés dans les paragraphes précédents. Dans ces cas, la persistance est limitée à un écosystème et il est souvent possible d'y remédier en appliquant les conditions environnementales appropriées. Par exemple, on exploite les micro-organismes depuis plus de 80 ans pour traiter efficacement les eaux usées domestiques (Watanabe et Baker, 2000 ; Eckenfelder et Musterman, 1995). Au cours des deux dernières décennies, plusieurs procédés efficaces ont été mis au point pour la réhabilitation de sites contaminés par des dérivés du pétrole (sols et eaux souterraines) (Rosenberg, 1993).

Cependant, la détection de composés toxiques comme les BPC, les HAP, les dioxines, etc. dans la biosphère et leur accumulation dans les tissus d'organismes vivants indiquent que certains polluants ne sont pas minéralisés efficacement dans l'environnement. Cette persistance qui se traduit par une pollution diffuse est due à l'absence de voies cataboliques microbiennes efficaces pour dégrader ces polluants. Du fait que ces composés apparus avec l'ère industrielle soient récents, les micro-organismes n'ont pas encore appris à les dégrader (Shannon et Unterman, 1993 ; Edgington, 1994). Ces composés organiques persistants abrégés sous le terme de POP représentent un problème majeur pour notre société. Le problème est d'autant sérieux que le Conseil administratif du Programme des Nations Unies sur l'environnement (PNUE), lors de sa 19^e session en février 1997 (décision 19/3(C)) a conclu qu'une action internationale, incluant la conception d'un instrument global ayant force exécutoire, s'imposait dans le but de réduire les risques sur la santé humaine et sur l'environnement provoqués lors des émissions de douze POP ciblés. Ces douze POP sont les BPC, les dioxines et furanes, la dieldrine, le DDT, l'endrine, le clordane, l'hexachlorobenzène, le mirex, le toxaphène et l'heptachlore.

Ces substances chimiques sont extrêmement stables et sont reconnues pour leur faculté à s'accumuler dans les tissus biologiques. De ce fait, elles sont transportées sur de longues distances, vers des régions qui n'ont jamais connu ni leur usage, ni leur production, et ainsi elles menacent l'environnement à l'échelle globale (Molina *et al.*, 1999 ; Brunstrom et Halldin, 2000).

3.1. PERSISTANCE DES POP

Malgré les outils moléculaires et écologiques que possèdent les bactéries pour apprendre rapidement à dégrader de nouveaux composés, les POP sont encore parmi nous pour longtemps. Pourquoi en est-il ainsi ? Pour répondre à cette question, il faut comprendre les mécanismes biochimiques par lesquels les bactéries dégradent ces composés nouveaux. Nous utiliserons ici le modèle de la dégradation microbienne des BPC, qui a fait l'objet de plusieurs études au cours des dernières décennies.

Une observation importante est que les enzymes bactériennes impliquées dans la dégradation des composés organiques du sol sont des enzymes qui, en général, ont un large spectre de substrat, c'est-à-dire que ces enzymes peuvent catalyser des réactions biochimiques en utilisant des substrats autres que leur substrat naturel. À titre d'exemple, chez les bactéries, les chlorobiphényles sont dégradés par les enzymes de la voie responsable de la dégradation du biphényle, qui est une substance d'origine naturelle, présente dans la nature depuis très longtemps (Sylvestre, 1995). La première étape étant franchie, il reste au processus lent de la sélection naturelle d'influencer la direction des mutations pour développer des enzymes plus efficaces pour dégrader les BPC. Ce processus est cependant très long à l'échelle humaine : il nécessite des milliers, voire des millions d'années.

Un grand nombre de microorganismes capables de dégrader des polluants qu'on considérerait non dégradables ont été décrits au cours des dix dernières années. Les exemples sont multiples (TNT, 2,4-D, 2,4,5-T, PCP, etc.) (Yadav et Reddy, 1993 ; Daubaras *et al.*, 1996 ; Eilers *et al.*, 1999 ; Hawari *et al.*, 1999 ; Siciliano et Greer, 2000). Ces observations indiquent que dans l'environnement, la pression de sélection favorise le développement de bactéries capables de dégrader des composés xénobiotiques persistants. Néanmoins, la persistance dans l'environnement de certains autres composés comme les BPC et les HAP montre l'incapacité des voies cataboliques microbiennes actuelles de dégrader ces polluants efficacement. De fait, trois facteurs majeurs interviennent dans la dégradation d'un polluant : la biodisponibilité, la présence d'enzymes efficaces pour transformer le polluant, la présence de tous les enzymes nécessaires pour minéraliser le polluant afin de prévenir l'accumulation de métabolites indésirables. La biodisponibilité est un facteur non négligeable à considérer dans les processus de biorestauration des POP, car ce sont souvent des composés hydrophobes qui ont tendance à se fixer sur la matrice environnementale (sol, sédiments, particules en suspension dans l'eau). L'addition d'agents tensioactifs peut faciliter la dégradation des BPC (Barriault et Sylvestre, 1993 ; Billingsley *et al.*, 1999) autant que des HAP (Boonchan *et al.*, 1998). Cependant, l'addition de ces composés n'est pas suffisante

pour permettre la dégradation des congénères les plus persistants des BPC et HAP (Barriault et Sylvestre, 1993). La raison en est que les enzymes utilisées par les bactéries aérobies pour dégrader ces polluants sont incapables d'oxyder les congénères les plus persistants (Haddock *et al.*, 1995 ; Hurtubise *et al.*, 1995).

3.2. EXEMPLE DES BPC

L'utilisation de procédés de dégradation microbienne des POP nécessitera une intervention humaine pour d'abord accélérer le processus évolutif conduisant au développement de voies cataboliques efficaces. Les stratégies de développement de ces voies de dégradation nécessitent une bonne compréhension des mécanismes biochimiques et génétiques régissant ces dégradations. Pour cette raison, plusieurs études ont visé à élucider les voies métaboliques impliquées dans la transformation microbienne des POP dans la nature. Une liste exhaustive de ces études dépasse le cadre du présent examen ; nous nous limiterons à décrire l'exemple de la voie catabolique des BPC.

4. VOIE CATABOLIQUE DES BPC

Dans la nature, les bactéries dégradent les BPC par la voie métabolique du biphenyle. Cette voie comprend quatre étapes enzymatiques pour transformer les BPC en chlorobenzoates correspondants. Les chlorobenzoates sont ensuite minéralisés par une autre voie métabolique. L'identification des métabolites des BPC (Massé *et al.* 1989 ; Ahmad *et al.*, 1991a ; Ahmad *et al.*, 1991b) ainsi que l'étude des gènes impliqués dans la dégradation ont permis d'élucider la voie biochimique responsable de la dégradation des BPC (figure 3.2) (Ahmad *et al.*, 1990, Ahmad *et al.*, 1991a ; Ahmad *et al.*, 1991b ; Sylvestre *et al.*, 1996b) chez la bactérie *Comamonas testosteroni* B-356, que nous avons isolée de l'environnement. La première étape de dégradation des BPC est catalysée par la dioxygénase du biphenyle qui introduit deux atomes d'oxygène en position *ortho-meta*, sur le cycle aromatique. Cette réaction conduit à la formation de 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyle qui est ensuite réaromatisé par la 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyle-2,3-déshydrogénase. Le catéchol qui en résulte est ensuite oxydé par la 2,3-dihydroxybiphenyle-1,2-dioxygénase qui catalyse la fission du cycle aromatique. Le métabolite qui en résulte, l'acide 2-hydroxy-6-oxo-6-phénylhexa-2,4-diénoïque (HOPDA) est ensuite hydrolysé pour former l'acide benzoïque et l'acide pentanoïque. Cette voie ressemble à celle qui est présente chez toutes les autres bactéries connues capables de dégrader les BPC (Unterman, 1996 ; Furukawa *et al.*, 1978 ; Furukawa *et al.*, 1992 ; Bedard *et al.*, 1986 ; Sylvestre, 1995).

Les enzymes de cette voie catabolique ont été isolées et caractérisées afin d'identifier leurs limites cataboliques (Haddock et Gibson, 1995; Haddock *et al.*, 1995; Erickson et Mondello, 1992; Erickson et Mondello, 1993; Taira *et al.*, 1992). La biologie moléculaire a fourni des outils indispensables pour accélérer notre compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la dégradation des BPC. Des études effectuées avec des clones bactériens exprimant individuellement chacune des enzymes de la voie catabolique ont permis de préciser la spécificité des enzymes envers les différents congénères BPC et leurs métabolites (Furukawa *et al.*, 1993; Haddock *et al.*, 1995; Haddock *et al.*, 1993; Hurtubise *et al.* 1995; Hurtubise *et al.*, 1996; Barriault *et al.*, 1998, 1999b). Ces études ont montré que la capacité des bactéries à dégrader les différents congénères BPC varie considérablement d'une bactérie à l'autre. Le spectre de congénères BPC dégradés par les différentes bactéries est en grande partie déterminé par la spécificité de la première enzyme de la voie catabolique, la dioxygénase du biphenyle (Sylvestre, 1995), mais les autres enzymes de cette voie imposent aussi des restrictions au spectre des BPC qui peuvent être dégradés. Pour cette raison, nous avons entrepris l'étude moléculaire des deux premières enzymes de cette voie de dégradation. Dans ce document, je résumerai nos connaissances actuelles des paramètres biochimiques des quatre enzymes du tronçon catabolique requis pour la conversion de BPC en chlorobenzoates. Je m'attarderai principalement sur les paramètres qui influencent leur interaction avec les congénères BPC ainsi que sur les moyens à notre disposition pour augmenter leur potentiel catabolique envers un plus large spectre de congénères BPC. Trois souches ont servi principalement à élucider les mécanismes moléculaires de dégradation des BPC et à identifier les déterminants de la spécificité. Il s'agit de la souche *Burkholderia* sp. LB400 (Fain et Haddock, 2001), qui est la bactérie la plus performante connue à ce jour, de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (Taira *et al.*, 1992) et de *Comamonas testosteroni* B-356 (Ahmad *et al.*, 1990).

4.1 PURIFICATION ET MÉCANISMES RÉACTIONNELS DE LA DIOXYGÉNASE DU BIPHÉNYLE

Les oxygénases sont des enzymes qui incorporent un ou deux atomes d'oxygène à un substrat organique à partir d'oxygène moléculaire. Ces enzymes d'importance primordiale dans le métabolisme des composés organiques ont été reconnues tardivement au cours de l'histoire de la biochimie. Tandis qu'on connaît les enzymes hydrolytiques depuis plus de 150 ans, la découverte des oxygénases remonte à moins de 50 ans. L'importance capitale de l'oxygène dans les systèmes biologique a été reconnue dès le XVIII^e siècle. Au début du XX^e siècle, les études faisant appel aux

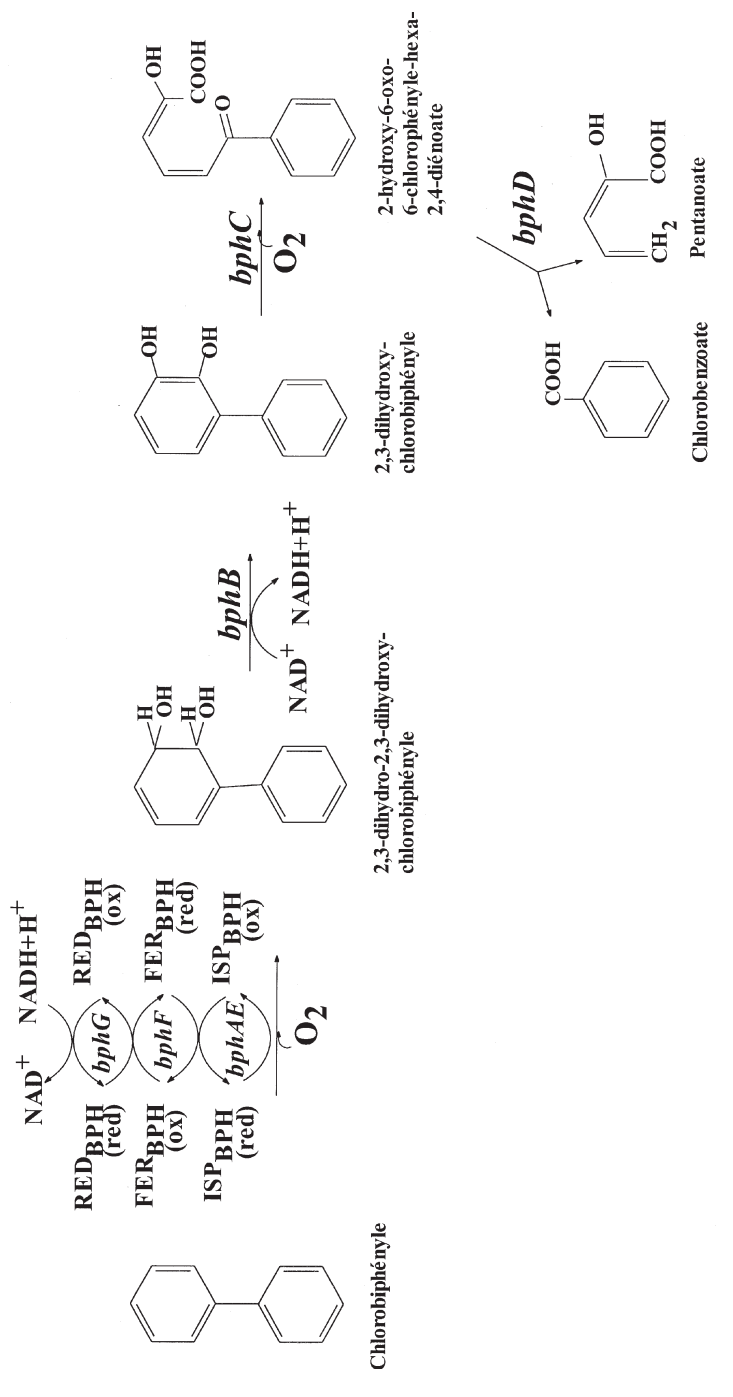
méthodes de mesure manométriques menées par Haldane, Bancroft et Warburg ont montré une association entre la consommation d'oxygène et l'activation des voies métaboliques. Cependant, les scientifiques croyaient fermement que l'oxygène atmosphérique ne pouvait pas être incorporé directement dans la matière organique. On croyait plutôt que l'oxygène présent dans la matière organique provenait de réactions impliquant un transfert d'atome d'oxygène entre molécules organiques. Ce n'est qu'au cours des années 1950 avec les études de Hayaishi *et al.* (1955) et de Mason *et al.* (1955) qu'il a été établi que les réactions d'oxygénation catalytique de la matière organique sont possibles. Par spectrométrie de masse utilisant l'isotope 18 de l'oxygène, Hayaishi *et al.* (1955) ont démontré l'incorporation directe du $^{18}\text{O}_2$ sur le noyau benzénique. Depuis lors, on a décrit un très grand nombre de dioxygénases bactériennes présentant des structures et mécanismes d'action variés.

La dioxygénase du biphenyle est l'une des nombreuses dioxygénases bactériennes de grande importance. Cette enzyme est particulièrement sensible aux conditions environnementales et extrêmement difficile à purifier par les techniques chromatographiques traditionnelles (Imbeault *et al.*, 2000). Pour cette raison, nous avons purifié l'enzyme par chromatographie d'affinité de protéines recombinantes portant une étiquette histidine (Hurtubise *et al.*, 1995; Hurtubise *et al.*, 1996). Cette technique qui fait appel à la biologie moléculaire permet la purification des protéines en une seule étape chromatographique, réduisant ainsi les risques d'inactiver les protéines sensibles.

Cette étude a permis d'élucider les mécanismes de fonctionnement de cette enzyme qui comporte trois composants enzymatiques distincts (figure 3.2) : une réductase encodée par le gène *bphG* chez la souche B-356, une ferrédoxine encodée par le gène *bphF* et une oxygénase encodée par les gènes *bphA* et *bphE*. La réductase et la ferrédoxine sont deux enzymes qui servent à transférer des électrons du cofacteur NADH vers l'oxygénase qui est le composant interagissant directement avec le substrat pour y introduire deux atomes d'oxygène. La réductase est une flavoprotéine caractérisée par son spectre d'absorption typique du FAD, comportant des pics maximum à 375 nm et à 450 nm (Broadus et Haddock, 1998; Hurtubise *et al.*, 1995). La structure tridimensionnelle de la réductase de *Pseudomonas* sp. KKS102 a été résolue (Senda *et al.*, 2000). Le pourcentage d'homologie entre les composants réductase des dioxygénases du biphenyle qui ont été séquencés varie considérablement et beaucoup plus que pour les autres composants des dioxygénases du biphenyle (Sylvestre *et al.*, 1996b). En dépit de cette variation, la séquence des acides aminés qui constituent le site de liaison avec le noyau nicotinamide est hautement conservée (Senda *et al.*, 2000). Il est donc probable que le mécanisme de transfert d'électrons impliquant ces réductases est le même pour toutes

Figure 3.2

Voie catabolique oxydative du biphenyle et des chlorobiphenyles



les dioxygénases. Néanmoins, ceci explique pourquoi il est possible de remplacer l'activité réductase requise pour faire fonctionner la dioxygénase du biphenyle de la souche B-356 par une réductase provenant de chloroplastes d'épinards (Hurtubise *et al.*, 1995). D'autre part, en terme de potentiel catalytique envers les BPC, il semble que l'influence du composant réductase sur l'activité de la dioxygénase envers les congénères les plus persistants soit plutôt minime.

Le composant ferrédoxine est une petite protéine fer-soufre. La structure de la ferrédoxine de la dioxygénase du biphenyle de *Burkholderia* sp. LB400 a récemment été élucidée (Colbert *et al.*, 2000). Contrairement au composant réductase, la ferrédoxine est très spécifique à une oxygénase donnée (Hurtubise *et al.*, 1995; Barriault et Sylvestre, 1999b). Par conséquent, en terme d'ingénierie enzymatique, des modifications majeures du composant oxygénase devront très probablement s'accompagner de modifications similaires au niveau du composant ferrédoxine pour conserver une enzyme fonctionnelle.

Bien que la réactivité de la réductase et de la ferrédoxine influence la capacité de l'oxygénase à dégrader certains congénères BPC (Sylvestre, 1995), comme on le verra plus loin, c'est le composant oxygénase qui détermine la spécificité de l'enzyme envers les substrats BPC.

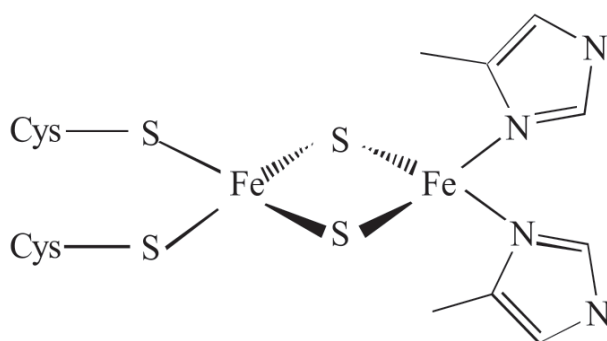
Le composant oxygénase est constitué de deux sous-unités (α et β codées par les gènes *bphA* et *bphE* respectivement). L'enzyme est constituée de trois sous-unités α et de trois sous-unités β qui s'associent sous forme d'hexamère (Hurtubise *et al.*, 1996). La structure tridimensionnelle de la dioxygénase du biphenyle n'est pas encore complètement élucidée, mais l'enzyme a été cristallisée (Imbeault *et al.*, 2000). En se basant sur la structure de la dioxygénase du naphthalène (Kauppi *et al.*, 1998), qui lui est apparentée, l'enzyme adopterait la forme d'un champignon. Les trois sous-unités α s'associeraient ensemble pour former la tête du champignon alors que les trois sous-unités β formeraient le pied.

Le mécanisme par lequel les électrons sont transférés du NADH vers le site actif du composant oxygénase n'est pas encore élucidé complètement, mais l'hypothèse la plus probable est la suivante. La ferrédoxine et la composante oxygénase sont deux protéines Fer-Soufre. Ces deux protéines portent un centre Rieske constitué d'une chaîne de 17 acides aminés, limitée à chaque extrémité par une paire de résidus cystéine-histidine qui lieraient deux atomes de fer et de soufre selon le modèle présenté à la figure 3.3. L'électron serait donc transféré de la composante réductase vers le centre Rieske de la ferrédoxine, puis transmise au centre Rieske de la composante oxygénase. Nous avons démontré que le centre Rieske de la composante oxygénase est localisé sur la chaîne α (Hurtubise *et al.*, 1996) et que cette composante ne comporte pas deux, mais trois atomes de fer,

dont deux sont liés au centre Rieske et un troisième fer mononucléaire serait associé au centre actif (Hurtubise *et al.*, 1996). Cet arrangement est le même pour la dioxygénase du biphenyle de la souche LB400 (Haddock et Gibson, 1995). En se basant sur la structure de la dioxygénase du naphthalène, il semblerait que le centre Rieske d'une sous-unité α serait associé au fer mononucléaire de la sous-unité α adjacente. L'électron transféré de la ferrédoxine vers le centre Rieske d'une sous-unité α de l'oxygénase serait donc ensuite transmis au fer mononucléaire de la sous-unité α adjacente et le fer réduit servirait à activer la molécule d'oxygène pour initier son incorporation à la molécule de biphenyle (Wolfe *et al.*, 2001). Les mécanismes d'activation de la molécule d'oxygène et les mécanismes par lesquels l'enzyme interagit avec le substrat pour permettre son oxygénation en une position déterminée restent encore à élucider.

Figure 3.3

Structure probable du centre Rieske*



* Dans cette structure, les atomes de fer et de soufre sont associés aux noyaux imidazole de deux molécules d'histidine et aux atomes de soufre de deux molécules de cystéine.

4.2. ACTIVITÉ ET SPÉCIFICITÉ DE LA DIOXYGÉNASE DU BIPHÉNYLE

Des études comparatives de dioxygénases du biphenyle de diverses souches bactériennes ont été réalisées en vue d'associer la spécificité envers les congénères BPC à certaines caractéristiques structurales de l'enzyme. Il est intéressant de constater que le spectre des congénères BPC oxygénés par la dioxygénase de *P. pseudoalcaligenes* KF707 diffère considérablement du spectre de la dioxygénase de *Burkholderia* sp. LB400, tandis que les gènes qui codent ces deux enzymes sont homologues à plus de 95 % (Erickson et Mondello, 1993). La dioxygénase du biphenyle de LB400 catalyse facilement l'oxygénation des congénères portant un atome de chlore en

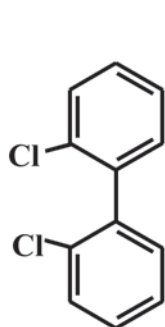
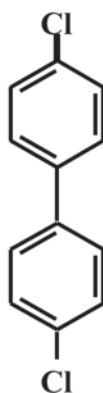
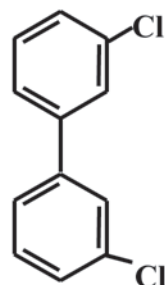
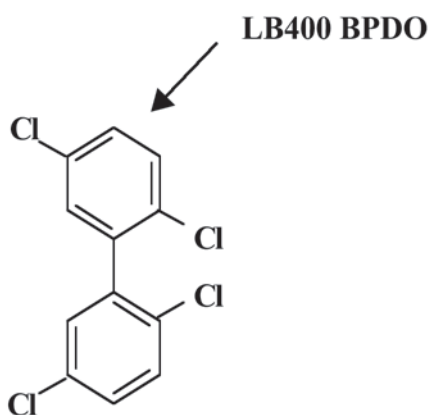
position *ortho* sur chacun des deux noyaux du biphenyle (le 2,2'-dichlorobiphenyle), mais la réaction envers le 4,4'-dichlorobiphenyle (atomes de chlore en position *para*) est médiocre (Erickson et Mondello, 1993 ; Gibson *et al.*, 1993) (figure 3.4). Par contre, la dioxygénase de la souche KF707 catalyse efficacement l'oxygénation du 4,4'-dichlorobiphenyle, mais elle est inactive envers le 2,2'-dichlorobiphenyle (Erickson et Mondello, 1993 ; Gibson *et al.*, 1993). Une singularité de la dioxygénase de la souche LB400 est sa capacité d'oxygéner le 2,2',5,5'-tétrachlorobiphenyle, attribuable à sa capacité de catalyser une oxygénation de ce congénère sur les positions *meta-para* (Bedard *et al.*, 1986 ; Haddock *et al.*, 1995) (figure 3.4). La souche LB400 est la seule souche connue capable de catalyser cette réaction, ce qui lui confère la capacité de dégrader plusieurs congénères BPC qu'aucune autre souche ne peut dégrader. Il s'agit des congénères dont au moins une position *meta* et une position *ortho* sont occupées par des atomes de chlore sur chacun des deux noyaux (figure 3.4).

Se basant sur la technique de mutagenèse dirigée, Erickson et Mondello (1993) et Mondello *et al.* (1997) ainsi que Kimura *et al.* (1997) ont montré dans des études indépendantes que certains résidus d'acide aminé de la partie en C-terminale de la chaîne α avaient une grande influence sur la spécificité de la dioxygénase envers les congénères BPC. Ainsi en créant des mutants obtenus en changeant certains acides aminés de la chaîne α de l'une des souches par l'acide aminé qui est retrouvé sur la chaîne α de l'autre souche dans la position correspondante, ces auteurs ont créé des hybrides qui avaient acquis la possibilité d'oxygéner le 2,2'-dichlorobiphenyle, le 4,4'-dichlorobiphenyle et le 2,2',5,5'-tétrachlorobiphenyle. Tel que le présente la figure 3.5, quatre régions en particulier ont été ciblées. Les régions III et IV semblent les plus influentes. La région III serait associée à la capacité de l'enzyme à oxygéner le 4,4'-dichlorobiphenyle (Mondello *et al.*, 1997 ; Kimura *et al.*, 1997), la région IV serait associée à la capacité d'oxygéner le substrat en position *meta* et *para* (Suenaga *et al.*, 1999).

Dans notre laboratoire, nous avons caractérisé la dioxygénase de la souche B-356. Cette enzyme a évolué un peu différemment des deux précédentes. L'analyse des séquences des gènes *bphAEFG* de la souche B-356 montre qu'il y a une homologie génétique de l'ordre de 80 % avec les gènes *bphAEFG* des souches LB400 et KF707 (Sylvestre *et al.*, 1996b). De plus, contrairement aux dioxygénases des souches LB400 et KF707, la dioxygénase de la souche B-356 est incapable d'oxygéner le 2,2'-dichlorobiphenyle et le 4,4'-dichlorobiphenyle (Hurtubise *et al.*, 1998). Elle est cependant capable d'oxygéner le 3,3'-dichlorobiphenyle plus efficacement que les deux autres oxygénases.

Figure 3.4

Mode d'hydroxylation et propriétés catalytiques
des dioxygénases du biphenyle des souches B-356, KF707 et LB400
envers les congénères chlorobiphényles

**LB400****KF 707****B-356****2,2',5,5'-tétrachlorobiphényl**

qui devrait, selon les études citées plus haut, conférer à la dioxygénase de la souche B-356 la capacité à oxygéner le 4,4'-dichlorobiphényle. Ces constatations nous portent à conclure que l'association entre les sous-unités α et β déterminerait la conformation de l'enzyme et que probablement, selon la structure des sous-unités α et β , la conformation finale aurait un effet déterminant sur la capacité du site actif à accepter certains congénères BPC et à en rejeter d'autres. Selon cette hypothèse, il reste possible que dans certains arrangement α et β , certains résidus d'acides aminés comme ceux des régions III et IV pourraient influencer la spécificité de l'enzyme, mais pour d'autres arrangements, ces mêmes régions n'auraient pas l'effet escompté.

Tableau 3.1

Quantité de substrat consommé 5 min après le début de la réaction enzymatique

Substrat	nmol de substrat consommé/0,6 nmol enzyme			
	α B-356 β B-356 ISP _{BHP}	α LB400 β LB400 ISP _{BHP}	α B-356 β LB400 ISP _{BHP}	α LB400 β B-356 ISP _{BHP}
2,2'-dichlorobiphényle	< 5	50	50	30
3,3'-dichlorobiphényle	50	< 5	< 5	30
4,4,-dichlorobiphényle	T	T	T	T
2,5-dichlorobiphényle	50	60	30	< 10
2,2',5,5'-tétrachlorobiphényle	-	35	40	20

Tableau tiré de Hurtubise, Barriault et Sylvestre, 1998. La réaction de dioxygénase a été initiée par l'ajout de 100 nmol de substrat.

(-) Pas de dégradation; T : métabolites produits à l'état de trace.

Quoi qu'il en soit, en se basant sur la structure connue de la dioxygénase du naphthalène (Kauppi *et al.*, 1998; Parales *et al.*, 2000b), nous savons que la partie C-terminale de la chaîne α est directement impliquée dans la réaction avec le substrat. En se basant sur le modèle de réaction présenté ci-haut, où le centre Rieske d'une sous-unité α transmettrait un électron vers le fer mononucléaire associé au centre actif de la sous-unité α adjacente, il est très probable que la dimension et la forme de la poche catalytique sera déterminée en partie par l'espace entre les sous-unités α de l'hexamère formé par l'association des sous-unités α/β . Il est donc possible que les sous-unités α et β influencent la conformation du site catalytique de l'enzyme. Quoiqu'il en soit, l'analyse de la structure de la dioxygénase du naphthalène indique que le fer mononucléaire serait coordonné par trois acides aminés de la portion C-terminale de la chaîne α , indiquant que cette partie de la molécule serait directement impliquée

dans la réaction catalytique (Kauppi *et al.*, 1998; Parales *et al.*, 2000b). Il est aussi intéressant de constater que les acides aminés de la région III de la dioxygénase du biphenyle correspondent à des acides aminés de la dioxygénase du naphthalène qui se trouvent dans la région du site actif (soit dans une région de l'espace près des acides aminés qui coordonnent le fer mononucléaire) (Carredano *et al.*, 2000).

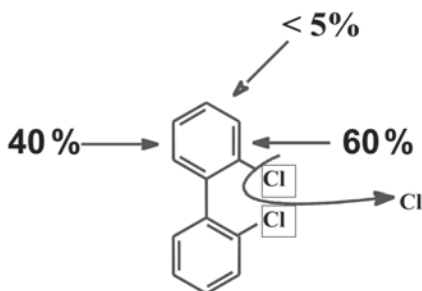
5. INGÉNIERIE DE LA DIOXYGÉNASE DU BIPHÉNYLE

Ayant acquis un bagage de connaissances important sur le mécanisme réactionnel de la dioxygénase du biphenyle ainsi que sur les déterminants potentiels de la spécificité et sur certains éléments structuraux de l'enzyme, nous pouvons planifier de façon plus rationnelle l'ingénierie d'une dioxygénase à potentiel accru de dégradation des BPC. À titre d'exemple, nous décrirons nos travaux portant sur le développement d'une dioxygénase modifiée par génie génétique pour intensifier ses capacités catalytiques envers les BPC.

Idéalement, les nouvelles enzymes devraient être capables d'oxygéner un éventail important de congénères BPC et générer pour chaque congénère un nombre minimal de produits. C'est à dire que pour chaque congénère l'attaque de la molécule de substrat devrait se faire sur un nombre restreint de positions. Par exemple, la dioxygénase du biphenyle de la souche LB400 peut oxygéner le 2,2'-dichlorobiphenyle selon trois modes d'attaque. Le mode principal consiste en une attaque des atomes de carbone 2 et 3 pour générer le 2,3-dihydroxy-2'-chlorobiphenyle, causant la perte d'un atome de chlore en position 2. Ce mode représente environ 60 à 70 % de la réaction catalytique. D'autre part, cette dioxygénase peut aussi attaquer le 2,2'-dichlorobiphenyle sur les carbones 5 et 6 pour générer le 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyle. Ce mode représente environ 30 % de la réaction catalytique. Enfin, une petite partie (moins de 5 %) des molécules de substrats subissent une oxygénation en position 3,4 (*meta-para*) plutôt qu'*ortho-meta* pour générer du 3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyle (voir la figure 3.6). On voit qu'en multipliant les modes d'attaque de la molécule de substrat, on augmente d'autant le nombre de métabolites à dégrader. L'oxygénase idéale devrait donc attaquer chaque congénère selon un mode d'attaque limité. De plus, nous avons mentionné plus haut que la dioxygénase du biphenyle de la souche LB400 peut dioxygéner le 2,2',5,5'-tétrachlorobiphenyle en position *meta-para*, ce qui permet d'oxygéner des congénères BPC dont aucune des positions *ortho-meta* adjacentes sont libres de chlore. Bien que cette réaction permette à la dioxygénase de LB400 de dégrader un plus grand nombre de congénères BPC que les autres dioxygénases connues, la réaction d'oxygénation en position *meta-para* est moins souhaitable sur le

Figure 3.6

Modes d'attaque du 2,2'-dichlorobiphényle par la dioxygénase du biphényle de LB400



2,2'-dichlorobiphényle

plan métabolique du fait que la dioxygénase du 2,3-dihydroxybiphényle, la troisième enzyme de la voie du biphényle est incapable de catalyser l'ouverture du noyau catéchol portant ses groupement hydroxyl en position *meta-para*. Idéalement, la dioxygénase du biphényle devrait pouvoir oxygéner le plus de congénères possibles en position *ortho-meta*. Dans ce cas, les congénères portant des atomes de chlore sur les positions *ortho-meta* devraient subir une déshalogénéation concomitante à la réaction d'oxygénation. Une telle réaction est possible. En effet, nous avons déjà mentionné que la dioxygénase de LB400 déshalogénise le 2,2'-dichlorobiphényle au cours de l'oxygénation de cette molécule. Bien que le 4,4'-dichlorobiphényle soit un mauvais substrat pour la dioxygénase de la souche B-356, ce congénère peut quand même être métabolisé par cette enzyme et une partie des métabolites produits résultent d'une déshalogénéation de la molécule au cours de l'attaque par la dioxygénase (Ahmad *et al.*, 1991). Plus récemment, Suenaga *et al.* (2002) ont obtenu par ingénierie génétique une nouvelle dioxygénase du biphényle capable de déshalogéner le 3,3'-dichlorobiphényle au cours de son attaque. Ces données démontrent la faisabilité de faire l'ingénierie d'une enzyme capable d'oxygéner les congénères BPC à plus forte teneur en chlore en misant sur la modification du mode d'attaque et sur le potentiel de déshalogénéation de la molécule de substrat. C'est ce qui est le plus souhaitable à long terme, mais à court terme, nous devons miser sur le développement d'une enzyme capable de dégrader les congénères BPC les plus problématiques, soit ceux qui présentent un potentiel toxique élevé ou ceux qui persistent malgré

leur faible teneur en chlore, comme c'est le cas des congénères portant des atomes de chlore en position *ortho* comme le 2,6-dichlorobiphényle ou le 2,2',6,6'-tétrachlorobiphényle.

Il existe deux approches pour modifier les capacités catalytiques d'une enzyme : l'approche rationnelle et l'approche empirique.

L'approche rationnelle se base sur la connaissance de la structure tridimensionnelle de la protéine et sur la modélisation des interactions protéine/ligand pour identifier les modifications structurales qu'il est nécessaire d'apporter à l'enzyme pour étendre son spectre d'activité envers de nouveaux substrats. Bien que cette approche soit sans contredit d'un très grand intérêt pour comprendre les interactions intimes entre la protéine et les ligands BPC (Parales *et al.*, 2000b ; Carredano *et al.*, 2000), son application nécessite une connaissance approfondie de la structure tridimensionnelle de l'enzyme qu'il reste encore à élucider (Imbeault *et al.*, 2000). On reconnaît de plus que plusieurs tentatives de modification rationnelle des propriétés des enzymes ont échoué, car les effets de substitutions d'acides aminés sur la structure ou la fonction de l'enzyme sont souvent inattendus par rapport aux prédictions des modèles (Kikuchi *et al.*, 1999). Pour ces raisons, nous avons investi nos efforts de recherche sur une nouvelle approche empirique qui découle d'une application de la technique dite de *polymerase chain reaction* [réaction en chaîne à la polymérase] (PCR).

5.1. ÉVOLUTION MOLÉCULAIRE *IN VITRO* PAR RECOMBINAISON ALÉATOIRE

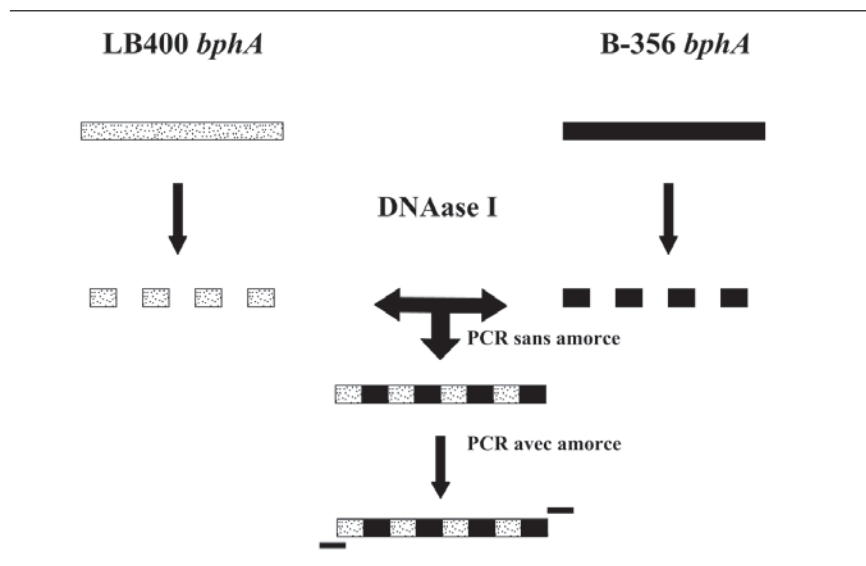
On peut répliquer un fragment d'ADN *in vitro* en le mettant en présence d'une polymérase et d'amorces spécifiques qui sont de courts fragments d'ADN homologues (oligonucléotides) situés aux extrémités du fragment à répliquer. La température du milieu réactionnel est d'abord augmentée à 94 °C pour dissocier les deux brins d'ADN, puis abaissée à une température qui permet aux amorces de se lier à l'ADN et à la polymérase d'initier la synthèse de la nouvelle chaîne d'ADN. Dans la technique de la PCR, ce cycle de température est répété successivement un grand nombre de fois pour synthétiser un très grand nombre de copies du fragment. L'approche que nous avons utilisée pour faire l'ingénierie empirique des protéines est appelée « évolution moléculaire *in vitro* par recombinaison aléatoire » (*DNA shuffling* ou *directed-in vitro evolution*) (Stemmer, 1994). Elle consiste à mimer le processus d'évolution des êtres sexués à l'échelle moléculaire, en prenant avantage de la technique de la PCR. Selon la théorie de l'évolution par sélection naturelle, lentement, au cours des générations, il apparaît des mutations dont certaines sont neutres, d'autres sont bénéfiques, d'autres sont nuisibles et d'autres enfin annulent les effets

bénéfiques ou nuisibles des précédentes. La recombinaison génétique combinée à la pression de sélection servent à éliminer ou neutraliser les mutations nuisibles dans les progénitures subséquentes pour ne garder que les mutations bénéfiques et augmenter ainsi le degré d'adaptation du gène ou de l'individu à son environnement. La technique de l'évolution moléculaire *in vitro* aléatoire reproduit à une échelle accélérée ce que la sélection naturelle réalise sur des millions d'années (Stemmer, 1994).

Cette technique consiste à scinder des fragments d'ADN portant des gènes homologues avec une endonucléase non spécifique ; les petits fragments (entre 50 et 100 pb) qui en résultent sont assemblés par la technique de la PCR pour reconstituer le gène au complet (voir la figure 3.7). Du fait que le mélange réactionnel comprend un ensemble de fragments de gènes homologues (qui ont donc des portions de séquences communes), la population de gènes reconstitués est constituée de fragments hybrides résultant d'événements de recombinaison génétique entre les différents fragments parentaux présents dans le mélange. Cette population de nouveaux gènes (la progéniture) est ensuite insérée sur des plasmides vecteurs qui servent à transformer des bactéries. On sélectionne ensuite parmi les bactéries réceptrices celles qui ont acquis le caractère phénotypique

Figure 3.7

Évolution moléculaire par recombinaison *in vitro* aléatoire



désiré. Par exemple, nous pouvons rechercher les clones capables de dégrader les BPC plus efficacement que les parents. Ces clones plus performants de première génération peuvent être groupés pour recommencer le processus de recombinaison *in vitro* et de sélection de clones pour plusieurs autres générations, de façon à éliminer les mutations négatives et à optimiser la fonction de la protéine. Cette approche mime donc le processus de sélection naturelle qui permet de ne retenir que les meilleurs individus d'une population, mais du fait que la recombinaison se fait *in vitro* sur des milliards de molécules d'ADN, la vitesse d'évolution de nouveaux gènes se fait à un rythme considérablement plus élevé que dans le processus de l'évolution par sélection naturelle.

5.2. APPLICATION DE L'ÉVOLUTION MOLÉCULAIRE *IN VITRO* PAR RECOMBINAISON ALÉATOIRE À L'INGÉNIERIE DE LA DIOXYGÉNASE DU BIPHÉNYLE

La technique de recombinaison aléatoire *in vitro* a été appliquée avec succès en recombinant le gène *bphA* de la souche LB400 avec le gène *bphA1* de la souche KF707 qui présentent un degré d'homologie génétique élevé (> 95 %) (Taira *et al.*, 1992; Erickson et Mondello, 1992). Dans ce cas, on a obtenu des hybrides capables de dégrader à la fois le 4,4'-dichlorobiphényle et le 2,2'-dichlorobiphényle et capables de dégrader le 2,2',5,5'-tétrachlorobiphényle (Kumamaru *et al.*, 1998; Brühlmann et Chen, 1999). Ces études ont aussi permis de confirmer l'importance déterminante sur la spécificité de l'enzyme de la portion C-terminale de la chaîne α . Cependant, aucune nouvelle dioxygénase capable de dégrader les congénères les plus persistants comme les congénères coplanaires représentés par le 3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle ou les congénères comportant deux atomes de chlore en position *ortho*, représentés par le 2,6-dichlorobiphényle et le 2,2',6,6'-tétrachlorobiphényle, n'a encore été décrit. Il est reconnu que les congénères coplanaires miment structurellement les dioxines et les furannes et sont les plus toxiques (Van den Berg *et al.*, 1998; Romanov et Hausinger, 1996). De plus, certaines études récentes semblent indiquer que les congénères *ortho* seraient susceptibles d'être des modulateurs endocriniens (Arcaro *et al.*, 1999) et ces congénères pourraient avoir un effet toxique sur le développement du système nerveux (Mukerjee, 1998; Seegal, 1999). Comme nous l'avons souligné plus haut, les congénères *ortho* sont très résistants aux dégradations aérobies et aux déshalogénations anaérobies. Ces congénères sont donc ceux qui s'accumulent en plus grande quantité dans les procédés mixtes aérobies/anaérobies de dégradation des BPC (Maltseva *et al.*, 1999). Dans ce contexte, il est souhaitable que tout procédé de destruction des BPC ne serve pas à enrichir la biosphère en congénères non désirables.

5.3. ÉVOLUTION MOLÉCULAIRE DE FAMILLES DE GÈNES

Les congénères portant des atomes de chlore en position *meta* et *para* sont coplanaires et les congénères portant des atomes de chlore en position *ortho* prennent une conformation où les deux cycles aromatiques sont perpendiculaires, l'un par rapport à l'autre. Du fait que la position et le nombre d'atomes de chlore sur le noyau biphényle influencent grandement la structure de la molécule, il est à prévoir que la dioxygénase du biphényle aura à subir des modifications majeures pour atteindre un niveau de relaxation suffisante pour pouvoir catalyser l'oxygénation de substrats aussi différents. Autrement, il faudra que la dioxygénase se spécialise envers un groupe de congénères spécifiques, et encore là, il faudra que l'enzyme subisse des modifications structurales majeures pour atteindre cet objectif.

Crameri *et al.* (1998) ont montré que l'application de la technique de l'évolution moléculaire *in vitro* aléatoire à une famille de gènes homologues ayant un degré d'homologie restreint facilite l'obtention d'une progéniture ayant des caractères phénotypiques voulus en un moins grand nombre de générations. Ainsi, ils ont obtenu après une seule génération d'évolution des céphalosporinases qui conféraient une résistance à la céphalosporine 540 fois plus élevée que la meilleure des quatre céphalosporinases ayant servi de parents (Crameri *et al.*, 1998). Dans ce cas, l'homologie entre les séquences d'acides aminés des parents variait entre 82 % et 57 %. On estime que si les parents choisis au départ avaient été très semblables, il aurait fallu 50 cycles (ou générations) d'évolution *in vitro* aléatoire pour atteindre ce résultat (Crameri *et al.*, 1998). Cependant, cette approche a ses limites. En effet, le fait d'explorer un très grand nombre de nouvelles séquences au cours du processus évolutif qui inclut des gènes d'homologie restreinte implique qu'un grand nombre d'individus de la progéniture seront inactifs (Voigt *et al.*, 2001). Une conséquence importante est qu'il faut analyser un très grand nombre d'hybrides de la progéniture pour faire le dépistage des individus d'intérêt. Une autre limite est qu'au cours du procédé d'assemblage des gènes *in vitro* par PCR, les recombinaisons auront lieu principalement dans les régions de haute homologie (Ostermeier *et al.*, 1999). Une conséquence est que la fréquence des hybrides qui requièrent des recombinaisons dans les régions les moins homologues seront très faibles, impliquant la nécessité d'analyser un très grand nombre d'hybrides pour avoir un inventaire complet des possibilités. Dans le cas d'enzymes impliquées dans la résistance à un antibiotique, comme la céphalosporinase, il est possible d'éliminer facilement les hybrides non désirables de la progéniture en ajustant la concentration en antibiotique du milieu de sélection. Cependant, dans les cas où la méthode de criblage ne permet pas d'éliminer les hybrides non désirables, l'application du procédé d'évolution *in vitro* aléatoire à des gènes d'homologie restreinte devient très laborieuse.

5.4. MÉTHODE DE CRIBLAGE POUR UNE DIOXYGÉNASE AMÉLIORÉE

Un protocole utilisé dans les études décrites plus haut (Kumamaru *et al.*, 1998 ; Brühlmann et Chen, 1999) pour le criblage de clones capables de dégrader les BPC efficacement se base sur l'utilisation d'une réaction couplée pour convertir le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle en 2-hydro-6-oxo-6-phénylhexa-2,3-diénoate (HOPDA), qui est le composé résultant de la fission catalytique du cycle aromatique (figure 3.2). Le HOPDA étant un composé jaune intense, les colonies qui le produisent sont faciles à repérer. Pour appliquer ce protocole, les bactéries recevant le gène *bphA* muté expriment aussi les gènes *bphEFGBC* qui codent les enzymes nécessaires pour effectuer cette conversion. Cependant, on sait que le produit de *bphC*, la dioxygénase du 2,3-dihydroxybiphényle, est très spécifique et qu'elle ne peut pas catalyser la fission des métabolites portant des groupements hydroxyl en position *meta/para* (Barriault *et al.*, 1998). Ainsi tous les congénères BPC, dont le 2,2',5,5', tétrachlorobiphényle, que la dioxygénase du biphényle attaque en position *meta/para* ne peuvent pas être convertis en HOPDA. Ce blocage nous limite dans le choix des congénères BPC retenus pour faire le criblage des dioxygénases du biphényle hybrides. Par contre, nous avons démontré avec des enzymes purifiées que le produit de *bphB* la 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle-2,3-déshydrogénase est une enzyme très relaxe qui peut s'attaquer à un très grand nombre d'analogues du substrat, dont les métabolites portant des groupements hydroxyl en position *meta/para* (Barriault *et al.*, 1999 ; Vedadi *et al.*, 2000).

Cette observation nous a conduits à proposer un nouveau protocole simple pour la détection de mutants capables d'oxygéner un congénère BPC plus efficacement que le parent. Le protocole se base sur le fait que les catéchols, dont le 2,3-dihydroxybiphényle, sont instables lorsqu'exposés à l'air ambiant et se polymérisent pour prendre une coloration brunâtre après quelques heures d'exposition. Pour démontrer l'applicabilité de notre protocole, nous avons transformé une souche d'*Escherichia coli* avec les plasmides compatibles pDB31[*bphAE*] et pQE51[*bphFGB*]. Le plasmide pDB31[*bphAE*] permet d'exprimer le composant oxygénase portant une chaîne histidine à l'extrémité N-terminale de la chaîne α (Barriault et Sylvestre, 1999a) sous le contrôle du promoteur *lac*, inductible à l'IPTG. Les gènes *bphFGB* sur le plasmide pQE51 sont aussi induits par l'IPTG (Chebrou *et al.*, 1999). Lorsque les cellules de cette souche cultivées sur une membrane de nylon placée à la surface d'un milieu de culture solide sont induites à l'IPTG puis exposées à des vapeurs de biphényle, les colonies deviennent brunâtres en moins de deux heures d'exposition (planche 1). Les colonies d'une souche témoin portant pDB31 plus pQE51 [*bphFGB*] et incubée dans les mêmes conditions restent incolores après plusieurs heures d'incubation. Nous avons fait varier plusieurs facteurs

pour optimiser l'application de ce protocole. Des résultats reproductibles et évidents étaient obtenus lorsque nous utilisions le protocole suivant. Des cellules de *E. coli* portant pQE51[*bphFGB*] plus pDB31[*bphAE*] étaient inoculées à la surface d'une membrane de nylon placée sur une gélose LB (Sambrook *et al.*, 1989) contenant les antibiotiques appropriés pour maintenir les plasmides. La culture était incubée 18 heures à 37 °C puis la membrane portant les colonies développées était transférée sur une gélose LB fraîche contenant 0,5 mM d'IPTG. Les colonies étaient incubées à nouveau à 37 °C pendant 3 heures avant d'ajouter des cristaux de biphényle dans le couvercle de la boîte de Pétri. Les cultures étaient incubées pendant 1 à 2 heures à 37 °C puis examinées visuellement pour vérifier la couleur des colonies qui deviennent brunâtres lorsqu'exposées aux vapeurs de biphényle.

5.5. INGÉNIERIE DE LA DIOXYGÉNASE DU BIPHÉNYLE DE LA SOUCHE B-356 PAR RECOMBINAISON *IN VITRO* ALÉATOIRE

En se basant sur l'observation que les deux sous-unités, α et β , influencent la spécificité de la dioxygénase (Hurtubise *et al.*, 1998 ; Chebrou *et al.*, 1999), et en se basant sur le fait que la recombinaison aléatoire *in vitro* entre gènes homologues d'homologie restreinte nous permette d'explorer un plus grand nombre de structures moléculaires diverses, nous avons appliqué le protocole de recombinaison aléatoire *in vitro* pour créer des hybrides entre les gènes *bphAE* des souches LB400 et B-356. Cette approche a échoué. Sur un total d'environ 7000 hybrides testés, aucun n'était actif. De fait, comme nous l'avons mentionné plus haut, le fait d'explorer un grand nombre de structures a pour conséquence que plusieurs des nouvelles structures créées perdent leur fonction biologique. Ces résultats nous ont amenés à proposer une approche nouvelle, qui se base sur le fait que la partie C-terminale de la chaîne α a une très grande influence sur la spécificité de l'enzyme et qu'elle renferme des résidus d'acides aminés importants au niveau du site actif (Barriault *et al.*, 2002).

5.6. ANALYSE D'HYBRIDES OBTENUS EN REMPLAÇANT LA PARTIE C-TERMINALE DE LA CHAÎNE α DE LA DIOXYGÉNASE DE LB400 PAR CELLE DE B-356

Nous avons voulu vérifier s'il est possible de remplacer des fragments de la partie C-terminale de la dioxygénase du biphényle de la souche LB400 par ceux de la souche B-356 et *vice-versa*. La première étape a consisté à repérer des sites de restriction communs dans des positions identiques sur les gènes *bphA* des souches B-356 et LB400. Le site *Mlu*I se situe juste en amont de la région I et immédiatement en aval du centre Rieske

(figure 3.8), le site *ScaI* se situe en plein cœur de la région qui, par référence à la structure de la dioxygénase du naphthalène (Caredano *et al.*, 2000), serait impliquée dans le maintien du fer mononucléaire. Comme il n'existe pas de site commun à l'extrémité distale de ces gènes, nous les avons modifiés par mutagenèse dirigée, pour y introduire un site *AvrII* (figure 3.8). En utilisant ces trois sites, nous avons construit les 12 hybrides indiqués à la figure 3.8. Ces hybrides ont été clonés dans le vecteur pDB31 ou pQE31, qui sont des vecteurs conçus pour exprimer des protéines de fusion portant une étiquette histidine de façon à permettre leur purification rapide par chromatographie d'affinité (Hurtubise *et al.*, 1995 ; Barriault et Sylvestre, 1999a). Ces hybrides ont été purifiés et caractérisés pour déterminer leur spectre d'activité envers des congénères BPC sélectionnés. Le tableau 3.2 rapporte les résultats tirés de Barriault *et al.* (2002). Chaque enzyme paraissant sur ce tableau a été purifiée par chromatographie d'affinité de protéine portant une étiquette Histidine. L'activité envers le biphényle a été mesurée en évaluant la quantité de HOPDA produit à partir du biphényle dans une réaction couplée comprenant ht-BphB et ht-BphC selon un protocole publié précédemment (Hurtubise *et al.*,

Tableau 3.2
Activité de dioxygénases hybrides purifiées par chromatographie d'affinité de protéines recombinantes portant une étiquette Histidine

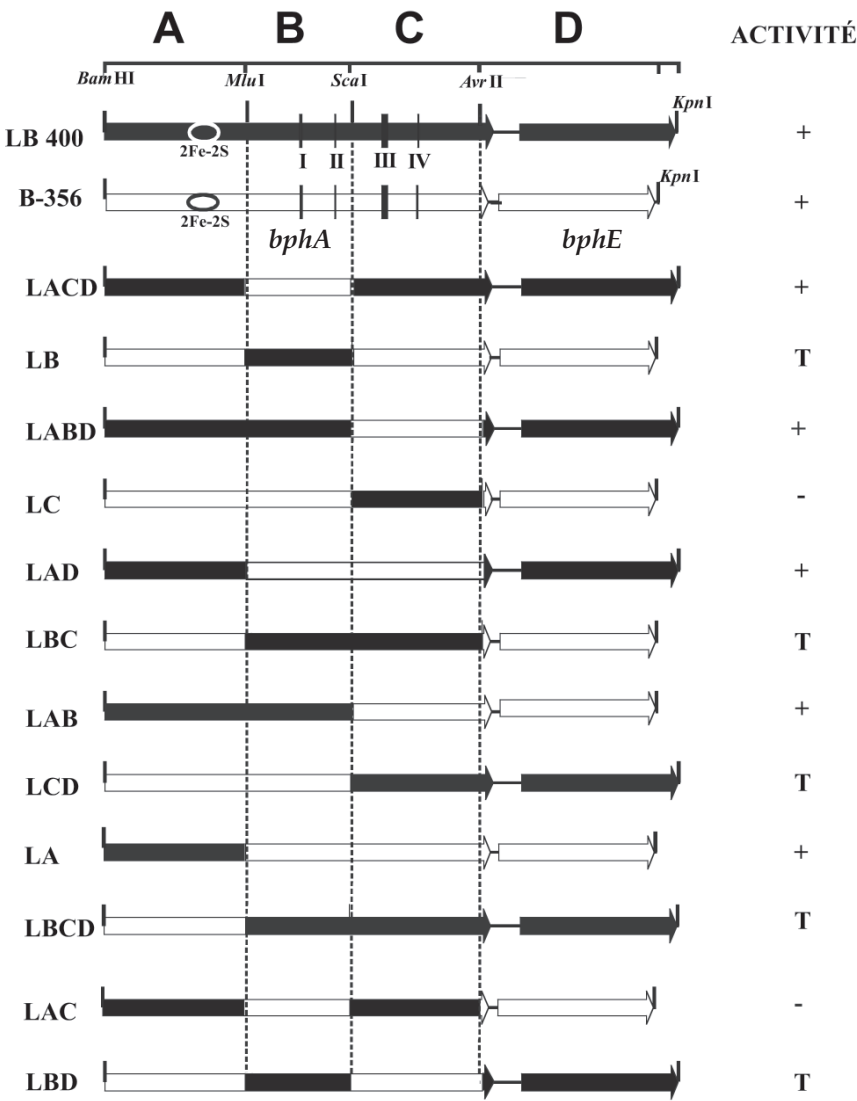
nmol de substrat consommé ou de métabolite produit/200 mg d'enzyme ^b					
Enzyme ^a	BPH	2,2'CB	3,3'CB	4,4'CB	2,2',5,5'-TCB
LB400	62,5 ± 10,0	34,2 ± 8	0	4,5 ± 10	33,2 ± 8
B-356	120,8 ± 16	4,6 ± 6	18,1 ± 7,2	0	0
LACD	15,5 ± 4,6	19,0 ± 4	0	9,9 ± 2,8	12,4 ± 5,6
LB	0	ND	ND	ND	0
LABD	10,8 ± 3,1	9,7 ± 2,7	17,3 ± 1,3	ND	T
LC	0	ND	ND	0	0
LAD	95 ± 19,6	11,9 ± 5,2	14,6 ± 2	0	T
LBC	2,7 ± 0,6	0	0	12,5 ± 2,9	0
LA	101,1 ± 5,4	0	15,2 ± 2	0	0
LBCD	3,2 ± 0,7	7,3 ± 2,9	0	8,6 ± 2,6	2,8 ± 1,7

a ht-ISP_{BPH} de LB400 et de B-356 sont exprimés à partir de gènes *bphA* mutants, ayant un site *AvrII* aux positions 1348 et 1354 respectivement, résultant en un changement d'Arg⁴⁵³ et d'Arg⁴⁵¹ par une Ser. Les autres enzymes sont des dioxygénases hybrides correspondant aux constructions apparaissant à la figure 3.8.

b (ND) Non déterminé. BPH, biphényle ; 2,2'CB, 3,3'CB et 4,4'CB. 2,2'-, 3,3'- et 4,4'-dichlorobiphényle ; 2,2',5,5'CB, 2,2',5,5'-tétrachlorobiphényle.

Figure 3.8

Constructions d'hybrides entre la dioxygénase de la souche LB400 et celle de la souche B-356 et leur activité envers le biphényle



Note: L'activité envers le biphényle a été mesurée en évaluant la capacité de l'enzyme purifiée à transformer le biphényle en HOPDA (de couleur jaune) dans une réaction couplée avec BphB et BphC.

1996). L'activité envers le 2,2',5,5'-tétrachlorobiphényle a été mesurée par HPLC en évaluant la production du métabolite dihydrodiol produit selon un protocole déjà publié (Barriault *et al.*, 1998). Ces données sont une moyenne de l'activité d'au moins deux préparations purifiées différentes \pm la déviation standard. Elles représentent une quantité de métabolite produit (pour le biphényle et le 2,2',5,5'-tétrachlorobiphényle) ou la quantité de substrat consommé (pour les 2,2'-, 3,3'- et 4,4'-dichlorobiphényles) 5 min après l'initiation de la réaction contenant 200 mg d'enzyme purifiée).

Il est intéressant de constater que les hybrides où la partie C-terminale de la chaîne α de la souche LB400 a été remplacée par la partie correspondante de la dioxygénase de B-356 (hybrides LACD, LABD, LAD) sont tous actifs tandis que les hybrides où la partie C-terminale de la chaîne α de B-356 a été remplacée par la partie correspondante de la dioxygénase de LB400 (hybrides LB, LC, LBC) sont très faiblement actifs. Des études de caractérisation des dioxygénases par filtration moléculaire ont montré que les deux sous-unités α et β de l'hybride LC ne peuvent pas s'assembler. Nous n'avons pas d'explication définitive pour l'inactivité des hybrides LB et LBC. Elle pourrait être attribuable soit à l'insolubilité des protéines et à leur incorporation dans des corps d'inclusion, soit au fait que le centre Rieske ne se reconstituerait pas correctement dans la cellule de *E. coli*. Quoi qu'il en soit, il est intéressant de constater que la dioxygénase de la souche LB400 semble pouvoir être plus flexible que la dioxygénase de B-356 et peut expérimenter plusieurs variations de structure dans la portion C-terminale sans que l'enzyme perde sa fonction. De fait, certains hybrides ont acquis des propriétés catalytiques (dégradation du 4,4'-dichlorobiphényle) qu'aucun des deux parents ne possédait. On peut sans doute imputer à ce phénomène le fait que la dioxygénase de LB400 soit la plus performante connue à ce jour.

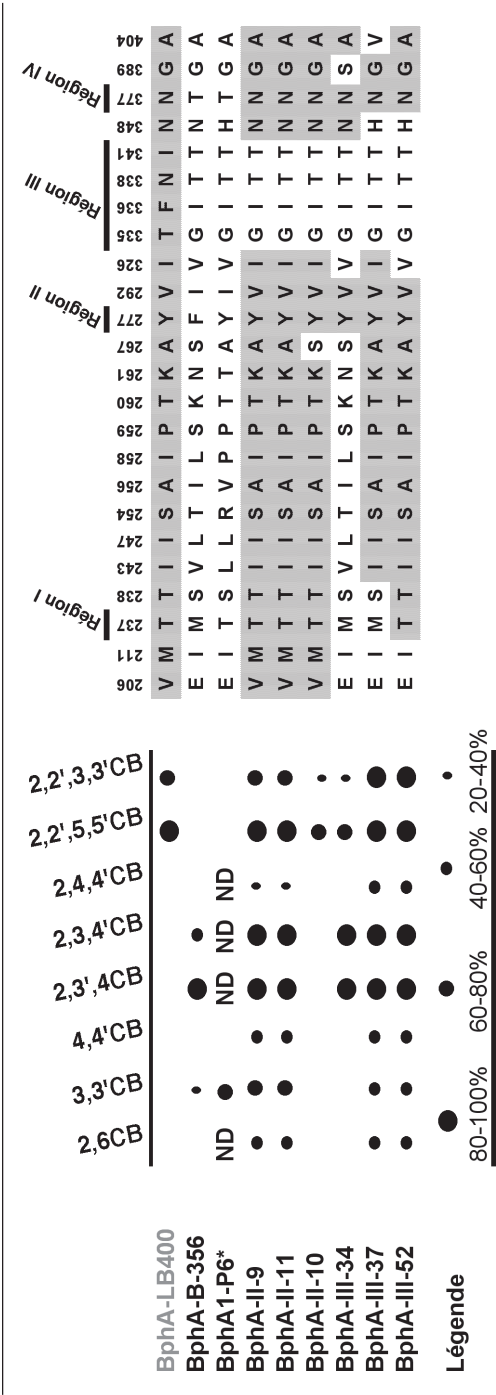
Ces résultats nous ont amenés à suggérer de tenter d'améliorer les capacités cataboliques de la dioxygénase de LB400 en modifiant par évolution moléculaire la partie C-terminale de la chaîne α de cette enzyme. L'avantage de cette approche est qu'on réduit le nombre total de séquences exploratoires à analyser et qu'on augmente d'autant nos chances de trouver des hybrides d'intérêt dans la progéniture. Nous avons appliqué le processus de l'évolution moléculaire *in vitro* aléatoire sur la partie distale des gènes *bphA* des souches LB400, B-356 et *Rhodococcus globerulus* P6 (Barriault *et al.*, 2002).

Les résultats sont très encourageants. En effet, déjà, les hybrides issus de la première progéniture montrent des activités catalytiques envers des congénères comme le 2,6-dichlorobiphényle, qu'aucune souche connue ne peut dégrader. L'analyse des séquences des variants obtenus révèle l'importance de la région III du domaine C-terminal de la sous-unité α de

la dioxygénase. Tous les variants présentés à la figure 3.9 ont un potentiel de dégradation des BPC plus élevé que les parents utilisés dans le procédé d'évolution *in vitro*. Les variants les plus actifs, II-9 et III-52, ont hérité de la presque totalité du gène *bphA* de LB400, sauf pour un court fragment qui correspond à la région III. En se basant sur la séquence de la dioxygénase du naphthalène pour laquelle la structure a été élucidée, les acides aminés de la région III de BphA (correspondant à ³¹⁰CSGVFKV³¹⁶ de la dioxygénase du naphthalène) seraient situés au sein de la poche catalytique. Ceci expliquerait leur influence sur la reconnaissance et la ligation du substrat par l'enzyme.

Il est intéressant de souligner qu'une analyse d'alignement de séquence BLASTP a montré que la séquence en acide aminé caractéristique de la région III de BphA de B-356 et de P6 (GINTIRT) est très semblable à la séquence en acides aminés de la région correspondante dans la sous-unité α de la plupart des dioxygénases du biphenyle dont la séquence est connue (une quinzaine) ainsi que la séquence des sous-unités α des dioxygénases du benzène, du toluène, de l'isopropylbenzène et de l'éthylbenzène. Considérant que la dioxygénase de LB400 est la seule portant la séquence TFNNIRI au niveau de la région III, il est curieux de constater que nos variants issus du procédé d'évolution moléculaire qui présentaient les plus hauts potentiels de dégradation des BPC étaient ceux qui, au niveau de la région III, présentaient la séquence typique des autres oxygénases. La dioxygénase de LB400 est la plus performante des dioxygénases d'origine naturelle. La question reste donc à savoir pourquoi la région III, qui est une région critique pour déterminer le potentiel d'activité envers les BPC, a subi autant une modification au cours de l'évolution chez cette dioxygénase. Une réponse possible est le fait que l'élargissement du spectre d'activité envers les congénères BPC se fait aux dépens de la spécificité de la réaction. Ainsi l'enzyme peut accepter un plus large spectre de substrats, mais l'arrimage du substrat au site actif de l'enzyme ne se fait pas selon une orientation optimale, conduisant à des réactions catalytiques infructueuses. Ce phénomène, qu'on nomme découplage, conduit à la perte d'électrons qui génère du peroxyde d'hydrogène dans le milieu réactionnel. Le peroxyde est un agent inhibiteur pour les dioxygénases et, de ce fait, est indésirable dans le milieu réactionnel. Pour démontrer ce phénomène, nous avons évalué l'activité du variant II-9 envers le 2,2'-dichlorobiphenyle lorsque la réaction est effectuée en présence et en absence de catalase, une enzyme qui catalyse la décomposition du peroxyde pour former de l'eau et de l'oxygène. L'activité était mesurée dans une réaction couplée en présence de tous les composants de la dioxygénase du biphenyle, de la 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyle 2,3-déshydrogénase et de la 2,3-dihydroxy-1,2-dioxygénase. Dans ces conditions, le substrat est converti en 2-hydroxy-6-oxo-6-phényl-2,4-diénoate,

Figure 3.9
Potentiel catalytique et alignements des séquences de variants de la dioxygénase du biphenyle obtenus par recombinaison *in vitro* aléatoire



Légende : À gauche, potentiel catalytique de différentes dioxygénases du biphenyle mesuré en : % de dégradation de différents congénères BPC obtenu par des cellules de *E. coli* DH11S exprimant ces dioxygénases. (N.B., les valeurs pour P6 ont été obtenues de préparations d'enzyme purifiée car cette dioxygénase n'est pas active dans *E. coli*). À droite : alignements des séquences de la portion distale des sous-unités α des dioxygénases parentales et variantes. Seules les positions pour lesquelles au moins un variant diffère de la séquence de BphA de LB400 sont montrées. L'alignement montre aussi les séquences des régions I, II, III et IV identifiées par Mondello *et al.* (1997).

Sources : Barriault *et al.*, 2002; Chebrou *et al.*, 1999.

qui est un composé jaune intense mesurable à 434 nm. Nous avons observé que toutes les conditions étant identiques, l'activité mesurée en présence de catalase était trois fois plus importante qu'en l'absence de catalase. Malgré une performance exceptionnelle de ce variant, la production de peroxyde affecte donc de façon significative son activité envers les BPC et pourrait causer de problèmes au niveau du métabolisme des bactéries qui l'exprime. Nous travaillons donc présentement à rechercher des variants qui, tout en étant exceptionnellement performants, présenteraient un niveau de découplage enzymatique minimal.

6. AUTRES ENZYMES DE LA VOIE CATABOLIQUE DU BIPHÉNYLE

6.1. LA 2,3-DIHYDRO-2,3-DIHYDROXYBIPHÉNYLE 2,3-DÉSHYDROGÉNASE

La seconde étape de la voie catabolique du biphenyle est catalysée par la 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle 2,3-déshydrogénase qui métabolise le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle en catéchol correspondant. L'enzyme est une flavoprotéine tétramérique (Sylvestre *et al.*, 1996a; Hulsmeier *et al.*, 1998) qui est codée par le gène *bphB*.

La 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle 2,3-déshydrogénase de la souche LB 400 a été cristallisée et sa structure élucidée (Hulsmeier *et al.*, 1998). Cette enzyme fait partie de la famille des déshydrogénase/réductase d'alcools à courtes chaînes. Comme les autres membres de cette famille le site actif comprend une triade d'acides aminés conservés (Ser, Tyr et Lys.). En se basant sur la structure de BphB de LB400, il a été suggéré que la triade catalytique de l'enzyme est composée des trois résidus conservés, Ser¹⁴², Tyr¹⁵⁵, et Lys¹⁵⁹ (Vedadi *et al.*, 2000).

Chaque résidu de la triade de BphB de B-356 a été remplacé par mutagenèse dirigée (Vidadi *et al.*, 2000) et s'avèrent tous cruciaux pour l'activité catalytique. De plus BphB de B-356 montra une préférence marquée envers le NAD(+) par rapport au NADP(+) (Vedadi *et al.*, 2000). Cette préférence est attribuable à la présence d'une aspartate en position 36 de la molécule. Une caractéristique importante de cette enzyme est sa très grande flexibilité à l'égard de sa capacité de catalyser une réaction de déshydrogénation sur une grande variété de substrats. Cette enzyme est capable de transformer un très grand nombre de métabolites hydroxylés des BPC, y compris les métabolites hydroxylés sur les positions *meta-para*. Cette enzyme ne présente donc pas de blocage majeur de la voie catabolique des BPC.

6.2. LA 2,3-DIHYDROXYBIPHÉNYLE 1,2-DIOXYGÉNASE

La troisième étape de la voie catabolique du biphenyle est catalysée par la 2,3-dihydroxybiphényle 1,2-dioxygénase qui catalyse l'ouverture du cycle aromatique selon un mode extradiol (figure 3.2). L'enzyme catalyse l'addition de deux atomes d'oxygène au noyau catéchol, provoquant la fission du cycle aromatique. Elle transforme le 2,3-dihydroxybiphényle en 2-hydroxy-6-oxo-6-phénylhexa-2,4-diénoate (HOPDA) (Eltis *et al.*, 1993 ; Furukawa et Arimura, 1987). Les dioxygénases qui catalysent l'ouverture du cycle aromatique selon le mode extradiol comportent un centre actif constitué d'un atome de fer (FeII) non hémique (Cerdan *et al.*, 1994 ; Han *et al.*, 1995).

Cette enzyme est très sensible à l'oxygène. C'est pourquoi, pour obtenir une préparation active, il faut effectuer les étapes de purification en condition anoxique (Eltis *et al.*, 1993). La 2,3-dihydroxybiphényl 1,2-dioxygénase de la souche *Burkholderia* sp. LB400 (Han *et al.*, 1995) et celle de *Pseudomonas* sp. KKS102 (Uragami *et al.*, 2001) ont été cristallisées et leur structure a été déterminée. L'enzyme est un homo-octamère. Chaque monomère renferme deux domaines (Han *et al.*, 1995). Chaque domaine comprend deux copies d'un même sous-domaine constitué de chaînes β et d'une hélice α formant la séquence $\beta\alpha\beta\beta$. Cette répétition de structure suggère que ce sous-domaine a été dupliqué à deux reprises au cours de l'évolution (Han *et al.*, 1995).

À ce jour nous reconnaissons deux propriétés importantes de cette enzyme qui influencent son activité catalytique à l'égard des métabolites hydroxylés des BPC. La première propriété est sa grande sensibilité à l'inhibition par le 3-chlorocatéchol (Hein *et al.*, 1998). Les mécanismes impliqués dans cette inhibition restent encore à élucider. Jusqu'à récemment, nous n'avions pas suffisamment de données pour vérifier si cette inhibition était causée par le 3-chlorocatéchol lui-même ou par son dérivé métabolique, le chloroformyl. Récemment, Vaillancourt *et al.* (2002) ont obtenu des faits montrant que le 3-chlorocatéchol inhibe directement l'enzyme en oxydant le fer (FeII) du site actif le transformant en fer (FeIII).

Des études antérieures effectuées avec *C. testosteroni* souche B-356 (Sondossi, Sylvestre et Ahmad, 1992), avec *Pseudomonas stutzeri* (Vrana *et al.*, 1996) ainsi qu'avec des populations bactériennes mixtes (Guilbeault *et al.*, 1994) ont contribué à démontrer l'importance de l'inhibition du 3-chlorocatéchol sur le métabolisme des BPC. Pour comprendre l'importance de cette inhibition, il faut rappeler que la voie catabolique du biphenyle convertit les congénères BPC en chlorobenzoates correspondants. Ainsi, plusieurs congénères comme le 3-chlorobiphényle sont d'abord convertis en 3-chlorobenzoate qui peut être transformé en 3-chlorocatéchol par les enzymes de la voie catabolique du benzoate, qui

est associée à celle du biphenyle. L'efficacité de transformation du 3-chlorobenzoate en 3-chlorocatéchol est très faible (Sondossi *et al.*, 1992). Cependant, à cause de la très grande sensibilité de la 2,3-dihydroxybiphényle 1,2-dioxygénase à cette inhibition, la quantité de 3-chlorocatéchol générée au cours du processus de dégradation du 3-chlorobiphényle est suffisante pour complètement inhiber l'enzyme (Hein *et al.*, 1998) (figure 3.10). Il va sans dire que la présence, dans un mélange de BPC, de 3-chlorobiphényle ou d'autres congénères qui peuvent être convertis en 3-chlorocatéchol inhibe de façon indirecte la dégradation des autres congénères du mélange. Heureusement, il est possible de résoudre ce problème d'inhibition en s'assurant que les chlorobenzoates formés au cours de la dégradation des BPC soient dégradés rapidement. Ainsi de multiples travaux ont démontré que, par génie génétique, il est possible d'ajouter à des bactéries capables de dégrader les BPC de nouvelles voies capables de dégrader les chlorocatéchols de façon efficace. Dans tous ces exemples, les bactéries modifiées obtenues étaient capables de dégrader les BPC de façon efficace sans être affectées par l'inhibition causée par le chlorocatéchol (Mokross *et al.*, 1990 ; Havel et Reineke, 1993 ; Adams *et al.*, 1992 ; Hrywna *et al.*, 1999).

La seconde propriété de la 2,3-dihydroxybiphényle 1,2-dioxygénase qui affecte la dégradation des BPC est l'incapacité de cette enzyme à catalyser l'ouverture des dihydroxybiphényles portant les groupements hydroxyl en positions 3 et 4 (Eltis *et al.*, 1993 ; Taira *et al.*, 1988 ; Hein *et al.*, 1998). Une conséquence importante de ce constat est que les congénères BPC qui, comme le 2,2',5,5'-tétrachlorobiphényle, sont oxygénés en positions 3 et 4 par la dioxygénase du biphenyle nécessiteront une voie alternative pour se dégrader complètement. Heureusement, la 1,2-dihydroxynaphtalène 1,2-dioxygénase, qui catalyse une étape homologue à celle de la 2,3-dihydroxybiphényle 1,2-dioxygénase dans la voie catabolique du naphthalène, est capable de catalyser l'ouverture du cycle aromatique du 3,4-dihydroxybiphényle (Barriault *et al.*, 1998). Bien que l'ouverture du cycle aromatique du 3,4-dihydroxybiphényle par la 1,2-dihydroxynaphtalène dioxygénase soit peu efficace, il est possible de modifier cette enzyme par génie génétique pour augmenter son potentiel d'activité envers ce nouveau substrat. En somme, malgré que l'étape catabolique catalysée par la 2,3-dihydroxybiphényle 1,2-dioxygénase comporte plusieurs problèmes susceptibles de nuire à une dégradation efficace des BPC, les données de la littérature sont plutôt optimistes quant aux pronostics de résolution de ces problèmes par ingénierie génétique.

6.3. HYDROLASE DU HOPDA

La dernière étape de la voie catabolique du biphényle est une réaction d'hydrolyse catalysée par la HOPDA hydrolase. La HOPDA hydrolase de *Rhodococcus* sp. RHA1 a été cristallisée (Nandhagopal *et al.*, 2001). L'enzyme est un octamère comportant 422 points de symétrie (Nandhagopal *et al.*, 2001). Le site actif est situé au sein du domaine de liaison avec le substrat. Ce domaine comporte des régions hydrophobes et hydrophiles (Nandhagopal *et al.*, 2001).

Des travaux récents rapportent la caractérisation biochimique de la HOPDA hydrolase de *Burkholderia* sp. LB400. De façon générale, les chloroHOPDA portant des atomes de chlore sur le noyau phényl sont de bons substrats pour cette enzyme (Seah *et al.*, 2000). Cependant, les 3- et 4-chloroHOPDA sont de mauvais substrats et des inhibiteurs compétitifs pour l'enzyme (Seah *et al.*, 2001). Une conséquence importante de ce constat est que plusieurs congénères BPC portant des atomes de chlore sur chaque noyau du cycle biphényle seront convertis en chloroHOPDA qui ne pourront pas être dégradés davantage. C'est le cas par exemple du 4,4'-dichlorobiphényle. D'autre part, une comparaison du potentiel catalytique de la HOPDA hydrolase de la souche LB400 avec celui de la HOPDA hydrolase de *R. globerulus* P6 montre que contrairement à l'enzyme de LB400, celle de P6 est plus spécifique envers le 9- et le 10-chloroHOPDA. De plus la HOPDA hydrolase de P6 est plus fortement inhibée par le 4-chloroHOPDA que par le 3-chloroHOPDA tandis qu'au contraire, la HOPDA hydrolase de LB400 est plus fortement inhibée par le 3-chloroHOPDA que par le 4-chloroHOPDA (Seah *et al.*, 2001). Ce constat permet d'espérer que par génie génétique, il sera possible de repérer les domaines de l'enzyme déterminant la liaison avec les chloroHOPDA et de moduler ces domaines pour augmenter l'efficacité de la conversion des substrats chlorés et réduire leur effet inhibiteur.

7. APPLICATION DES ORGANISMES MODIFIÉS GÉNÉTIQUEMENT DANS DES PROCÉDÉS DE DÉCONTAMINATION

7.1. EXPRESSION ET FONCTIONNALITÉ DES ENZYMES MODIFIÉES

Bien que l'ingénierie d'enzymes soit essentielle pour développer des bactéries capables de dégrader les POP, d'autres manipulations sont aussi nécessaires. En effet, que ce soit une dioxygénase plus performante ou n'importe quelle des autres enzymes de la voie de dégradation, il faudra que ces nouvelles enzymes soient rassemblées dans une souche bactérienne où elles seront fonctionnelles. L'implantation de bactéries développées

en laboratoire sur des sites contaminés, particulièrement des bactéries modifiées génétiquement, nécessite un certain nombre de prémisses. En premier lieu, il est nécessaire de s'assurer que les bactéries implantées puissent être viables, qu'elles puissent exprimer les gènes d'intérêt et qu'elles survivent dans leur nouveau milieu, pendant au moins le temps nécessaire au traitement.

L'expression des enzymes dans le milieu environnant est critique au succès d'un biotraitement. Si les enzymes ne sont pas exprimées ou si elles sont exprimées incorrectement dans les bactéries qui les expriment, le traitement échouera. Le choix des bactéries pour le traitement est donc très important. Pour l'instant, c'est la bactérie *E. coli* qui est la plus utile pour faire des manipulations génétiques à cause du grand nombre d'outils moléculaires qui ont été développés et adaptés à cette bactérie. Cependant, cette bactérie est mal adaptée pour vivre dans un écosystème environnemental comme l'eau ou le sol. De plus, nous avons des preuves que pour des raisons encore inexpliquées, le centre Rieske de certaines dioxygénases recombinantes n'est pas reconstitué correctement chez *E. coli* tandis qu'il l'est chez *Pseudomonas putida* (Chebrou *et al.*, 1999). Ce sont les bactéries aérobies strictes comme les bactéries des genres *Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Comamonas*, *Alcaligenes* et quelques autres qui sont le mieux adaptées aux procédés de biotraitement (Liu et Suflita, 1993) et qui peuvent le mieux exprimer les protéines recombinantes. Ces bactéries possèdent déjà plusieurs voies cataboliques pour la dégradation des composés xénobiotiques. De plus, ces bactéries produisent des agents tensioactifs qui augmentent la biodisponibilité des composés lipophiles (Banat, 2000). Enfin ces bactéries peuvent survivre très longtemps dans un environnement non favorable (Guerin et Boyd, 1995 ; van Veen, 1997 ; Molina *et al.*, 2000). Cependant, les outils moléculaires pour le génie génétique (plasmides vecteurs, plasmides d'expression, systèmes de régulation de gènes, etc.) sont moins développés chez ce groupe bactérien. Des travaux sont en cours dans plusieurs laboratoires pour développer des outils facilitant l'expression de protéines recombinantes chez ces bactéries (Blatny *et al.*, 1997a, 1997b ; Schweizer, 1995).

D'autre part, l'expression des gènes étant sous le contrôle de systèmes de régulation, nous savons que la voie catabolique des BPC n'est pas induite par les BPC. Le biphényle est nécessaire dans le milieu ambiant pour que les enzymes de la voie soient exprimées (Barriault et Sylvestre, 1993). Présentement, chez *E. coli*, plusieurs promoteurs sont utilisés pour contrôler artificiellement l'expression des gènes clonés. Deux promoteurs fréquemment utilisés sont le promoteur *lac* induit à l'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) et le promoteur T7 induit par la chaleur. Cependant ces promoteurs, autant que celui de la voie du biphényle, ne

sont pas applicables dans des procédés de biotraitements, pour des considérations financières ou pratiques. En effet, l'IPTG est un composé labile et très coûteux, et il ne serait certes pas souhaitable de répandre du biphényle dans l'environnement pour induire la voie de dégradation des BPC.

Il existe cependant des alternatives. D'une part, le système de régulation des enzymes de l'opéron *xyI*/ responsable de la transformation du xylène en benzoate a été élucidé (Kaldalu *et al.*, 2000 ; Garmendia et deLorenzo, 2000 ; Duetz *et al.*, 1996 ; Kessler *et al.*, 1994) et appliqué à la construction de nombreux systèmes d'expression (Blatny *et al.*, 1997a ; Blatny *et al.*, 1997b ; Panke *et al.*, 1998 ; deLorenzo *et al.*, 1993). L'effecteur de la protéine régulatrice XylS qui se lie au promoteur P_m pour induire l'opéron *xyI* est le benzoate ou le méthylbenzoate qui sont des composés facilement dégradables et peu toxiques. Ce système de régulation serait un candidat possible pour contrôler l'expression des enzymes modifiées, impliquées dans la dégradation des BPC. D'autres alternatives sont aussi envisagées. Entre autres, il a été démontré que par manipulation génétique, il est possible de changer la spécificité des protéines régulatrices envers leur effecteur (Skarfstad *et al.*, 2000 ; Wise et Kuske, 2000 ; deLorenzo et Pérez-Martin, 1996). Ainsi, il serait possible de changer la spécificité de XylS pour qu'elle soit activée par une molécule naturelle, comme par exemple une flavonoïde, qui est un métabolite de plante, plutôt que par le benzoate. Un tel système d'expression serait moins dommageable pour l'environnement et plus économique, puisque l'effecteur servant à induire la voie de dégradation de polluants, comme les BPC pourrait être produit *in situ* à partir de plantes semées sur le site contaminé.

7.2. SURVIE DES ORGANISMES MODIFIÉS GÉNÉTIQUEMENT

Présentement, l'utilisation d'organismes modifiés génétiquement fait l'objet d'une législation très sévère au Canada. La loi exige qu'avant d'utiliser un organisme modifié génétiquement dans un procédé ouvert sur l'environnement, comme dans le cas d'un système de traitement de sol ou d'eau *in situ*, il est nécessaire de faire la démonstration que cet organisme ne se répandra pas dans l'environnement, qu'il ne causera pas de dommage à l'écosystème dans lequel il a été implanté, et enfin qu'il n'affectera pas la biodiversité des espèces qui se trouvent dans cet écosystème. L'application d'organismes modifiés génétiquement pour les biotraitements *in situ* semble très contingentée, notamment en ce qui a trait aux possibilités de transfert génétique horizontal (Nielsen *et al.*, 2000) des gènes modifiés, transfert à des organismes peu apparentés à la bactérie implantée. Bien que nous ayons maintenant en main plusieurs outils nous permettant de suivre le transfert des gènes modifiés entre les différents

organismes présents dans la nature, les études en ce sens ne font que débiter (Ripp *et al.*, 2000 ; Layton *et al.*, 1998 ; Thiem *et al.*, 1994 ; Sarand *et al.*, 2001 ; Poelarends *et al.*, 2000 ; Peters *et al.*, 2000 ; Theron et Cloete, 2000 ; Molina *et al.*, 2000). Pour cette raison, dans un avenir prévisible, il est peu probable que des organismes modifiés servent à des procédés de biotraitement *in situ*. Par contre ces bactéries peuvent servir dans des procédés de traitement en bioréacteurs clos. Ces procédés sont plus onéreux que les procédés *in situ*, mais ils restent moins coûteux que les procédés chimiques et plus intéressants sur le plan environnemental que le simple lavage des sites par des solvants organiques ou le transport vers des sites d'entreposage (Doucet, 1999 ; Glass, 1999 ; Glass, 1993). Par exemple, on estime que l'incinération coûte en moyenne 1000 \$ US/m³, les procédés de solidification/stabilisation coûtent environ 150 \$ US/m³, les lavages de sols coûtent entre 50 et 95 \$ US/m³ et ces procédés conduisent à une dégradation souvent irréversible du sol, alors que la bioréhabilitation coûte entre 10 et 50 \$ US/m³ (Doucet, 1999 ; Environmental Science Group of the PIAS, <www.sway.com>).

Il est possible d'augmenter le niveau de sécurité des bactéries modifiées génétiquement dans des bioréacteurs. En effet, des travaux récents ont montré la faisabilité de l'usage de gènes suicides pour tuer les bactéries implantées dans un nouvel environnement (Jensen *et al.*, 1993 ; Molina *et al.*, 1998). Les protéines de la famille HG sont de petites protéines (environ 50 acides aminés) ; cette famille comprend entre autres les protéines Gef et Hok qu'on retrouve chez toutes les bactéries (Gerdes, *et al.*, 1990 ; Poulsen *et al.*, 1991). Ces protéines toxiques comportent une portion N-terminale hydrophobe qui traverse la membrane cytoplasmique. Lorsqu'elles sont surexprimées, ces protéines tuent les cellules en fragilisant leur membrane. La fonction exacte de ces protéines est inconnue, mais il est suggéré qu'elles fassent partie d'un système complexe de programmation de la mort des cellules. Ce qui est intéressant, c'est qu'en assujettissant le gène *gef* à un système de régulation spécifique, il est possible de contrôler son expression et la mort des cellules implantées dans un sol (Molina *et al.*, 1998) ou en bioréacteur.

Avec l'avènement de la génomique et surtout de la protéomique, un grand nombre de nouveaux gènes et de nouvelles fonctions biologiques seront dévoilés dans les prochaines années. Parmi ceux-ci, on trouvera certainement de nouveaux outils pour améliorer les systèmes de confinement biologique des bactéries modifiées génétiquement. Cependant, entre temps, il est évident qu'on doit respecter sévèrement les règlements adoptés dans la plupart des pays industriels au sujet de l'usage des organismes modifiés génétiquement dans l'environnement. En effet, les risques associés à leur usage restent à déterminer précisément. Le principal risque

reste que la dissémination dans l'environnement de la bactérie supplante les autres espèces et cause ainsi des dommages à la biodiversité. L'autre risque important est la dissémination du nouveau gène introduit dans l'environnement et son effet sur les populations. C'est à ce niveau que la génomique, la protéomique et les méthodes utilisant des micropuces pour le criblage ou la détection de gènes ainsi que pour évaluer leur dissémination dans l'environnement seront d'une grande utilité. On connaît encore très mal les mécanismes de transfert horizontal des gènes et la conséquence de ces transferts chez les espèces. Ainsi un nouveau gène bactérien responsable de la dégradation d'un polluant comme les BPC pourrait s'il était transféré chez une plante, causer la production de métabolites qui auraient des effets néfastes sur la viabilité de cette plante. Dans quelques années, nous devrions avoir une image beaucoup plus précise des mécanismes de transfert de gènes et des risques réels qui y sont associés. Une connaissance de ces mécanismes nous permettra alors d'élaborer des stratégies visant à prévenir le transfert des gènes nouveaux implantés dans une niche écologique. Cependant, d'ici là, la prudence devrait être le mot d'ordre. C'est exactement l'attitude des instances gouvernementales actuelles.

8. CONCLUSION

Il est clair que le développement de procédés biologiques efficaces pour la dépollution de POP nécessitera le développement d'organismes modifiés génétiquement. À ce jour, plusieurs laboratoires ont fait des efforts pour mieux comprendre comment évoluent les voies cataboliques microbiennes, principales responsables du recyclage de la matière organique. Ces études sont rendues possibles grâce à l'apport des nouveaux outils moléculaires que nous fournit la biologie moléculaire. On pense entre autres aux techniques d'isolement et de clonage de gènes aussi bien qu'aux techniques permettant l'expression des protéines clonées en très grande quantité. On pense également aux techniques permettant de générer des mutations ciblées au sein des gènes pour créer de nouvelles protéines dont on connaît la nature exacte des modifications structurales apportées.

Dans ce chapitre, nous avons décrit l'exemple de l'étude d'une enzyme d'importance capitale dans le recyclage de la matière organique et en particulier pour la dégradation des composés polluants persistants comme les BPC et le HAP. Il s'agit de la dioxygénase, qui effectue la première réaction d'activation de la molécule pour augmenter sa réactivité et faciliter sa dégradation biologique. L'application d'outils moléculaires nous a permis d'identifier certains déterminants de la spécificité de cette

enzyme envers les congénères BPC et d'élaborer des stratégies pour augmenter son potentiel catabolique envers les BPC. Cette approche peut aussi être appliquée pour l'ingénierie des autres enzymes nécessaires à la dégradation des BPC dont nous avons décrit certaines caractéristiques principales. La voie est maintenant ouverte pour le développement de procédés biologiques efficaces pour la dégradation des POP. Néanmoins, l'application de cette technologie à des procédés environnementaux nécessitera encore plusieurs années d'efforts de recherche, d'une part pour optimiser le processus et, d'autre part, pour assurer l'utilisation sécuritaire des bactéries modifiées génétiquement.

RÉFÉRENCES

- ABRAMOWICZ, D.A. (1994). « Aerobic PCB biodegradation and anaerobic PCB dechlorination in the environment », *Research in Microbiology*, vol. 145, n° 1, p. 42-46.
- ABRAMOWICZ, D.A. et D.R. OLSON (1995). « Accelerated biodegradation of PCBs », *Chemtech*, vol. 25, n° 7, p. 36-41.
- ADAMS, R.H., C.M. HUANG, F.K. HIGSON, V. BRENNER et D.D. FOCHT (1992). « Construction of a 3-chlorobiphenyl-utilizing recombinant from an intergeneric mating », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 58, n° 2, p. 647-654.
- AHMAD, D., R. MASSÉ et M. SYLVESTRE (1990). « Cloning and expression of genes involved in 4-chlorobiphenyl transformation by *Pseudomonas testosteroni*: Homology to polychlorobiphenyl-degrading genes in other bacteria », *Gene*, vol. 86, n° 1, p. 53-61.
- AHMAD, D., M. SYLVESTRE, et M. SONDOSSI (1991a). « Subcloning of *bph* genes from *Pseudomonas testosteroni* B-356 in *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*: Evidence for dehalogenation during initial attack on chlorobiphenyls », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, n° 10, p. 2880-2887.
- AHMAD, D., M. SYLVESTRE, M. SONDOSSI et R. MASSÉ (1991b). « Bioconversion of 2-hydroxy-6-oxo-6-(4'-chlorophenyl)hexa-2,4-dienoic acid, the *meta*-cleavage product of 4-chlorobiphenyl », *Journal of General Microbiology*, vol. 137, n° 6, p. 1375-1385.
- ALEXANDER, M. (1973). « Nonbiodegradable and other recalcitrant molecules », *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 15, p. 611-647.
- ALEXANDER, M. (2000). « Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants », *Environmental Science and Technology*, vol. 34, n° 20, p. 4259-4265.
- ARCARO, K.F., L.D. YI, R.F. SEEGAL, D.D. VAKHARIA, Y. YANG, D.C. SPINK, K. BROSCHE et J.F. GIERTHY (1999). « 2,2',6,6'-tetrachlorobiphenyl is estrogenic *in vitro* and *in vivo* », *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 72, n° 1, p. 94-102.
- BANAT, I.M. (2000). « Les biosurfactants, plus que jamais sollicités », *Biofutur*, vol. 2000, n° 198, p. 44-47.
- BARRIAULT, D., J. DURAND, H. MAAROUFI, L.D. ELTIS et M. SYLVESTRE (1998). « Degradation of polychlorinated biphenyl metabolites by naphthalene-catabolizing enzymes », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, n° 12, p. 4637-4642.
- BARRIAULT, D., M.M. PLANTE et M. SYLVESTRE (2002). « Family shuffling of a targeted *bphA* region to engineer biphenyl dioxygenase », *Journal of Bacteriology*, vol. 184, n° 14, p. 3794-3800.
- BARRIAULT, D. et M. SYLVESTRE (1993). « Factors affecting PCB degradation by an implanted bacterial strain in soil microcosms », *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 39, n° 6, p. 594-602.
- BARRIAULT, D. et M. SYLVESTRE (1999a). « A ColE1-compatible expression vector for the production of His-tagged fusion proteins », *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 75, n° 4, p. 293-7.
- BARRIAULT, D. et M. SYLVESTRE (1999b). « Functionality of biphenyl 2,3-dioxygenase components in naphthalene 1,2-dioxygenase » *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 51, n° 5, p. 592-597.
- BARRIAULT, D., M. VEDADI, J. POWLOWSKI et M. SYLVESTRE (1999). « *cis*-2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl dehydrogenase and *cis*-1,2-dihydro-1,2-dihydroxynaphthalene dehydrogenase catalyze dehydrogenation of the same range of substrates », *Biochemical and Biophysical Research Communication*, vol. 260, n° 1, p. 181-187.
- BEDARD, D.L., R. UNTERMAN, L.H. BOPP, M.J. BRENNAN, M.L. HABERL et C. JOHNSON (1986). « Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 51, n° 4, p. 761-768.

- BILLINGSLEY, K.A., S.M. BACKUS et O.P. WARD (1999). « Effect of surfactant solubilization on biodegradation of polychlorinated biphenyl congeners by *Pseudomonas* LB400 », *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 52, n° 2, p. 255-260.
- BLATNY, J.M., T. BRAUTASET, H.C. WINTHER-LARSEN, K. HAUGAN et S. VALLA (1997a). « Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, n° 2, p. 9370-9739.
- BLATNY, J.M., T. BRAUTASET, H.C. WINTHER-LARSEN, P. KARUNAKARAN et S. VALLA (1997b). « Improved broad-host-range RK2 vectors useful for high and low regulated gene expression levels in gram-negative bacteria », *Plasmid*, vol. 38, n° 1, p. 5135-5151.
- BOLLAG, J.M. (1992). « Decontaminating soil with enzymes. », *Environmental Science and Technology*, vol. 26, n° 10, p. 1876-1881.
- BOONCHAN, S., M.L. BRITZ et G.A. STANLEY (1998). « Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* », *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 59, n° 4, p. 482-494.
- BROADUS, R.M. et J.D. HADDOCK (1998). « Purification and characterization of the NADH : FerredoxinBPH oxidoreductase component of biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400 », *Archive of Microbiology*, vol. 170, n° 2, p. 106-121.
- BRÜHLMANN, F. et W. CHEN (1999). « Tuning biphenyl dioxygenase for extended substrate specificity », *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 63, p. 544-551.
- BRUNSTROM, B. et K. HALLDIN (2000). « Ecotoxicological risk assessment of environmental pollutants in the Arctic », *Toxicology Letters*, vol. 112, p. 111-118.
- CARREDANO, E., A. KARLSSON, B. KAUPPI, D. CHOUDHURY, R.E. PARALES, J.V. PARALES, K. LEE, D.T. GIBSON, H. EKLUND et S. RAMASWAMY (2000). « Substrate binding site of naphthalene 1,2-dioxygenase : Functional implications of indole binding », *Journal of Molecular Biology*, vol. 296, n° 2, p. 701-712.
- CERDAN, P., A. WASSERFALLEN, M. REKIK, K.N. TIMMIS et S. HARAYAMA (1994). « Substrate specificity of catechol 2,3-dioxygenase encoded by TOL plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida* and its relationship to cell growth », *Journal of Bacteriology*, vol. 176, n° 19, p. 6074-6081.
- CHEBROU, H., Y. HURTUBISE, D. BARRIAULT et M. SYLVESTRE (1999). « Heterologous expression and characterization of the purified oxygenase component of *Rhodococcus globerulus* P6 biphenyl dioxygenase and of chimeras derived from it », *Journal of Bacteriology*, vol. 181, n° 16, p. 4805-4811.
- COLBERT, C.L., M.M. COUTURE, L.D. ELTIS et J.T. BOLIN (2000). « A cluster exposed : Structure of the Rieske ferredoxin from biphenyl dioxygenase and the redox properties of Rieske Fe-S proteins », *Structure Fold Design*, vol. 8, n° 12, p. 1267-1278.
- CRAMERI, A., S.A. RAILLARD, E. BERMUDEZ et W.P. STEMMER (1998). « DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution », *Nature*, vol. 391, n° 6664, p. 1288-1291.
- DAUBARAS, D.L., C.E. DANGANAN, A. HUBNER, R.W. YE, W. HENDRICKSON et A.M. CHAKRABARTY (1996). « Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by *Burkholderia cepacia* strain AC1100 : Evolutionary insight », *Gene*, vol. 179, n° 1, p. 1-8.
- DE LORENZO, V., S. FERNANDEZ, M. HERRERO, U. JAKUBZIB et K.N. TIMMIS (1993). « Engineering of alkyl- and haloaromatic-responsive gene expression with mini-transposons containing regulated promoters of biodegradative pathways of *Pseudomonas* », *Gene*, vol. 130, n° 1, p. 41-46.
- DE LORENZO, V. et J. PÉREZ-MARTIN (1996). « Regulatory noise in prokaryotic promoters : How bacteria learn to respond to novel environmental signals », *Molecular Microbiology*, vol. 19, n° 7, p. 1177-1184.
- DOUCET, C. (1999). *La bioremédiation moléculaire, rapport d'étude*, Ambassade de France aux États-Unis.

- DUETZ, W.A., S. MARQUES, B. WIND, J.L. RAMOS et J.G. VANANDEL (1996). « Catabolite repression of the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* harboring pWWO under various conditions of nutrient limitation in chemostat culture », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, n° 2, p. 601-606.
- ECKENFELDER, W.W. et J.L. MUSTERMAN (1995). *Activated-sludge Treatment of Industrial Wastewater*, Lancaster, PA, Technomic.
- EDGINGTON, S.M. (1994). « Environmental biotechnology », *Bio-Technology*, vol. 12, n° 13, p. 1338.
- EILERS, A., E. RUNGELING, U.M. STUNDL et G. GOTTSCHALK (1999). « Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* DSM 3375 depends on cytochrome P-450 », *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 53, n° 1, p. 75-80.
- ELTIS, L.D., B. HOFMANN, H.J. HECHT, H. LUNSDORF et K.N. TIMMIS (1993). « Purification and crystallization of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268 n° 4, p. 2727-2732.
- ERICKSON, B.D. et F.J. MONDELLO (1992). « Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400 », *Journal of Bacteriology*, vol. 174, n° 9, p. 2903-2912.
- ERICKSON, B.D. et F.J. MONDELLO (1993). « Enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls after site-directed mutagenesis of a biphenyl dioxygenase gene », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, n° 11, p. 3858-3862.
- FAIN, M.G. et J.D. HADDOCK (2001). « Phenotypic and phylogenetic characterization of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) sp. strain LB400 », *Current Microbiology*, vol. 42, n° 4, p. 269-275.
- FURUKAWA, K. (1982). « Microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) », dans A.M. Chakrabarty (dir.), *Biodegradation and Detoxification of Environmental Pollutants*, Boca Raton, FL, CRC Press, p. 34-57.
- FURUKAWA, K. et N. ARIMURA (1987). « Purification and properties of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from polychlorinated biphenyl-degrading *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and *Pseudomonas aeruginosa* carrying the cloned *bphC* gene », *Journal of Bacteriology*, vol. 169, n° 2, p. 924-927.
- FURUKAWA, K. et A.M. CHAKRABARTY (1982). « Involvement of plasmids in total degradation of chlorinated biphenyls », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 44, n° 3, p. 619-626.
- FURUKAWA, K., S. HAYASHIDA et K. TAIRA (1992). « Biochemical and genetic basis for the degradation of polychlorinated biphenyls in soil bacteria », dans E. Galli *et al.* (dir.), *Pseudomonas Molecular Biology and Biotechnology*, Washington, American Society for Microbiology, p. 259-267.
- FURUKAWA, K., J. HIROSE, A. SUYAMA, T. ZAIKI et S. HAYASHIDA (1993). « Gene components responsible for discrete substrate specificity in the metabolism of biphenyl (*bph* operon) and toluene (*tod* operon) », *Journal of Bacteriology*, vol. 175, n° 16, p. 5224-5232.
- FURUKAWA, K., K. TONOMURA et A. KAMIBAYASHI (1978). « Effect of chlorine substitution on the biodegradability of polychlorinated biphenyls », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 35, n° 2, p. 223-227.
- GARMENDIA, J. et V. DELORENZO (2000). « The role of the interdomain B linker in the activation of the XylR protein of *Pseudomonas putida* », *Molecular Microbiology*, vol. 38, n° 2, p. 401-410.
- GERDES, K., L.K. POULSEN, T. THISTED, A.K. NIELSEN, J. MARTINUSSEN et P.H. ANDREASEN (1990). « The *hok* killer gene family in gram-negative bacteria », *New Biology*, vol. 2, n° 9, 946-956.
- GIBSON, D.T., D.L. CRUDEN, J.D. HADDOCK, G.J. ZYLSTRA et J.M. BRAND (1993). « Oxidation of polychlorinated biphenyls by *Pseudomonas* sp. strain LB400 and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 », *Journal of Bacteriology*, vol. 175, n° 14, p. 4561-4564.

- GLASS, D.J. (1993). « Commercialization of soil microbial technologies », dans F.B. Metting Jr. (dir.), *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*, New York, Marcel Dekker, p. 595-618.
- GLASS, D.J. (1999). *US and International Markets for Phytoremediation, 1999-2000*, Needham, MA, D. Glass Associates.
- GUERIN, W.F. et S.A. BOYD (1995). « Maintenance and induction of naphthalene degradation activity in *Pseudomonas putida* and an *Alcaligenes* sp. under different culture conditions », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, n° 11, p. 4061-4068.
- GUILBEAULT, B., M. SONDOSSI, D. AHAMAD et M. SYLVESTRE (1994). « Factors affecting the enhancement of PCB degradative ability of soil microbial populations », *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 33, n° 1, p. 73-91.
- HADDOCK, J.D. et D.T. GIBSON (1995). « Purification and characterization of the oxygenase component of biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400 », *Journal of Bacteriology*, vol. 177, n° 20, p. 5834-5839.
- HADDOCK, J.D., J.R. HORTON et D.T. GIBSON (1995). « Dihydroxylation and dechlorination of chlorinated biphenyls by purified biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400 », *Journal of Bacteriology*, vol. 177, n° 1, p. 20-26.
- HADDOCK, J.D., L.M. NADIM et D.T. GIBSON (1993). « Oxidation of biphenyl by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain LB400 », *Journal of Bacteriology*, vol. 175, n° 2, p. 395-400.
- HAN, S., L.D. ELTIS, K.N. TIMMIS, S.W. MUCHMORE, et J.T. BOLIN (1995). « Crystal structure of the biphenyl-cleaving extradiol dioxygenase from a PCB-degrading pseudomonad », *Science*, vol. 270, n° 5238, p. 976-980.
- HAVEL, J. et W. REINEKE (1993). « Degradation of Aroclor 1221 in soil by a hybrid pseudomonad », *FEMS Microbiology Letters*, vol. 108, n° 2-3, p. 211-218.
- HAWARI, J., A. HALASZ, S. BEAUDET, L. PAQUET, G. AMPLEMAN et S. THIBOUTOT (1999). « Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene with *Phanerochaete chrysosporium* in agitated cultures at pH 4.5 », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, n° 7, p. 2977-2986.
- HAYAISHI, O., M. KATAGIRI et S. ROTHBERG (1955). « Mechanism of pyrocatechase reaction », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 77, n° 20, p. 5450-5451.
- HEIN, P., J. POWLOWSKI, D. BARRIAULT, Y. HURTUBISE, D. AHMAD et M. SYLVESTRE (1998). « Biphenyl-associated meta-cleavage dioxygenases from *Comamonas testosteroni* B-356, *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 44 n° 1, p. 42-49.
- HERNANDEZ, B.S., F.K. HIGSON, R. KONDRAT et D.D. FOCHT (1991). « Metabolism of and inhibition by chlorobenzoates in *Pseudomonas putida* P111 », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, n° 11, p. 3361-3366.
- HICKEY, W.J., D.B. SEARLES et D.D. FOCHT (1993). « Enhanced mineralization of polychlorinated biphenyls in soil inoculated with chlorobenzoate-degrading bacteria », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, n° 4, p. 1194-1200.
- HRYWNA, Y., T.V. TSOL, O.V. MALTSEVA, J.F. 3rd QUENSEN et J.M. TIEDJE (1999). « Construction and characterization of two recombinant bacteria that grow on ortho- and para-substituted chlorobiphenyls », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, n° 5, p. 2163-2169.
- HULSMAYER, M., H. J. HECHT, K. NIEFIND, B. HOFER, L.D. ELTIS, K.N. TIMMIS, et D. SCHOMBURG (1998). « Crystal structure of cis-biphenyl-2,3-dihydrodiol-2,3-dehydrogenase from a PCB degrader at 2.0 Å resolution », *Protein Science*, vol. 7, n° 6, p. 1286-1293.
- HURTUBISE, Y., D. BARRIAULT et M. SYLVESTRE (1996). « Characterization of active recombinant his-tagged oxygenase component of *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, n° 14, p. 8152-8156.
- HURTUBISE, Y., D. BARRIAULT et M. SYLVESTRE (1998). « Involvement of the terminal oxygenase beta subunit in the biphenyl dioxygenase reactivity pattern toward chlorobiphenyls », *Journal of Bacteriology*, vol. 180, n° 22, p. 5828-5835.

- HURTUBISE, Y., D. BARRIAULT, J. POWLOWSKI et M. SYLVESTRE (1995). « Purification and characterization of the *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase components », *Journal of Bacteriology*, vol. 177, n° 22, p. 6610-6618.
- IMBEAULT, N.Y., J.B. POWLOWSKI, C.L. COLBERT, J.T. BOLIN et L.D. ELTIS (2000). « Steady-state kinetic characterization and crystallization of a polychlorinated biphenyl-transforming dioxygenase », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, n° 17, p. 12430-12437.
- JENSEN, L.B., J.L. RAMOS, Z. KANEVA et S. MOLIN (1993). « A substrate-dependent biological containment system for *Pseudomonas putida* based on the *Escherichia coli* *Gef* gene », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, n° 11, p. 3713-3717.
- KALDALU, N., U. TOOTS, V. DE LORENZO et M. USTAV (2000). « Functional domains of the TOL plasmid transcription factor XylS », *Journal of Bacteriology*, vol. 182, n° 4, p. 1118-26.
- KAUPPI, B., K. LEE, E. CARREDANO, R.E. PARALES, D.T. GIBSON, H. EKLUND et S. RAMASWAMY (1998). « Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase », *Structure*, vol. 6, n° 5, p. 571-586.
- KESSLER, B., S. MARQUES, T. KOHLER, J.L. RAMOS, K.N. TIMMIS et V. DELORENZO (1994). « Cross talk between catabolic pathways in *Pseudomonas putida*: XylS-dependent and independent activation of the TOL *meta* operon requires the same *cis*-acting sequences within the Pm promoter », *Journal of Bacteriology*, vol. 176, n° 17, p. 5578-5582.
- KIKUCHI, M., K. OHNISHI et S. HARAYAMA (1999). « Novel family shuffling methods for the *in vitro* evolution of enzymes », *Gene*, vol. 236, n° 1, p. 159-167.
- KIMURA, N., A. NISHI, M. GOTO et K. FURUKAWA (1997). « Functional analyses of a variety of chimeric dioxygenases constructed from two biphenyl dioxygenases that are similar structurally but different functionally », *Journal of Bacteriology*, vol. 179, n° 12, p. 3936-3943.
- KUMAMARU, T., H. SUENAGA, M. MITSUOKA, T. WATANABE et K. FURUKAWA (1998). « Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase », *Nature Biotechnology*, vol. 16, n° 7, p. 663-666.
- LAYTON, A.C., M. MUCCINI, M.M. GHOSH et G.S. SAYLER (1998). « Construction of a bioluminescent reporter strain to detect polychlorinated biphenyls », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, n° 12, p. 5023-5026.
- LISTE, H.H. et M. ALEXANDER (2000). « Accumulation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere soil », *Chemosphere*, vol. 40, n° 1, p. 11-14.
- LIU, S. et J.M. SUFLITA (1993). « Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation », *Trends in Biotechnology*, vol. 11, n° 8, p. 344-352.
- MALTSEVA, O.V., T.V. TSOL, J.F. QUENSEN, M. FUKUDA et J.M. TIEDJE (1999). « Degradation of anaerobic reductive dechlorination products of Aroclor 1242 by four aerobic bacteria », *Biodegradation*, vol. 10, n° 5, p. 363-371.
- MASON, H.S., W.L. FOWLKS et E. PETERSON (1955). « Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 77, n° 10, p. 2914-2915.
- MASSÉ, R., D.F. MESSIER, C. AYOTTE, M.F. LÉVESQUE et M. SYLVESTRE (1989). « A comprehensive gas chromatographic/mass spectrometric analysis of 4-chlorobiphenyl bacterial degradation products », *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*, vol. 18, n° 1, p. 27-47.
- MCCLURE, N.C., J.C. FRY et A.J. WEIGHTMAN (1991). « Genetic engineering for wastewater treatment », *Journal of the Institution of Water and Environmental Management*, vol. 5, n° 6, p. 608-616.
- MOKROSS, H., E. SCHMIDT, et W. REINEKE (1990). « Degradation of 3-chlorobiphenyl by *in vivo* constructed hybrid pseudomonads », *FEMS Microbiology Letters*, vol. 59, n° 1-2, p. 179-185.

- MOLINA, M., R. ARAUJO et R.E. HODSON (1999). « Cross-induction of pyrene and phenanthrene in a *Mycobacterium* sp. isolated from polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated river sediments », *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 45, n° 6, p. 520-529.
- MOLINA, L., C. RAMOS, E. DUQUE, M.C. RONCHEL, J.M. GARCIA, L. WYKE et J.L. RAMOS (2000). « Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions », *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 32, n° 3, p. 315-321.
- MOLINA, L., C. RAMOS, M.C. RONCHEL, S. MOLIN et J.L. RAMOS (1998). « Construction of an efficient biologically contained *Pseudomonas putida* strain and its survival in outdoor assays », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, n° 6, p. 2072-2078.
- MONDELLO, F.J., M.P. TURCICH, J.H. LOBOS et B.D. ERICKSON (1997). « Identification and modification of biphenyl dioxygenase sequences that determine the specificity of polychlorinated biphenyl degradation », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, n° 8, p. 3096-3103.
- MUKERJEE, D. (1998). « Health risk of endocrine-disrupting ortho-substituted PCBs emitted from incinerators », *Environmental Engineering Science*, vol. 15, n° 2, p. 157-169.
- MURPHY, S.L. et R.L. TATE (1996). « Bacterial movement through soil », dans G. Stotzky *et al.* (dir.), *Soil Biochemistry*, vol. 9, New York, Marcel Dekker, p. 253-286.
- NANDHAGOPAL, N., A. YAMADA, T. HATTA, E. MASAI, M. FUKUDA, Y. MITSUI et T. SENDA (2001). Crystal structure of 2-hydroxyl-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid (HPDA) hydrolase (BphD enzyme) from the *Rhodococcus* sp. strain RHA1 of the PCB degradation pathway. *Journal of Molecular Biology*, vol. 309, n° 5, p. 1139-1151.
- NIELSEN, K.M., J.D. VAN ELSAS et K. SMALLA (2000). « Transformation of *Acinetobacter* sp. Strain BD413 (pFG4DeltanptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, n° 3, p. 1237-1242.
- OSTERMEIER, M., J.H. SHIM et S.J. BENKOVIC (1999). « A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology », *Nature Biotechnology*, vol. 17, n° 12, p. 1205-1209.
- PANKE, S., J.M. SANCHEZROMERO et V. DELORENZO (1998). « Engineering of quasi-natural *Pseudomonas putida* strains for toluene metabolism through an *ortho*-cleavage degradation pathway », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, n° 2, p. 748-751.
- PARALES, R.E., J.L. DITTY et C.S. HARWOOD (2000a). « Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, n° 9, p. 4098-4104.
- PARALES, R.E., K. LEE, S.M. RESNICK, H.Y. JIANG, D.J. LESSNER et D.T. GIBSON (2000b). « Substrate specificity of naphthalene dioxygenase : Effect of specific amino acids at the active site of the enzyme », *Journal of Bacteriology*, vol. 182, n° 6, p. 1641-1649.
- PETERS, S., S. KOSCHINSKY, F. SCHWIEGER et C.C. TEBBE (2000). « Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, n° 3, p. 930-936.
- POELAREND, G.J., L.A. KULAKOV, M.J. LARKIN, J.E. VAN HYLCKAMA Vlieg et D.B. JANSSEN (2000). « Roles of horizontal gene transfer and gene integration in evolution of 1,3-dichloropropene- and 1,2-dibromoethane-degradative pathways », *Journal of Bacteriology*, vol. 182, n° 8, p. 2191-2199.
- POULSEN, L.K., A. REF, S. MOLIN et P. ANDERSSON (1991). « Topographic analysis of the toxic Gef protein from *Escherichia coli* », *Molecular Microbiology*, vol. 5, n° 8, p. 1627-1637.
- PROVIDENTI, M.A., H. LEE et J.T. TREVORS (1993). « Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds », *Journal of Industrial Microbiology*, vol. 12, p. 379-395.

- REINEKE, W. et H.J. KNACKMUSS (1988). « Microbial degradation of haloaromatics. », *Annual Review of Microbiology*, vol. 42, p. 263-287.
- RIPP, S., D.E. NIVENS, C. WERNER et G.S. SAYLER (2000). « Bioluminescent most-probable-number monitoring of a genetically engineered bacterium during a long-term contained field release », *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 53, n° 6, p. 736-741.
- ROMANOV, V. et R.P. HAUSINGER (1996). « NADPH-dependent reductive ortho dehalogenation of 2,4-dichlorobenzoic acid in *Corynebacterium sepeidonicum* KZ-4 and coryneform bacterium strain NTB-1 via 2,4-dichlorobenzoyl coenzyme A », *Journal of Bacteriology*, vol. 178, n° 9, p. 2656-2661.
- ROSENBERG, E. (1993). « Exploiting microbial growth on hydrocarbons—new markets », *Trends in Biotechnology*, vol. 11, n° 10, p. 419-424.
- SALT, D.E., R.D. SMITH et I. RASKIN (1998). « Phytoremediation », *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 49, p. 643-668.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^e éd., Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SARAND, I., E. SKARFSTAD, M. FORSMAN, M. ROMANTSCHUK et V. SHINGLER (2001). « Role of the DmpR-mediated regulatory circuit in bacterial biodegradation properties in methylphenol-amended soils », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, n° 1, p. 162-171.
- SCHWEIZER, H.P. et T.T. HOANG (1995). « An improved system for gene replacement and *xylE* fusion analysis in *Pseudomonas aeruginosa* », *Gene*, vol. 158, n° 1, p. 15-22.
- SEAH, S.Y.K., G. LABBÉ, S. NERDINGER, M.R. JOHNSON, V. SNIIECKUS et L.D. ELTIS (2000). « Identification of a serine hydrolase as a key determinant in the microbial degradation of polychlorinated biphenyls », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, n° 21, p. 15701-15708.
- SEAH, S.Y.K., G. LABBÉ, S.R. KASCHABEK, F. REIFENRATH, W. REINEKE et L.D. ELTIS (2001). « Comparative specificities of two evolutionarily divergent hydrolases involved in microbial degradation of polychlorinated biphenyls. » *Journal of Bacteriology*, vol. 183, n° 5, p. 1511-1516.
- SEEGAL, R.F. (1999). « Are PCBs the major neurotoxicant in Great Lakes salmon? », *Environmental Research*, vol. 80, n° 2, p. S38-S45.
- SENDA, T., T. YAMADA, N. SAKURAI, M. KUBOTA, T. NISHIZAKI, E. MASAI, M. FUKUDA et Y. MITSUIDAGGER (2000). « Crystal structure of NADH-dependent ferredoxin reductase component in biphenyl dioxygenase », *Journal of Molecular Biology*, vol. 304, n° 3, p. 397-410.
- SHANNON, M.J.R. et R. UNTERMAN (1993). « Evaluating bioremediation : Distinguishing fact from fiction », *Annual Review of Microbiology*, vol. 47, p. 715-738.
- SICILIANO, S.D. et C.W. GREER (2000). « Plant-bacterial combinations to phytoremediate soil contaminated with high concentrations of 2,4,6-trinitrotoluene », *Journal of Environmental Quality*, vol. 29, n° 1, p. 311-316.
- SKARFSTAD, E., E. O'NEILL, J. GARMENDIA et V. SHINGLER (2000). « Identification of an effector specificity subregion within the aromatic-responsive regulators DmpR and XylR by DNA shuffling », *Journal of Bacteriology*, vol. 182, n° 11, p. 3008-3016.
- SONDOSSI, M., M. SYLVESTRE et D. AHMAD (1992). « Effects of chlorobenzoate transformation on the *Pseudomonas testosteroni* biphenyl and chlorobiphenyl degradation pathway », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 58, n° 2, p. 485-495.
- STEMMER, W.P. (1994). « DNA shuffling by random fragmentation and reassembly : *In vitro* recombination for molecular evolution », *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, vol. 91, n° 22, p. 10747-10751.
- SUENAGA, H., A. NISHI, T. WATANABE, M. SAKAI et K. FURUKAWA (1999). « Engineering a hybrid pseudomonad to acquire 3,4-dioxygenase activity for polychlorinated biphenyls », *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 87, n° 4, p. 430-435.

- SUENAGA, H., T. WATANABE, M. SATO, M. NGADIMAN et K. FURUKAWA (2002). « Alteration of regiospecificity in biphenyl dioxygenase by active-site engineering », *Journal of Bacteriology*, vol. 184, n° 13, p. 3682-3688.
- SUFLITA, J.M. et G.T. TOWNSEND (1995). « The microbial ecology and physiology of aryl dehalogenation reactions and implications for bioremediation », dans L.Y. Young *et al.* (dir.), *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*, New York, Wiley-Liss, p. 243-268.
- SYLVESTRE, M. (1995). « Biphenyl/chlorobiphenyls catabolic pathway of *Comamonas testosteroni* B-356 : Prospect for use in bioremediation », *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 35, n° 4, p. 189-211.
- SYLVESTRE, M. et J. FAUTEUX (1982). « A new facultative anaerobe capable of growth on 4-chlorobiphenyl », *Journal of General and Applied Microbiology*, vol. 28, n° 1, p. 61-72.
- SYLVESTRE, M., Y. HURTUBISE, D. BARRIAULT, J. BERGERON, et D. AHMAD (1996a). « Characterization of active recombinant 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl dehydrogenase from *Comamonas testosteroni* B-356 and sequence of the encoding gene (*bphB*) », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, n° 8, p. 2710-2715.
- SYLVESTRE, M., M. SIROIS, Y. HURTUBISE, J. BERGERON, D. AHMAD, F. SHARECK, D. BARRIAULT, I. GUILLEMETTE et J.M. JUTEAU (1996b). « Sequencing of *Comamonas testosteroni* strain B-356-biphenyl/chlorobiphenyl dioxygenase genes : Evolutionary relationships among gram-negative bacterial biphenyl dioxygenases », *Gene*, vol. 174, n° 2, p. 195-202.
- TAIRA, K., J. HIROSE, S. HAYASHIDA et K. FURUKAWA (1992). « Analysis of *bph* operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, n° 7, p. 4844-4853.
- TAIRA, K., N. HAYASE, N. ARIMURA, S. YAMASHITA, T. MIYAZAKI et K. FURUKAWA (1988). « Cloning and nucleotide sequence of the 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene from the PCB-degrading strain of *Pseudomonas paucimobilis* Q1 », *Biochemistry*, vol. 27, n° 11, p. 3990-3996.
- THERON, J. et T.E. CLOETE (2000). « Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments », *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 26, n° 1, p. 37-57.
- THIEM, S.M., M.L. KRUMME, R.L. SMITH et J.M. TIEDJE (1994). « Use of molecular techniques to evaluate the survival of a microorganism injected into an aquifer », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, n° 4, p. 1059-1067.
- UNTERMAN, R. (1996). « A history of PCB degradation », dans R.L. Crawford *et al.* (dir.), *Biotechnology Research Series : Bioremediation Principles and Applications*, Cambridge, UK, Cambridge University Press, p. 209-253.
- URAGAMI, Y., T. SENDA, K. SUGIMOTO, N. SATO, V. NAGARAJAN, E. MASAI, M. FUKUDA et Y. MITSUI (2001). « Crystal structures of substrate free and complex forms of reactivated BphC, an extradiol type ring-cleavage dioxygenase », *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 83, n° 4, p. 269-279.
- VAILLANCOURT, F.H., G. LABBÉ, N.M. DROUIN, P.D. FORTIN et L.D. ELTIS (2002). « The mechanism-based inactivation of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase by catecholic substrates », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, n° 3, p. 2019-2027.
- VAN DEN BERG, M., L. BIRNBAUM, A.T.C. BOSVELD, B. BRUNSTROM, P. COOK, M. FEELEY, J.P. GIESY, A. HANBERG, R. HASEGAWA, S.W. KENNEDY, T. KUBIAK, J.C. LARSEN, F.X.R. VAN LEEUWEN, A.K.D. LIEM, C. NOLT, R.E. PETERSON, L. POELLINGER, S. SAFE, D. SCHRENK, D. TILLITT, M. TYSKLIND, M. YOUNES, F. WAERN et T. ZACHAREWSKI (1998). « Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife », *Environmental Health Perspectives*, vol. 106, n° 12, p. 775-792.
- VAN VEEN, J.A., L.S. VAN OVERBEEK et J.D. VAN ELSAS (1997). « Fate and activity of microorganisms introduced into soil », *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 61, n° 2, p. 121-135.

- VEDADI, M., D. BARRIAULT, M. SYLVESTRE et J. POWLOWSKI (2000). « Active site residues of cis-2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl dehydrogenase from *Comamonas testosteroni* strain B-356 », *Biochemistry*, vol. 39, n° 17, p. 5028-5034.
- VOIGT, C.A., S. KAUFFMAN et Z.G. WANG (2001). « Rational evolutionary design : The theory of *in vitro* protein evolution », dans F.H. Arnold (dir.). *Advances in Protein Chemistry*, vol. 55, San Diego, CA, Academic Press, p. 79-160.
- VRANA, B., K. DERCOVA, S. BALAZ et A. SEVCIKOVA (1996). « Effect of chlorobenzoates on the degradation of polychlorinated biphenyls (PCB) by *Pseudomonas stutzeri* », *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 12, n° 4, p. 323-326.
- WALLACE, W.H. et G.S. SAYLER (1992). « Catabolic plasmids in the environment », dans J. Lederberg (dir.). *Encyclopedia of Microbiology*, vol. I, New York, Academic Press, p. 417-430.
- WATANABE, K. et P.W. BAKER (2000). « Environmentally relevant microorganisms », *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 89, n° 1, p. 1-11.
- WISE, A.A. et C.R. KUSKE (2000). « Generation of novel bacterial regulatory proteins that detect priority pollutant phenols », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, n° 1, p. 163-169.
- WOLFE, M. D., J.V. PARALES, D.T. GIBSON et J.D. LIPSCOMB (2001). « Single turnover chemistry and regulation of O₂ activation by the oxygenase component of naphthalene 1,2-dioxygenase », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276 n° 3, p. 1945-1953.
- YADAV, J.S. et C.A. REDDY (1993). « Mineralization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and mixtures of 2,4-D and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by *Phanerochaete chrysosporium* », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, n° 9, p. 2904-2908.

DÉFAILLANCE DE LA SYNTHÈSE DES HORMONES CORTICOSTÉROÏDES

Exposition de poissons et amphibiens
aux métaux et aux pesticides

ALICE HONTELA*

*Centre de recherche en toxicologie
de l'environnement (TOXEN),
Université du Québec à Montréal*

J. JOHN DORVAL*

*Centre de recherche en toxicologie
de l'environnement (TOXEN),
Université du Québec à Montréal*

* Nous tenons à remercier tous les étudiants dont les travaux ont été discutés dans ce chapitre, Alexandra Lacroix, Amélie Gravel, Martin Lacroix, Benoît Goulet, Marjolaine Bisson, Haude Levesque, Jean-Sébastien Laflamme, ainsi que nos collègues avec qui nous avons collaboré, D^{rs} P.G.C. Campbell, J.B. Rasmussen et T.W. Moon, et M. Vincent Leblond, l'agent de recherche dans notre laboratoire. Nos travaux ont été financés par le programme FODAR, le CRSNG, le RCCT, le MITE-RN et Santé Canada, ainsi que le Centre TOXEN et l'UQAM.

RÉSUMÉ

Les effets toxiques induits par l'exposition chronique aux polluants environnementaux impliquent des dérèglements physiologiques qui vont affecter les fonctions essentielles de l'organisme, parmi lesquelles les fonctions endocriniennes et immunitaires. Les perturbations induites par la présence de polluants dans le milieu environnant vont affecter le rôle que joue le système endocrinien dans le maintien de l'homéostasie et de l'intégrité physiologique. Ces effets vont se répercuter sur la croissance, le métabolisme et sur la reproduction, mettant ainsi en danger la survie de la population.

Parmi les polluants environnementaux, les modulateurs endocriniens tels que les pesticides et les métaux sont aujourd'hui largement étudiés. Capables de mimer ou d'altérer la synthèse et le métabolisme hormonal, ces toxiques affectent la réponse normale de l'organisme à un stress en affectant le rôle que joue le système endocrinien dans la coordination des processus physiologiques et dans le maintien de l'homéostasie. Après avoir pénétré dans l'organisme, ces polluants pourront interférer avec les processus hormonaux en agissant à plusieurs niveaux d'organisation anatomique et fonctionnelle, tel l'axe hypothalamus-hypophyse-interrénale.

Dans ce chapitre sont présentés différents travaux d'expositions chroniques *in situ* ou d'expositions *in vitro* et *in vivo* aux métaux et aux pesticides chez les poissons et les amphibiens, ainsi que les notions essentielles à la compréhension des mécanismes en jeu dans la défaillance du statut hormonal. L'utilisation, ainsi que les avantages et les limitations des biomarqueurs endocriniens sont également décrits. La grande sensibilité des paramètres hormonaux constitue en effet un avantage important dans leur utilisation comme biomarqueurs, même si l'utilisation de tels biomarqueurs ne peut se faire que par une approche multicritères qui combine la mesure de paramètres variables avec des paramètres déjà établis comme des biomarqueurs d'exposition.

1. INTRODUCTION

1.1. PROBLÉMATIQUE DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

Des travaux récents publiés dans les principales revues scientifiques aussi bien que dans la littérature « grand public » ont attiré notre attention sur un phénomène nouveau, celui des perturbateurs endocriniens. Substances d'origine anthropogénique qu'on retrouve dans l'environnement de façon ubiquiste, les perturbateurs endocriniens, aussi appelés modulateurs endocriniens, ont la capacité de perturber et d'altérer de façon anormale la fonction endocrinienne des organismes vivants. La libération de tels composés dans l'environnement ne va pas sans poser de problème, car les normes établies et suivies actuellement ne tiennent pas compte des effets précoces de ces substances qui ont le potentiel d'interférer avec les processus homéostatiques et le développement, sans immédiatement diminuer la capacité de survie. La problématique des perturbateurs endocriniens a de ce fait créé une controverse, aussi bien dans la communauté scientifique que dans l'industrie et les organismes législatifs (OCDE, EDSTAC) qui doivent se prononcer sur cette question difficile et potentiellement coûteuse, à savoir s'il y a lieu de modifier les normes.

Parmi les polluants environnementaux, les modulateurs endocriniens tels que les pesticides (Colborn, 1995) et les métaux lourds (Hontela et Lacroix, 2004) sont aujourd'hui largement étudiés. Bien que les propriétés physicochimiques de ces nombreux composés capables d'affecter le système endocrinien soient bien décrites dans la littérature, autant chez les mammifères que chez les poissons, très peu d'études à ce jour ont permis de mettre en évidence les mécanismes d'action de ces derniers au niveau cellulaire. La fonction du système endocrinien peut être perturbée soit par des effets directs sur les cellules endocrines localisées dans l'hypothalamus, l'hypophyse ou au niveau de l'organe endocrinien lui-même, soit par des effets secondaires induits via des réponses du système endocrinien à un état physiologique pathologique causé par l'exposition à divers polluants (Harvey, 1996). Le système endocrinien se caractérise par : 1) une extrême sensibilité à des stimulus externes tels que les variations de la température, de la photopériode, la présence d'individus de la même espèce (mâles, femelles, juvéniles), de prédateurs ou de proies, ou des stimulus internes tels que les variations des concentrations ioniques intracellulaires, du glucose et d'autres substances qui génèrent de l'ATP, ou des variations du pH ; 2) une activation ou une inhibition des composants du système endocrinien à de faibles concentrations en hormones (phénomène de cascade enzymatique/signalétique dans laquelle une hormone qui se lie à son récepteur active une chaîne d'événements cellulaires qui se magnifient à chaque étape ou, à l'opposé, qui induit le processus de rétroinhibition) ; et 3) des interactions complexes au niveau

anatomique et fonctionnel via des synergies ou des antagonismes entre les différentes composantes du système endocrinien. Ces différentes caractéristiques sont essentielles et doivent être prises en compte dans l'utilisation des réponses du système endocrinien comme biomarqueurs d'exposition ou d'effets et l'utilisation des réponses hormonales dans l'évaluation de la santé des organismes exposés à des polluants dans l'environnement (Cooper et Kavlock, 2001 ; Van Der Kraak *et al.*, 2001).

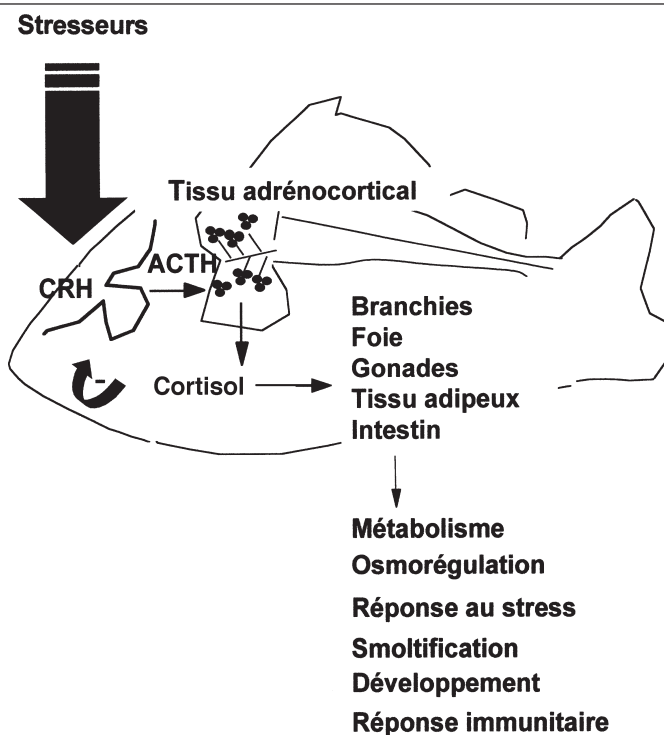
1.2. CIBLES ENDOCRINES DES POLLUANTS ENVIRONNEMENTAUX ET AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-ADRÉNAL

Les polluants, une fois qu'ils ont pénétré dans l'organisme, peuvent interférer avec les processus hormonaux en agissant à plusieurs niveaux d'organisation anatomique et fonctionnelle, comme l'illustre la figure 4.1. Le système nerveux et l'hypothalamus, le centre responsable de la sécrétion des neurohormones telles que la corticostimuline (CRH), sont des cibles potentielles des xénobiotiques. L'interférence avec la réponse normale aux stimulus externes et internes pourra modifier, d'une façon suboptimale, la synthèse des neurotransmetteurs et des neurohormones. La glande hypophyse, glande « maîtresse », qui sécrète plusieurs hormones telles que les gonadotropines (FSH et LH), la prolactine, l'hormone de croissance, la thyrotropine (TSH) et la mélanostimuline (MSH) ainsi que l'hormone adrénocorticotropique (ACTH), est une autre cible des polluants. Les concentrations en hormones dans le milieu extracellulaire sont maintenues d'une façon très précise pour assurer le maintien de l'homéostasie et la stabilité du milieu intérieur de l'organisme dans un environnement externe variable. Or, les polluants, en interférant avec la glande hypophyse et les processus de synthèse des hormones hypophysaires, auront un effet délétère sur les concentrations de ces mêmes hormones dans la circulation sanguine. L'activité des organes dépendant des hormones tropiques tels que l'ovaire et le testicule (sensibles à la FSH et à la LH), la thyroïde (sensible à la TSH), ou la médullo-surrénale chez les mammifères ou les organes homologues (sensibles à l'ACTH) chez les autres vertébrés, sera évidemment perturbée si les concentrations en hormones deviennent trop faibles ou trop élevées, perturbations induites par une anomalie au niveau de l'hypophyse. De plus, les xénobiotiques peuvent aussi interférer directement au niveau des organes cibles, les rendant ainsi insensibles aux hormones ou incapables d'activer une réponse normale. Ces effets au niveau des organes cibles hormono-dépendants peuvent se manifester par des anomalies de la synthèse de plusieurs hormones telles que les stéroïdes sexuels (testostérone ou œstrogènes) par l'ovaire ou le testicule, les hormones thyroïdiennes (thyroxine, T4 et triiodothyronine, T3) par la glande thyroïde ou les hormones corticostéroïdes (cortisol, corticostérone) par la

médullo-surrénale (chez les mammifères) ou le tissu adrénocortical (chez les autres vertébrés). Finalement, des anomalies au niveau des organes impliqués dans le métabolisme des hormones, notamment le foie et le rein, peuvent aussi influencer les concentrations sanguines et la pharmacocinétique, en modifiant la demi-vie des hormones ou la disponibilité des protéines de transport (Brouwer et van den Berg, 1986).

Figure 4.1

Niveaux d'organisation anatomique et fonctionnelle de l'axe HHI



Les interactions au niveau du système endocrinien sont complexes et les xénobiotiques environnementaux ne sont pas nécessairement spécifiques à un système particulier. De nombreux xénobiotiques peuvent exercer leurs effets simultanément sur plusieurs organes cibles, endocriniens ou autres. Pour caractériser l'impact des polluants sur la santé des organismes exposés dans l'environnement et élucider les mécanismes d'action cellulaire ou moléculaire, il est important d'utiliser des approches expérimentales complémentaires, *in vivo* et *in vitro*, en laboratoire sous conditions contrôlées et sur le terrain, et d'élaborer des hypothèses ciblées et

vérifiables. Le chapitre qui suit présentera les approches utilisées pour évaluer les effets des métaux et des pesticides sur un système endocrinien spécifique, l'axe hypothalamo-hypophyso-adrénal de poissons et amphibiens, système qui sécrète les hormones corticostéroïdes. Le terme « adrénal ou adrénocortical » sera utilisé dans ce chapitre, qui se veut comparatif entre plusieurs groupes de vertébrés, pour désigner l'organe homologue de la médullo-surrénale des mammifères. Les termes utilisés dans la littérature classique, soit interrénale pour les poissons téléostéens et surrénale pour les amphibiens, ont été révisés récemment (Norris, 2002) et le terme adrénocortical est proposé pour faciliter l'approche comparative.

2. ENDOCRINOLOGIE COMPARÉE DU TISSU ADRÉNO-CORTICAL ET HORMONES CORTICOSTÉROÏDES

2.1. ANATOMIE COMPARÉE : POISSONS TÉLÉOSTÉENS, AMPHIBIENS ET MAMMIFÈRES

Les hormones corticostéroïdes, le cortisol chez les poissons téléostéens et la corticostérone chez les amphibiens, sont synthétisées à partir du cholestérol dans les cellules stéroïdogéniques situées dans le tissu adrénocortical (interrénal), l'homologue de la médullo-surrénale des mammifères. Chez les mammifères, vertébrés supérieurs du point de vue évolutif, les cellules sont organisées dans le cortex en trois couches : la *zona glomerulosa* (couche externe), qui sécrète l'aldostérone, la *zona fasciculata*, qui sécrète surtout les glucocorticostéroïdes (cortisol ou corticostérone selon l'espèce), et la *zona reticularis*, couche la plus interne du cortex, qui sécrète les androgènes ainsi que les glucocorticostéroïdes. La médulla des mammifères, située à l'intérieur de la glande, sécrète les catécholamines, l'adrénaline et la noradrénaline (Bentley, 1998). L'organisation anatomique est bien différente chez les vertébrés inférieurs. Chez les poissons téléostéens tels que la truite, la perchaude ou le brochet, les cellules stéroïdogéniques qui sécrètent les corticostéroïdes sont dispersées dans la partie antérieure du rein, aussi appelé le pronéphros ou le rein céphalique (*head kidney*). Les îlots de ces cellules sont localisés surtout à proximité des sinus de la veine cardinale qui draine le pronéphros. Les cellules chromaffines, homologues des cellules de la médulla des mammifères, sont aussi présentes dans ces îlots. La matrice du rein céphalique est constituée des cellules lymphoïdes, très nombreuses et plus petites que les cellules stéroïdogéniques ou les cellules chromaffines (figure 4.2). L'organisation du tissu interrénal des amphibiens varie selon l'espèce. La grenouille africaine *Xenopus laevis*, souvent utilisée dans les tests toxicologiques (p. ex., le test FETAX), présente un arrangement très similaire au poisson, avec quelques différences

(Goulet et Hontela, 2003). Les îlots des cellules stéroïdogéniques sont dispersés à travers l'organe, cette fois-ci dans le rein entier et non pas seulement dans le rein antérieur comme chez le poisson, avec une concentration des îlots sur la partie ventrale du rein. D'autres espèces telles que le ouaouaron (*Rana catesbeiana*), une espèce indigène du Québec, présentent un tissu adrénal distinct, soit une bande mince constituée des cellules stéroïdogéniques, longeant le côté ventral du rein (Goulet et Hontela, 2003).

Ces différences anatomiques doivent être considérées avant de commencer tous travaux en toxicologie endocrinienne sur différentes espèces de la faune aquatique, car leur anatomie est distincte de celle des mammifères et des variations importantes entre espèces existent (Hontela, 1997; Bentley, 1998).

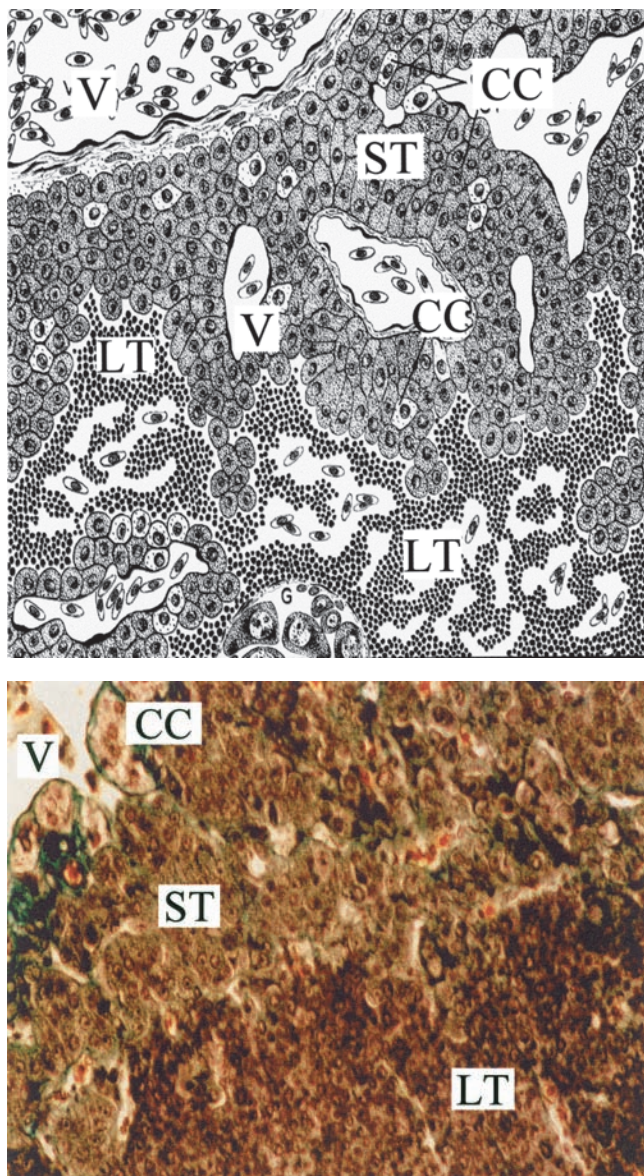
2.2. CELLULE CORTICOSTÉROÏDOGÉNIQUE ET VOIES DE SIGNALISATION

Malgré les différences anatomiques majeures dans l'organisation du tissu adrénal entre espèces, le fonctionnement de la cellule stéroïdogénique est plutôt similaire chez les poissons, les amphibiens et les autres vertébrés. Le sécrétagogue principal pour cette cellule est l'hormone adrénocorticotropique (ACTH) sécrétée par l'hypophyse. La liaison de l'ACTH à son récepteur membranaire (figure 4.3; Lacroix, 2002) va activer des voies signalétiques impliquant une cascade enzymatique qui amplifie le signal initial où l'AMP cyclique agit comme deuxième messager (Patiño *et al.*, 1986) et où la protéine kinase A semble activer la synthèse des hormones stéroïdogéniques, tandis que la protéine kinase C exerce un effet inhibiteur (Lacroix et Hontela, 2001). Si les voies signalétiques ont été assez bien caractérisées chez les mammifères, les connaissances chez les poissons sont moins complètes. Le rôle des protéines G, bien caractérisées chez les mammifères, reste en effet à démontrer chez les poissons. Les voies signalétiques de la stéroïdogénèse adrénale ont été bien caractérisées chez les amphibiens par l'équipe du professeur Vaudray, de l'Université de Rouen (Cartier *et al.*, 1999).

Le cholestérol, substrat des enzymes stéroïdogéniques localisées dans le réticulum endoplasmique et la mitochondrie, est graduellement modifié, tout d'abord par un clivage de sa chaîne latérale par la cytp450 scc (figure 4.3), située dans la membrane mitochondriale. Cette première réaction est régulée par la protéine StAR (*Steroid Acute Regulatory protein*), qui contrôle le transfert du cholestérol de l'extérieur de la membrane mitochondriale vers l'intérieur et dont le rôle reste à déterminer chez les poissons. Des travaux très intéressants utilisant la biologie moléculaire ont par ailleurs démontré dans les cellules stéroïdogéniques ovariennes que la StAR joue un rôle important dans la régulation de la synthèse rapide

Figure 4.2

L'organisation cellulaire du tissu interrénal chez le poisson téléostéen



ST : cellules stéroïdogéniques ; LT : tissu lymphoïde ; CC : cellules chromaffines ; V : veine. Le panneau du bas représente le tissu adrénocortical de la perchaude en coupe histologique colorée par trichrome de Masson (X400).

des hormones stéroïdes (Stocco, 2000). Suite au clivage de la chaîne latérale du cholestérol, une série des réactions est initiée, impliquant des cyt P450, des isomérases et des déshydrogénases, pour obtenir à partir du cholestérol la pregnénolone, la progestérone et, finalement, le cortisol ou la corticostérone. Ces hormones ne sont pas stockées dans la cellule mais, étant très lipophiles, elles se diffusent à travers la membrane de la cellule stéroïdogénique vers la circulation sanguine. Les corticostéroïdes peuvent être transportés par des protéines de transport, telle la protéine de liaison des glucocorticostéroïdes (GBP, *Glucocorticosteroid Binding Protein*). L'hormone liée possède une demi-vie plus longue que l'hormone libre qui est celle capable de se lier aux récepteurs dans les cellules cibles. La disponibilité des protéines de transport pourrait donc influencer l'activité biologique des hormones glucocorticostéroïdes.

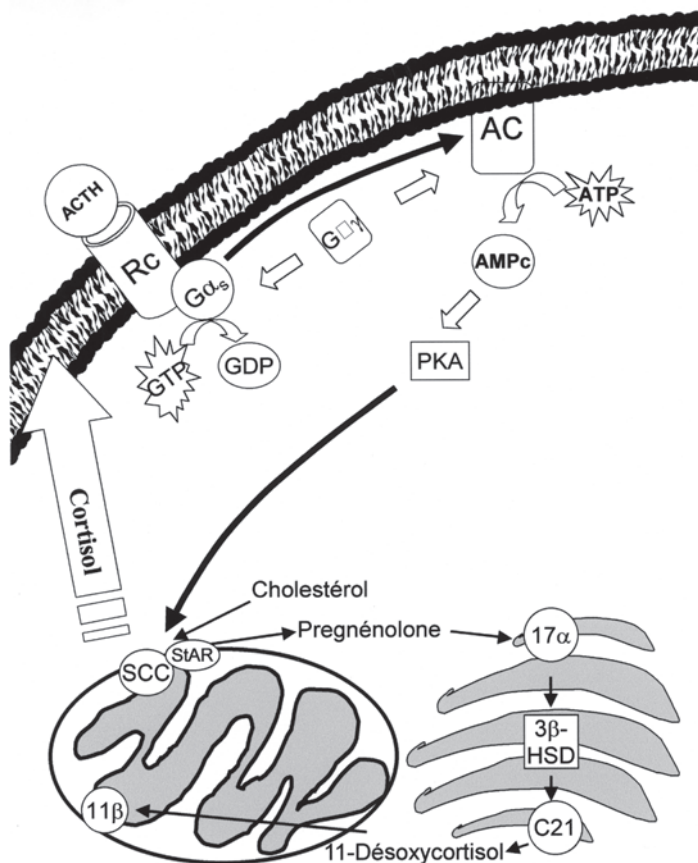
2.3. LES HORMONES CORTICOSTÉROÏDES ET LEURS EFFETS PHYSIOLOGIQUES

De nombreux organes possèdent des récepteurs spécifiques pour les hormones corticostéroïdes. Les récepteurs pour le cortisol ont été identifiés chez le poisson téléostéen dans les branchies, le foie, le rein, le cerveau et l'intestin (figure 4.1). Cette omniprésence n'est pas surprenante puisque dans ce groupe, le cortisol joue un rôle important aussi bien dans l'osmorégulation et le mouvement des ions à travers les surfaces osmorégulatrices (branchies, reins, intestin), que dans la régulation du métabolisme intermédiaire, notamment au niveau du foie et des muscles (Mommensen *et al.*, 1999). La fonction de la corticostérone est similaire chez les amphibiens, l'hormone étant importante dans l'osmorégulation et le métabolisme, ainsi que dans la métamorphose. Notons que chez les mammifères, les corticostéroïdes ont un rôle dans la régulation du métabolisme tandis que l'aldostérone, une hormone minéralocorticoïde presque non détectable chez les poissons, joue un rôle effecteur de l'osmorégulation. Chez tous les vertébrés, les corticostéroïdes sont aussi de puissants immunosuppresseurs. De plus, un rôle inhibiteur dans la maturation des oocytes a été rapporté chez les poissons (Pankhurst et Van Der Kraak, 2000). De nombreuses interactions avec d'autres hormones ont aussi été signalées, particulièrement avec les hormones thyroïdiennes, l'hormone de croissance et les catécholamines.

La multitude et la complexité des effets des hormones corticostéroïdes signifient que toute anomalie au niveau de la synthèse ou du métabolisme pourrait avoir des conséquences néfastes pour la santé de l'organisme. De plus, ces nombreuses interactions avec différents systèmes hormonaux rendent le diagnostic de ces anomalies plus difficile, car plusieurs caractéristiques physiologiques peuvent être modifiées en même temps.

Figure 4.3

Voies signalétiques de la synthèse du cortisol dans la cellule stéroïdogénique



3. TRAVAUX SUR LE TERRAIN ET EFFETS DES EXPOSITIONS CHRONIQUES CHEZ LES POISSONS

3.1. LA DÉFAILLANCE CORTISOLIQUE

L'exposition chronique aux métaux dans l'environnement, à des concentrations subléthales, induit une altération de la sécrétion de corticostéroïdes ainsi qu'une altération de la capacité de réponse à d'autres stressseurs tels que la prédation ou le confinement (Hontela, 1998). Cette incapacité à sécréter du cortisol, comparativement aux poissons de lacs non conta-

minés, a été décrite chez le grand brochet (*Esox lucius*) exposé au Hg (Lockhart *et al.*, 1975), chez la perchaude (*Perca flavescens*) prélevée dans différents lacs de la région minière de Rouyn-Noranda, au nord-ouest du Québec (figure 4.4, tableau 4.1) et chez la truite brune (*Salmo trutta*) de la rivière Eagle au Colorado (Norris *et al.*, 1998). La stimulation à l'ACTH a clairement démontré chez les perchaudes provenant de lacs contaminés par différents métaux (Cu, Cd, Zn) un dysfonctionnement du tissu adrénal avec une incapacité à répondre à un stress. Préalablement, des tests réalisés en laboratoire, *in vitro* et *in vivo*, ont également permis de différencier les poissons physiologiquement sains (tissu adrénocortical fonctionnel et capacité de répondre à un stress) et ceux présentant un dysfonctionnement de ce même tissu et incapables de répondre à un stress, caractérisés par une incapacité à sécréter du cortisol malgré une stimulation à l'ACTH (figure 4.4, Laflamme *et al.*, 2000). Plusieurs de nos études réalisées

Figure 4.4

Sites échantillonnés dans l'étude écotoxicologique de la perchaude *Perca flavescens* dans la région minière de Rouyn-Noranda*

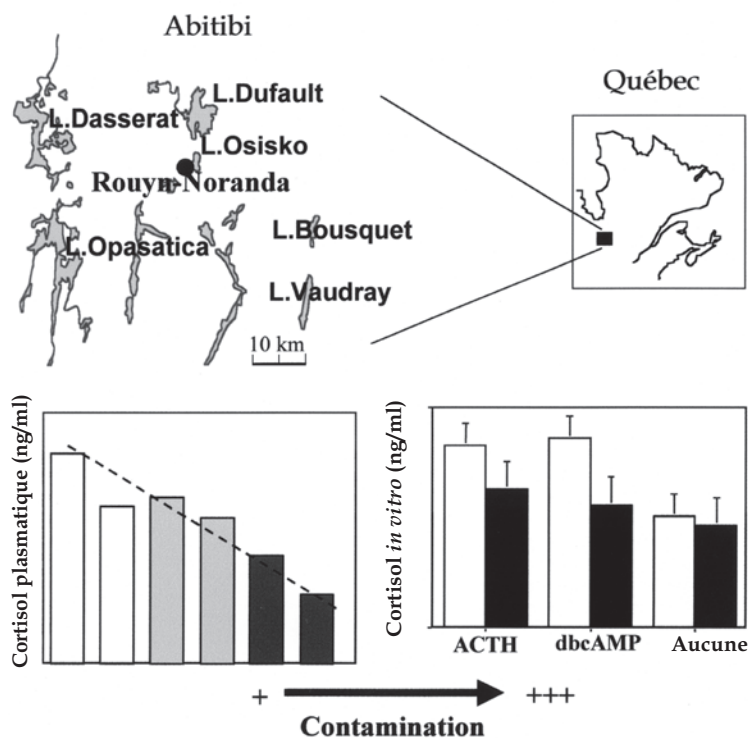


Tableau 4.1
Concentrations tissulaires en métaux (µg/g poids sec) de la perchaude, *Perca flavescens*,
prélevée dans la région minière de l'Abitibi

	Foie			Rein			Rein céphalique		
	Zn	Cu	Cd	Zn	Cu	Cd	Zn	Cu	Cd
Lacs témoins									
Opasatica	92,4	10,4	2,9	673,3	9,7	16,0	104,6	2,3	0,9
Dasserat	98,6	10,8	5,3	697,2	11,6	19,0	118,0	2,9	1,7
Lacs intermédiaires									
Bousquet	106,5	20,4	20,3	561,9	11,2	74,5	96,0	2,2	3,8
Vaudray	108,9	12,9	25,1	N.D.	N.D.	N.D.	127,6	2,7	5,7
Lacs fortement contaminés									
Osisko	177,2	246,5	45,7	1565,2	17,4	90,5	153,6	6,5	8,0
Dufault	151,1	148,5	61,3	1862,2	15,8	150,7	227,0	6,4	12,6

sur des perchaudes provenant de lacs contaminés par des métaux lourds ont permis d'établir une relation significative entre les teneurs tissulaires en métaux et le niveau d'inhibition de la sécrétion de cortisol en réponse à un stress. Notons aussi qu'une relation très significative entre la charge tissulaire en métaux et les teneurs en métallothionéines a été démontrée dans les reins, le foie et le tissu adrénocortical (interrénal) chez la perchaude exposée dans le milieu naturel (Laflamme *et al.*, 2000). Les tests fonctionnels de stimulation avec ACTH ou le confinement physique se sont révélés particulièrement pertinents et représentatifs du milieu naturel où les poissons doivent non seulement se défendre contre la pollution, mais également contre leurs prédateurs, les conspécifiques ainsi que divers stressseurs environnementaux, chroniques ou aigus. La survie des poissons dans leur habitat dépend donc de leur capacité à répondre à un stress via le système endocrinien caractérisé par une élévation du niveau en cortisol. Un dysfonctionnement de ce système pourra de ce fait avoir des conséquences directes sur la survie même de la population.

3.2. EFFETS DES MÉTAUX SUR LA CAPACITÉ D'OSMORÉGULATION

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence des perturbations de l'homéostasie ionique et des changements biochimiques au niveau plasmatique chez des animaux exposés à des métaux, en particulier chez les poissons téléostéens (McDonald et Wood, 1993). Parmi les dérèglements physiologiques observés à la suite d'une exposition à des concentrations élevées mais sublétales en métaux, la perturbation de la concentration ionique au niveau plasmatique et urinaire, l'anémie et l'hypocalcémie sont les plus documentés. Plusieurs de ces changements sont causés par des dommages au niveau des branchies (planche 2) et des reins, ce qui rend ces organes incapables de remplir leur fonction d'osmorégulation. Les anomalies peuvent aussi être induites, comme réponse secondaire, par une altération de la synthèse et de la sécrétion d'hormones osmorégulatrices clefs telles que le cortisol, les hormones thyroïdiennes (Bleau *et al.*, 1996; Hontela *et al.*, 1996) ou la prolactine. Les travaux récents de Bury *et al.* (1998) ont par ailleurs permis d'observer chez le tilapia (*Oreochromis mossambicus*) une nécrose des cellules à chlorure de branchies exposées au Cu et un effet protecteur du cortisol favorisant l'apoptose de ces mêmes cellules plutôt que la nécrose, peut-être par élimination des cellules défectueuses, sans induire d'inflammation. De plus, les métaux peuvent interférer avec le flux ionique à travers l'épithélium des cellules de branchies ou de reins, par des processus physicochimiques agissant sur le gradient électrochimique et sur les pompes ioniques telle la Na^+/K^+ ATPase. Plusieurs études récentes décrivent une diminution de l'activité Na^+/K^+ ATPase au niveau des branchies de poissons téléostéens exposés

sur le terrain ou en laboratoire à Pb et Cd, des métaux connus pour interférer avec Ca^{2+} (Levesque *et al.*, 2003). De plus, des études détaillées par le professeur C. Wood et ses collègues sur les effets de Cu et Ag et la capacité d'osmorégulation chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) ont été publiées (McGeer *et al.*, 2000). Si les altérations de l'équilibre osmoionique induites par l'exposition aux métaux sont bien documentées aussi bien chez les poissons que chez les mammifères, les connaissances au sujet des effets de métaux sur la capacité d'osmorégulation chez les amphibiens sont très partielles. Les mécanismes de toxicité des métaux dans les organes cibles impliqués dans l'osmorégulation sont nombreux et leur importance relative dans l'étiologie des pathologies reste à déterminer.

Les effets des métaux sur la capacité d'osmorégulation illustrent parfaitement les nombreuses cibles de ces derniers. Tout dépendant de la concentration, du temps d'exposition et de la sensibilité spécifique à chaque espèce, les métaux peuvent agir sur la morphologie et la fonction des organes chargés de la régulation osmotique, ainsi que sur la sécrétion d'hormones osmorégulatrices sur l'activité d'enzymes régulatrices et sur les pompes ioniques.

3.3. EFFETS DES MÉTAUX SUR LA CROISSANCE ET LE MÉTABOLISME

La croissance est un processus complexe régulée par divers facteurs physiologiques, tels que la disponibilité en nourriture et les niveaux en substrats énergétiques qui sont contrôlés par différentes hormones et enzymes et utilisés dans les processus cataboliques et anaboliques. Tous ces facteurs peuvent être, directement ou indirectement, modifiés par la présence de métaux, rendant ainsi difficile d'établir une relation mécanistique de cause à effet, en particulier sur le terrain (Sherwood *et al.*, 2002b).

Les effets des métaux sur la croissance ont été étudiés principalement chez les poissons, exposés en laboratoire ou de façon chronique dans l'environnement. Dans la plupart de ces travaux, une diminution de la croissance et du facteur de condition [$(\text{poids}/\text{longueur}^3) \times 100$] a été rapportée (Laflamme *et al.*, 2000 ; Levesque *et al.*, 2002). Il est néanmoins très difficile d'interpréter les résultats obtenus sur le terrain, car l'influence d'autres facteurs, tels que la compétition pour la nourriture et l'exposition aux contaminants et les conséquences de cette exposition sur les prédateurs, les proies et l'état physiologique de l'animal, est réelle et doit être prise en compte dans l'interprétation des effets de la pollution sur la population à l'étude. De nouvelles méthodes fondées sur l'utilisation des signatures isotopiques (p. ex., le radioisotope Cs^{137}) ont été développées et se sont révélées utiles pour estimer l'efficacité de croissance qui représente l'efficacité à convertir la nourriture consommée en biomasse

(Sherwood *et al.*, 2000, 2002a, 2002b). Ces nouvelles approches sont de ce fait utiles pour mieux comprendre et élucider le lien entre exposition aux métaux sur la fonction hormonale et métabolique, et la croissance de poissons exposés (bioénergie et capacité de croissance).

Les effets des métaux sur le métabolisme intermédiaire ont, là encore, été principalement étudiés chez les poissons, avec quelques études chez d'autres groupes de vertébrés (Sjöbeck *et al.*, 1984 ; Pratap et Wendelaar Bonga, 1990 ; Sastry *et al.*, 1997 ; Ricard *et al.*, 1998 ; Levesque *et al.*, 2002). L'exposition aiguë aux métaux augmente les niveaux en cortisol et en glucose plasmatique et diminue les réserves en glycogène hépatique, paramètres qui peuvent être considérés comme une adaptation dans la mesure où ils permettent d'augmenter la disponibilité en substrats énergétiques nécessaires pour maintenir l'homéostasie. Ces changements suggèrent également que l'exposition aux métaux active des mécanismes homéostatiques coûteux sur le plan énergétique, comme le décrit Heath (1995). Les effets d'une exposition chronique sur le métabolisme intermédiaire sont moins bien décrits. Des changements, suivant la saison, au niveau des réserves hépatiques en glycogène et en triglycérides ont été signalés chez la perchaude exposée aux Cd, Zn et Cu dans la région minière de Rouyn-Noranda (Levesque *et al.*, 2002). Les poissons des lacs contaminés présentent une capacité réduite à restaurer leurs réserves énergétiques, en comparaison aux poissons des sites références non contaminés, et présentent également des différences significatives dans l'activité d'enzymes gluconéogéniques et lipolytiques clefs. De plus, la fonction thyroïdienne, importante dans la régulation du métabolisme et de la respiration cellulaire, s'est révélée inhibée chez les poissons les plus contaminés par les métaux, car leurs teneurs plasmatiques en thyroxine (T₄) et en triiodothyronine (T₃) étaient faibles (Levesque *et al.*, 2003) et des anomalies morphologiques ont été observées au niveau des follicules thyroïdiens (planche 2). Ces anomalies du métabolisme chez les poissons contaminés peuvent expliquer les différences de croissance et le retard dans le développement des gonades observées (planche 2), la croissance et le développement gonadal étant en effet des processus coûteux du point de vue énergétique, en particulier en milieu contaminé où la disponibilité en nourriture peut être limitée.

4. EXPOSITIONS *IN VITRO* : MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LA DÉFAILLANCE CORTISOLIQUE

Les mécanismes par lesquels la fonction de sécrétion du tissu adrénal peut être perturbée suite à une exposition chronique aux métaux ont été caractérisés par stimulation *ex vivo* à l'ACTH de l'adrénale de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) après une exposition par l'eau au Cd pendant 1, 7,

14 et 30 jours. Les résultats obtenus montrent une réponse à l'ACTH maintenue, y compris chez les poissons exposés 30 jours à une plus forte dose en Cd, soit 1 $\mu\text{g/L}$ (Brodeur *et al.*, 1998). Une exposition au Cd dans l'eau, jusqu'à 30 jours en laboratoire, n'induit donc pas de défaillance cortisolique, contrairement à ce qui a été observé sur le terrain suite à des expositions réellement chroniques, pendant plusieurs années *in situ*. Les travaux de Leblond et Hontela (1999) ont par contre montré qu'une exposition *in vitro* pendant 60 min de cellules corticostéroïdogéniques au Cd, Zn, Hg et CH_3HgCl induisait une incapacité dose-dépendante à sécréter du cortisol et ce, à des doses en métaux relativement élevées mais n'induisant pas de mortalité cellulaire. Cette étude, complétée par des études sur le terrain où les charges des reins céphaliques en métaux ont pu être mesurées (tableau 4.1), a permis de définir la notion de seuil des charges tissulaires en métaux (ou autres toxiques), valeur à partir de laquelle la fonction du tissu adrénocortical peut être perturbée. Ce seuil, qui peut être dépassé suite à une exposition environnementale chronique ou dans des études *in vitro* où des fortes concentrations en métaux sont utilisées en contrepartie d'un temps d'exposition court, est un élément essentiel pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la défaillance cortisolique.

Jusque récemment, les mécanismes d'action des métaux lourds au niveau cellulaire du système endocrinien étaient peu connus, avec seulement quelques études portant sur l'identification des sites d'action de ces substances toxiques au niveau des cellules endocrines. Plusieurs publications rapportent néanmoins une action directe des métaux sur la stéroïdogénèse dans le tissu adrénal (Mgbonyebi *et al.*, 1994; Mathias *et al.*, 1998; Leblond et Hontela, 1999) et dans les gonades (Laskey et Phelps, 1991). Des études *in vitro* réalisées sur des tissus stéroïdogéniques exposés aux métaux ont rapporté deux types d'effets, réponse qui dépend de l'espèce et de la nature du toxique (spéciation, dose, temps d'exposition) : 1) certains métaux semblent altérer directement la fonction de l'adrénale et des gonades en inhibant des enzymes stéroïdogéniques spécifiques et 2) de nombreux métaux lourds divalents tel le cadmium (Cd^{2+}) vont modifier les concentrations intracellulaires en Ca^{2+} et altérer ainsi les processus Ca^{2+} qui en dépendent.

4.1. LES INTERACTIONS DES MÉTAUX AVEC LE Ca^{2+} INTRACELLULAIRE

Le Ca^{2+} est essentiel à de nombreux processus biologiques. Il joue un rôle important comme second messager dans les voies de signalisation intracellulaire, dans le système endocrinien de tous les vertébrés étudiés jusqu'à présent. Le Ca^{2+} est nécessaire pour que l'ACTH se fixe sur son récepteur, première étape de la cascade enzymatique permettant la synthèse et la

sécrétion des stéroïdes au niveau du tissu adrénal. Le cadmium (Cd^{2+}), métal divalent, peut agir soit en se fixant sur un site Ca^{2+} des membranes plasmatiques, soit en bloquant les canaux calciques ou en induisant le relargage du Ca^{2+} stocké au niveau des mitochondries ou du réticulum endoplasmique via l'activation de récepteurs membranaires (Mathias *et al.*, 1998). Le Cd peut passer à travers les canaux calciques des cellules phéochromocytaires, lignée cellulaire de mammifère à fonction neuro-sécrétrice (Hinkle et Osborne, 1994), et altérer ainsi l'influx de Ca^{2+} . Les travaux réalisés sur une lignée de cellules hypophysaires par Hinkle *et al.* (1987) ont par ailleurs montré que la nimodipine, un bloqueur des canaux calciques, pouvait assurer une protection contre les effets toxiques de Cd, ce qui indiquerait que le Cd peut entrer dans les cellules via des canaux Ca^{2+} dépendants du voltage, résultat confirmé par l'utilisation d'un agoniste des canaux Ca^{2+} , le BAY K 8644.

Le rôle protecteur du Ca^{2+} contre les effets toxiques du Cd a été démontré par Mathias *et al.* (1998) sur des cellules tumorales d'adrénale de souris (cellules Y-1) en utilisant un milieu riche en calcium. Une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} par le ionophore A23187 induit une augmentation de la sécrétion, basale et après stimulation, dans les cellules adrénales traitées au Cd. Ces résultats suggèrent que le Ca^{2+} extracellulaire pourrait protéger la cellule des effets du Cd et maintenir la synthèse de l'AMPc au niveau de la membrane ainsi que le métabolisme basal du cholestérol au niveau mitochondrial. D'autre part, des mesures par fluorescence montrent que le Cd^{2+} , par compétition avec le Ca^{2+} , peut entrer dans la cellule, entrée qui sera accélérée par une stimulation à l'ACTH. Ces travaux fournissent de nouvelles données sur les cibles cellulaires potentielles du Cd au niveau des cellules endocrines. Cependant, les effets des métaux sur les processus cellulaires impliquant le Ca^{2+} chez d'autres vertébrés sont encore peu connus.

De nombreux processus cellulaires sont régulés par la calmoduline, protéine ubiquiste capable de lier Ca^{2+} et de stimuler l'activité de plusieurs cibles protéiques. Après l'activation de la stéroïdogénèse par la Ca^{2+} -calmoduline (Ca/CaM) dans des cellules tumorales Y-1 d'adrénale, on a observé que le Ca^{2+} facilitait la liaison de l'ACTH sur son récepteur jouant ainsi un rôle de régulation. La liaison du Ca^{2+} avec la CaM va activer la CaM, qui pourra se lier ensuite à différentes enzymes telles que la phosphorylase kinase et l'AMPc phosphodiesterase, dont les activités seront alors modifiées. Il existe une compétition entre métaux et Ca^{2+} pour de nombreux sites intracellulaires et la CaM semble être une cible potentielle pour les métaux divalents. Les travaux récents effectués dans notre laboratoire (Lacroix *et al.*, en préparation) démontrent que les interactions entre Cd^{2+} et Ca^{2+} dans les cellules stéroïdogéniques sont parmi les mécanismes de toxicité endocrinienne du cadmium chez la truite arc-en-ciel.

En utilisant la nicardipine et l'agoniste BAY K 8644, on a démontré le rôle protecteur du calcium *in vitro*. Des travaux sont en cours pour identifier les voies d'entrée du cadmium dans les cellules stéroïdogéniques.

4.2. EFFETS DES MÉTAUX ET DES PESTICIDES SUR LES ENZYMES STÉROÏDOGÉNIQUES

Dès 1977, Freeman et Sangalang (1977) ont démontré *in vitro* que certains métaux (Cd, Hg, As) ainsi que des polluants organiques pouvaient inhiber la synthèse des hormones stéroïdes dans le tissu adrénal et les testicules de baleine grise (*Halichoerus grypus*), l'inhibition de l'activité 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase par ces xénobiotiques ayant un effet direct sur le produit final de la synthèse. Les mécanismes d'action des métaux sur la synthèse des corticostéroïdes ont aussi été étudiés *in vivo* (Veltman et Maines, 1986). Les activités d'enzymes stéroïdogéniques ont été mesurées chez des rats traités avec Hg²⁺ et l'enzyme 21 α -hydroxylase fut identifiée comme une cible potentielle de ce métal. L'inhibition de cette enzyme par Hg a également put être corrélée avec des niveaux plasmatiques en stéroïdes réduits. Mgbonyebi et collègues (1994) ont rapporté un effet inhibiteur du Cd sur la sécrétion, basale et après stimulation à l'ACTH, de cortisol sur des cellules du cortex adrénal de rats en culture, bien que ces résultats ne puissent pas être interprétés comme une toxicité du Cd sur l'ensemble des paramètres de l'animal. À des concentrations plus faibles en métaux, aucun effet sur la stéroïdogénèse après stimulation à l'ACTH de cellules stéroïdogéniques de rat en culture n'a été observé par Nishiyama *et al.* (1985). Une altération de la synthèse et de la sécrétion de stéroïdes n'a été observée qu'avec le Pb, sécrétion pouvant être restaurée avec du dbc-AMP (dibutiryle AMP cyclique) ; ainsi, le Pb agirait au niveau de la membrane plasmique.

Pour mieux comprendre les mécanismes de toxicité et identifier les sites d'action des métaux sur la production de testostérone, Laskey et Phelps (1991) ont stimulé la production de testostérone dans des cellules Leydig de rats en utilisant des substrats biosynthétiques et des agonistes, tels la hCG (gonadotrophine chorionique d'humain) ou le dbc-AMP. Les résultats montrent une inhibition dose-dépendante de la production de testostérone après traitement avec Cd²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Ni²⁺ et Zn²⁺. La production de testostérone fut restaurée dans les cellules exposées à Cd²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ et Zn²⁺ lorsque stimulées avec l'hydroxycholestérol et la pregnénone, deux substrats précurseurs de la testostérone. Ces résultats montrent que ces cations peuvent agir à différents niveaux de la stéroïdogénèse et permettent d'identifier comme cible des métaux les étapes comprises entre la liaison de l'ACTH à son récepteur et les étapes précédant la transformation enzymatique des stéroïdes au niveau mitochondrial. Les

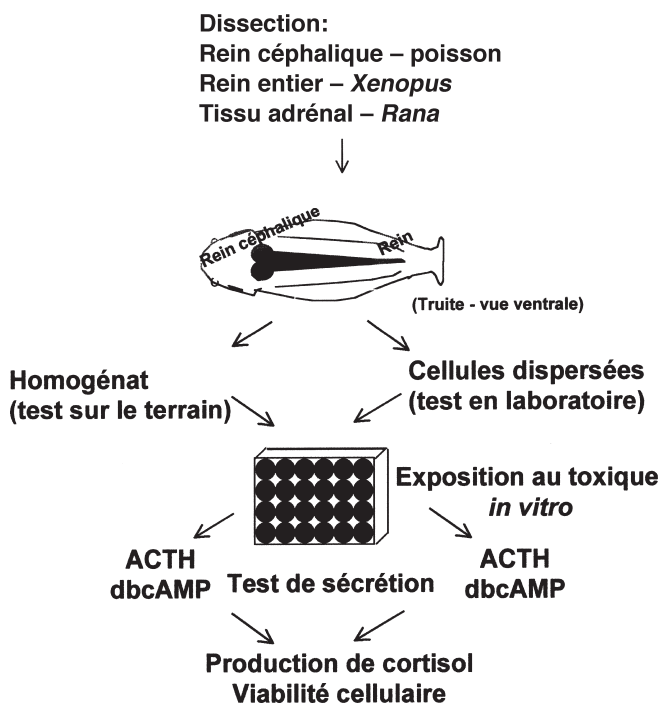
travaux de Leblond et Hontela (1999) ont de plus démontré une inhibition dose-dépendante de la réponse à l'ACTH des cellules stéroïdogéniques de truite arc-en-ciel exposées à Cd^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} et au *o,p'*-DDD, un pesticide organochloré. La sécrétion de cortisol après exposition aux métaux ne pouvait être rétablie par stimulation au dbcAMP, contrairement aux cellules exposées au pesticide.

Ces résultats font apparaître que les métaux agissent au niveau de la voie de signalisation impliquée dans la synthèse et la sécrétion de cortisol à une étape située après la formation d'AMPC alors que le *o,p'*-DDD semble agir à un niveau précédant cette étape. Récemment, nous avons rapporté (Lacroix, A., en préparation) que les effets inhibiteurs du Cd sur la stéroïdogénèse adrénale dans les cellules de la truite et la perchaude peuvent être renversés en substituant la pregnénolone dans le milieu d'incubation. Ces résultats indiquent que le Cd agit en amont de l'étape où la pregnénolone est utilisée dans la chaîne enzymatique (figure 4.3) puisque ces étapes demeurent fonctionnelles même en présence de Cd. L'approche basée sur la substitution des substrats spécifiques à différentes étapes de la biosynthèse de l'hormone permet d'identifier, d'une manière ciblée, les sites endommagés par le xénobiotique. Les effets de Cd au niveau de la stéroïdogénèse adrénale sont similaires chez les amphibiens. Une inhibition dose-dépendante de la capacité de synthèse de corticostérone en réponse à la stimulation par l'ACTH et le dbcAMP a été démontrée *in vitro* dans les cellules stéroïdogéniques de *Xenopus laevis* (Goulet et Hontela, 2003). Le bioessai (figure 4.5) utilisé pour évaluer la toxicité adrénale chez les amphibiens et les poissons était le même, permettant ainsi d'obtenir des données importantes sur la sensibilité des différentes espèces des vertébrés et le mode d'action de polluants environnementaux. De plus, notre équipe a aussi comparé différents toxiques dans le même modèle animal (tableau 4.2), notamment la truite arc-en-ciel, en évaluant la toxicité des différents métaux et pesticides (Leblond *et al.*, 2001 ; Bisson et Hontela, 2002), données qui pourraient servir à l'évaluation du risque environnemental.

À l'exception de quelques études sur les poissons et les amphibiens présentées ci-dessus, l'essentiel des études sur les mécanismes d'action des polluants environnementaux sur les cellules endocrines ont été effectuées chez les mammifères. Si les données concernant les effets physiologiques des métaux sur les espèces aquatiques sont nombreuses, les connaissances concernant les mécanismes par lesquels les xénobiotiques environnementaux altèrent la voie de signalisation dans les cellules endocrines chez les vertébrés autres que mammifères sont encore pauvres. De nouveaux outils expérimentaux basés sur une approche toxicologique en rapport avec les caractéristiques déjà connues sur le système endocrinien

Figure 4.5

Le bioessai utilisé pour évaluer *in vivo* et *in vitro* la toxicité adrénale chez les poissons et les amphibiens



permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués et d'élargir ainsi nos connaissances dans ce domaine. L'utilisation de techniques moléculaires constitue également un bon outil pour identifier les sites d'action des métaux dans la régulation de l'expression de gènes ou protéines impliqués dans la stéroïdogénèse dans les cellules endocrines. Quelques études récentes chez les mammifères illustrent bien cette direction de recherche. L'équipe de D. Stocco (Walsh *et al.*, 2000, 2001) a démontré que l'expression et l'activité de la protéine StAR, la protéine qui contrôle le transfert du cholestérol dans la mitochondrie (figure 4.3), une étape clef dans la stéroïdogénèse, sont inhibées par des pesticides tels que le lindane et le glyphosate Roundup ou *N*-(phosphonométhyl) glycine. La conséquence de l'exposition à ces pesticides est une diminution dose-dépendante de la synthèse des stéroïdes. L'approche moléculaire a permis d'identifier

d’une façon ciblée le site d’action d’un polluant et de caractériser son mécanisme d’action. On ne peut exclure dans cette étude la possibilité que les pesticides étudiés perturbent aussi l’homéostasie du calcium cellulaire, tel que rapporté pour les métaux, ou qu’ils agissent par d’autres mécanismes simultanément. Des travaux futurs permettront probablement d’établir cette possibilité d’actions cellulaires multiples pour un même toxique.

Tableau 4.2
Sensibilité de cellules adrénocorticales de la truite aux métaux et pesticides

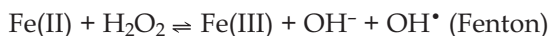
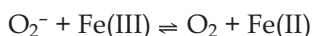
Produit	Viabilité LC50 (µM)	Sécrétion de cortisol EC50 (µM)	LC50/EC50
Atrazine	>50 000	>50 000	–
CdCl2	10 800	168	64,29
ZnCl2	22 800	355	64,22
Mancozeb	>5 000	207	24,16
Endosulfan	308	17,3	17,85
CH3HgCl	1 140	116	9,83
HgCl2	199	22,3	8,92
<i>o,p'</i> -DDD	385	130	2,96
Diazinon	184	109	1,68

5. PESTICIDES ET STRESS OXYDATIF

La toxicité de l’oxygène est un fait connu depuis longtemps. S’il est vital pour les organismes aérobies, l’oxygène est également délétère au travers de la formation, lors des processus métaboliques endogènes, des dérivés extrêmement réactifs que sont les radicaux libres. Leur production est contrôlée par des systèmes endogènes, enzymatiques ou non. De nombreux contaminants vont favoriser la formation de ces oxyradicaux, notamment par l’intermédiaire des composés à potentiel redox (Otto et Moon, 1996). Les radicaux libres sont hautement réactifs en raison de leur structure électronique instable puisqu’ils possèdent un électron non apparié ou célibataire. Ces dérivés peuvent conduire dans la cellule à la peroxydation des lipides membranaires, à l’oxydation des groupements thiols de certaines enzymes ou coenzymes, à l’altération des acides nucléiques (adduits à l’ADN, cancérogenèse, apoptose) (Gutteridge et Halliwell, 1990 ; Stegeman *et al.*, 1992).

5.1. DÉFINITION DU STRESS OXYDATIF

Le stress oxydatif peut être défini comme un déséquilibre entre les systèmes prooxydants et antioxydants en faveur des premiers et impliquant la production d'espèces réactives de l'oxygène (Sies, 1991). La formation incontrôlée d'espèces réactives de l'oxygène comme l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le radical hydroxyle (OH^\bullet) aura des conséquences souvent lourdes pour l'organisme. Mais la formation d'espèces réactives n'est pas toujours synonyme de toxicité. En effet, certaines sont des intermédiaires de processus physiologiques normaux. Ce n'est que lorsque les systèmes de défense sont dépassés et ne suffisent plus à neutraliser la surproduction de ces espèces que la toxicité apparaît. Un stress oxydatif pourra être induit lors de la surproduction d'espèces réactives et/ou par suite de l'inhibition des systèmes antioxydants qui peuvent être inactivés, soit directement, soit par défaut de synthèse. Parmi les espèces réactives de l'oxygène, le radical hydroxyle, présenté comme le plus toxique malgré sa faible diffusion, peut attaquer tous les types de constituants cellulaires et engendrer diverses altérations (dégradation protéique, inactivation enzymatique, lipoperoxydation, adduits à l'ADN, etc.) (Michiels *et al.*, 1994 ; Dringen et Hamprecht, 1997). Il résulte de la fission homolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène et peut aussi être produit par les réactions de Fenton et de Haber-Weiss :



5.2. LES SYSTÈMES DE DÉFENSE ANTIOXYDANTS

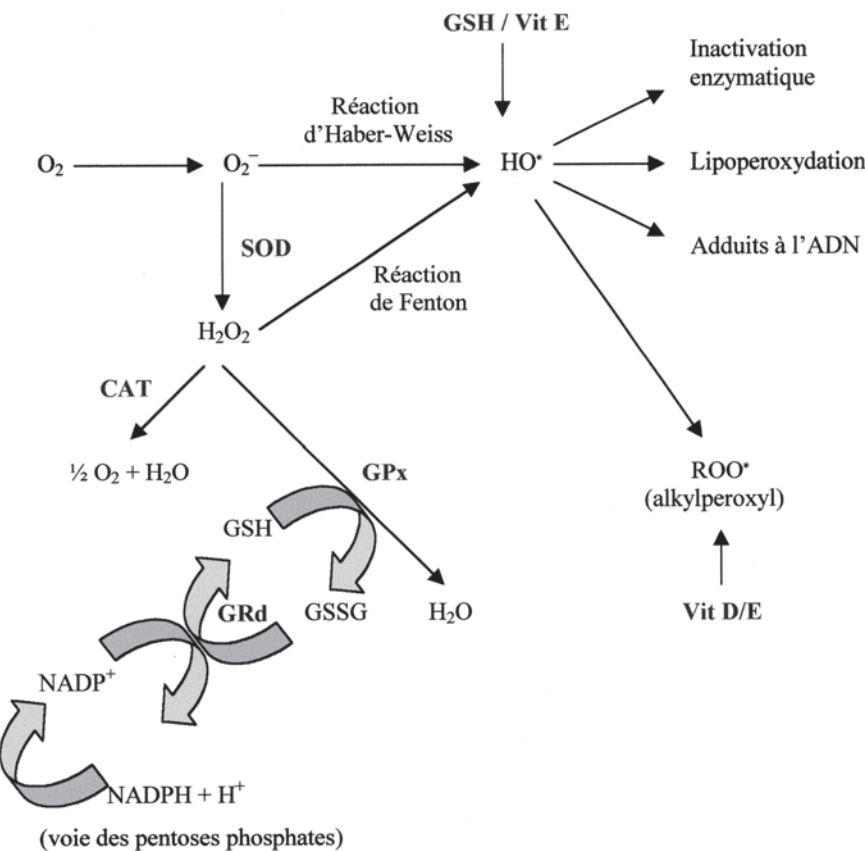
Pour faire face à ces attaques, les organismes ont développé des systèmes d'action antioxydante qui visent : 1) à éliminer les espèces réactives et les catalyseurs de leur formation, 2) à induire la synthèse des antioxydants et 3) à augmenter l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées. Trois types d'enzymes antioxydantes sont mis en œuvre pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène, comme l'illustre la figure 4.6 :

1. Les peroxydases qui catalysent la réduction conjointe d'un hydroperoxyde et d'un peroxyde organique, le glutathion (GSH), suivant la réaction :



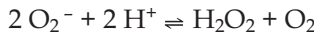
Figure 4.6

Enzymes impliquées dans la défense oxydative



Le maintien d'activité peroxydase implique le recyclage NADPH-dépendant du glutathion réduit par une glutathion réductase, le NADPH étant produit par la voie des pentoses phosphates ($GSSG + NADPH + H^+ \rightleftharpoons 2 GSH + NADP^+$)

2. Les superoxydes dismutases, métalloenzymes capables de dismuter l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, moins réactif, suivant la réaction :



3. Les catalases, qui catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire :



Des antioxydants non enzymatiques agissant comme réducteurs ou capteurs de radicaux vont renforcer l'action des enzymes décrites précédemment. Parmi les réducteurs à fonction thiol libre, le glutathion joue un rôle très important. Le glutathion (tripeptide glutamyl-cystéinyl-glycine) est le thiol protéique le plus abondant dans les organismes vivants. Il est présent majoritairement à l'état réduit (GSH) dans les cellules ; une augmentation de la forme oxydée (GSSG) traduit un stress oxydatif. Il agit comme donneur d'électrons permettant d'éliminer les espèces réactives comme OH^\bullet mais surtout comme substrat des glutathion peroxydases pour la réduction des peroxydes. Les vitamines D et E participent également à l'élimination des espèces réactives de l'oxygène et ce à différents niveaux.

5.3. TRAVAUX EN LABORATOIRE

5.3.1. Exposition *in vitro* à l'endosulfan

Des études récentes ont permis d'établir un lien entre l'exposition à certains pesticides organochlorés (Endrin, Lindane, hexachlorocyclohexane et autres) et induction de stress oxydatif dans différents tissus de mammifères. Chez le poisson, les travaux de Pandey *et al.* (2001) ont permis de mettre en évidence une modulation des systèmes antioxydants au niveau hépatique suite à une exposition chronique à l'endosulfan. Des travaux réalisés dans notre laboratoire avec l'endosulfan, composé très toxique pour les poissons (CL_{50} 96 h truite arc-en-ciel = $1,5\mu\text{g/L}$), ont permis de décrire les effets dose-dépendants de ce dernier sur la synthèse cortisolique (Leblond *et al.*, 2001 ; Bisson et Hontela, 2002) et de démontrer les effets spécifiques adrénotoxiques de celui-ci.

L'exposition aiguë (60 min) à l'endosulfan de cellules corticostéroïdogéniques de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) a démontré une altération des systèmes à action antioxydante (CAT, GPx et GSH) ainsi qu'une activation de la peroxydation des lipides, comme l'illustre la figure 4.7 (Dorval *et al.*, 2003), résultats confirmés par l'utilisation d'activateurs ou d'inhibiteurs de ces différents systèmes (Dorval et Hontela, 2003). Sans connaître précisément encore les mécanismes d'action par lesquels l'endosulfan inhibe la fonction du tissu adrénocortical des poissons, ces résultats, mis en relation avec la présence en grand nombre dans ce tissu de cytochromes P450s (Hornsby, 1989), permettent de penser que les effets de l'endosulfan sont médiés par l'induction d'un stress oxydatif (inhibition des enzymes du stress oxydatif) et par l'altération du cycle cytochrome P450s à l'origine de la production d'espèces réactives de l'oxygène tel que décrit par Dawson (1988). Les espèces réactives ainsi formées pourraient agir en inhibant l'activité d'enzymes directement impliquées dans la synthèse et la sécrétion de cortisol telle que la 11- β hydroxylase.

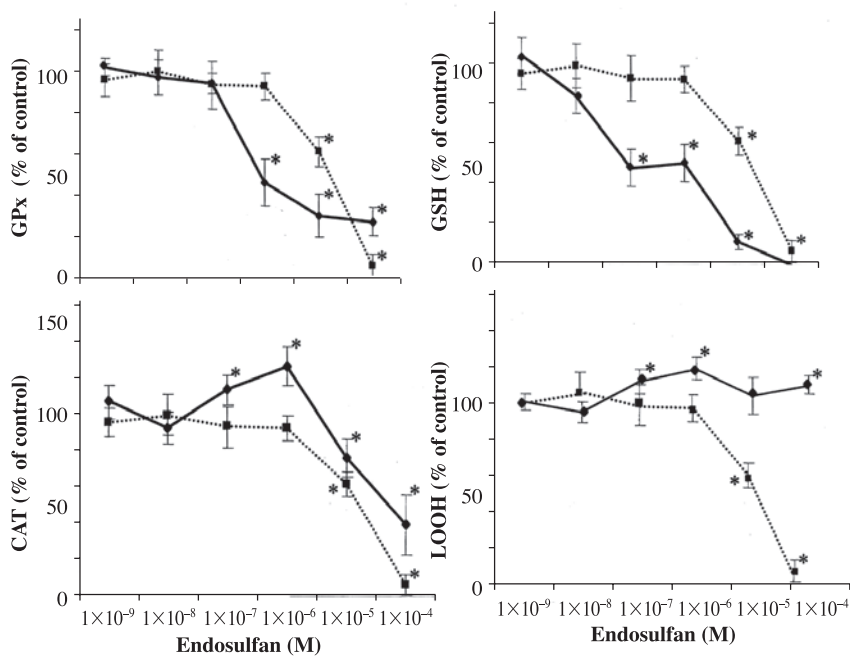
De plus, les résultats obtenus ont permis de démontrer que le maintien du cycle redox du glutathion et, dans une moindre mesure, de l'activité de la CAT, était essentiel au maintien de la fonction des cellules corticostéroïdogéniques exposées à l'endosulfan.

5.3.2. Travaux sur le terrain

Des travaux, toujours en cours, dans la région agricole du Québec (rivière Yamaska) nous permettent d'utiliser l'activité des enzymes antioxydantes (CAT, GPx), les niveaux en glutathion réduit ainsi que les niveaux de lipoperoxydation comme des biomarqueurs sensibles d'une exposition chronique à divers pesticides parmi lesquels l'atrazine ou le métolachlore (Dorval *et al.*, soumis).

Figure 4.7

Effet d'une exposition *in vitro* à l'endosulfan sur la sécrétion de cortisol par les cellules corticostéroïdogéniques de la truite arc-en-ciel



La sécrétion de cortisol est indiquée par la ligne pointillée. GPx: glutathion peroxydase; CAT: catalase; GSH: glutathion réduit; LOOH: hydroxyperoxydes de lipides.

L'objectif principal de cette étude est de vérifier l'impact sur la qualité de l'eau et d'étudier les effets sur la physiologie des poissons retrouvés dans la rivière de l'utilisation des pesticides dans la culture du maïs, l'une des plus importantes en superficie au Québec, couvrant près de 17 % du territoire cultivé. Les approches et les protocoles expérimentaux que nous avons développés et validés dans les régions minières de l'Abitibi et les travaux écotoxicologiques avec la perchaude seront utilisés dans cette nouvelle problématique des pesticides avec une nouvelle espèce, le meunier noir, *Catostomus commersoni*.

6. UTILISATION DES BIOMARQUEURS HORMONAUX

6.1. RECOMMANDATIONS ET PROTOCOLES POUR L'UTILISATION SUR LE TERRAIN

Un biomarqueur est un changement mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui révèle l'exposition présente ou passée d'un organisme à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic *et al.*, 1997). Concernant la surveillance de l'environnement, les biomarqueurs peuvent être utiles non seulement pour l'évaluation de l'exposition aux toxiques présents dans le milieu, mais aussi pour l'évaluation des effets de ces toxiques sur les organismes. Cependant, en l'état actuel des connaissances, ces biomarqueurs ne peuvent être considérés que comme des indicateurs de la présence de polluants dans le milieu et/ou dans les organismes, leur validation pour prédire les effets sur les niveaux d'organisation plus élevés n'étant pas encore vraiment établie.

La première étape de toute étude écotoxicologique, quel que soit le biomarqueur utilisé, est la sélection de sites d'échantillonnage permettant de mettre en évidence des relations entre les concentrations des polluants dans les compartiments abiotiques (eau, air, sol), la charge tissulaire de ces contaminants dans les organismes que nous évaluons et les effets sur les paramètres mesurés (p. ex., biomarqueurs hormonaux). Plusieurs approches peuvent être utilisées dans la sélection : 1) échantillonnage d'un site en amont et d'un site en aval d'une source ponctuelle de pollution (p. ex., usine de production de pâte à papier, voir Hontela *et al.*, 1997) ; 2) échantillonnage des sites situés le long d'un gradient de contamination (p. ex., Rouyn-Noranda et les lacs alentours, voir Laflamme *et al.*, 2000 ; Levesque *et al.*, 2002, 2003 ; figure 4.4) ; 3) échantillonnage des organismes et recherche de corrélation entre charges tissulaires et paramètres physiologiques, une approche à utiliser avec les espèces qui se déplacent et effectuent des migrations. Les documents gouvernementaux rendent souvent disponibles des données importantes sur la contamination des

écosystèmes aquatiques, données qui peuvent être utilisées dans la sélection des sites avant la campagne d'échantillonnage. Des données de chimie analytique sur les concentrations en polluants dans l'environnement et dans les organismes sont essentielles à toute étude écotoxicologique. Des biomarqueurs d'exposition, telles les activités de l'ACHé (acétylcholine estérase) dans le système nerveux ou le sang des animaux exposés aux pesticides organophosphates ou carbamates, peuvent aussi compléter la caractérisation du profil de la contamination.

Une considération importante dans la sélection des sites à échantillonner, en plus des gradients de la contamination, est la similarité des caractéristiques physicochimiques. Il est évident que de nombreux facteurs (p. ex., la température, la disponibilité de la nourriture, le niveau d'eau) peuvent varier entre les sites et influencer le biomarqueur. Il est de ce fait essentiel de choisir des sites présentant des caractéristiques physicochimiques semblables, excepté les niveaux de contamination, afin de faciliter l'interprétation des variations des paramètres physiologiques considérées comme biomarqueurs d'exposition. Les travaux avec les hormones corticostéroïdes sont possibles si les facteurs tels que la saison d'échantillonnage (p. ex., été ou automne), l'heure d'échantillonnage dans la journée (matin ou après-midi), le statut reproducteur des poissons (sexuellement mature ou immature) sont contrôlés. Ces exigences sont indispensables et doivent être prises en compte pour ne pas biaiser l'interprétation des résultats obtenus. Il existe en effet des variations nycthémérales dans les concentrations plasmatiques de cortisol, et la température, la photopériode et le statut de maturation sexuelle influencent la sécrétion de cortisol chez les poissons (Audet et Claireaux, 1992 ; Pottinger *et al.*, 1995 ; Hontela, 1997).

Le choix de l'espèce sentinelle échantillonnée afin d'évaluer l'état du milieu peut être parfois difficile. Des connaissances détaillées de la biologie de l'organisme, de son cycle reproducteur, ses cycles hormonaux, variations nycthémérales et autres sont essentielles à une juste interprétation des résultats. La grande majorité des données physiologiques ont été obtenues en étudiant la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, ou le poisson rouge, *Carassius auratus*, deux espèces souvent utilisées en laboratoire et rarement présentes sur des sites pollués, la truite en raison de sa grande sensibilité et le poisson rouge du fait qu'il n'est pas une espèce endémique de l'Amérique du Nord (Scott et Crossman, 1973).

Parmi les tests fonctionnels possibles, la stimulation à l'ACTH ou le confinement physique afin de maximiser la synthèse en hormones corticostéroïdes et de faciliter ainsi la détection de toute anomalie dans la synthèse de l'hormone sont couramment utilisés.

6.2. AVANTAGES ET LIMITATIONS

La grande sensibilité des paramètres hormonaux est un avantage important dans leur utilisation comme biomarqueurs. Néanmoins, il existe de nombreuses interactions entre les différents systèmes hormonaux, particulièrement en ce qui concerne les corticostéroïdes et les hormones thyroïdiennes. De plus, les différents paramètres physiologiques de l'organisme quel qu'il soit sont soumis à des variations saisonnières, nycthémérales, etc., variations qu'il faut prendre en compte et interpréter en relation avec la biologie et l'endocrinologie fondamentale de l'organisme avant de pouvoir interpréter les données obtenues sur le terrain.

La recherche de biomarqueurs a pour but d'évaluer les risques d'effets à long terme, résultant de l'exposition chronique, donc prolongée, à des polluants présents à des concentrations faibles dans l'environnement. Si les paramètres hormonaux tels que la sécrétion de cortisol ont été définis comme de bons biomarqueurs d'exposition en laboratoire, il est en revanche plus difficile de les utiliser pour évaluer l'impact des polluants dans l'environnement (contamination par plusieurs types de polluants, niveaux d'exposition différents suivant les espèces [chaîne trophique en particulier], mécanismes d'adaptation physiologique, écarts dans la durée d'exposition, etc.). Par conséquent, l'utilisation de biomarqueurs hormonaux ne peut se faire que par une approche multi-critères qui combine la mesure de paramètres variables (cortisol, hormones thyroïdiennes par exemple) avec des paramètres déjà établis comme de bons biomarqueurs d'exposition (activité de l'EROD et contamination par les hydrocarbures aromatiques polycycliques par exemple), approche qui consiste en la validation, indispensable, d'un ou de plusieurs biomarqueurs. Il convient donc de mesurer un maximum de paramètres de façon à éviter tout biais dans l'interprétation des résultats. L'utilisation de biomarqueurs, quels qu'ils soient, impose donc beaucoup de précautions. Il est notamment essentiel et primordial de caractériser avec précision les écosystèmes étudiés (variation naturelle des facteurs écologiques, physicochimiques, connaissances de la biologie de chaque espèce). Un biomarqueur, hormonal ou non, ne peut donc en aucun cas être utilisé comme outil unique pour détecter la présence de polluants dans l'environnement et pour décrire les effets sur les organismes vivants. Il s'agit par conséquent d'utiliser plusieurs biomarqueurs et situés à différents niveaux d'organisation biologique (moléculaire, cellulaire, tissulaire). Néanmoins, l'utilisation de biomarqueurs comme outil de prédiction ouvre des perspectives d'avenir importantes pour la recherche pour les années à venir.

7. PERSPECTIVES

Les données déjà connues et retrouvées dans la littérature sont essentielles et utiles à l'extrapolation à d'autres espèces que les poissons et amphibiens déjà étudiés. Il est de plus intéressant d'utiliser ces données comme base pour étudier d'autres systèmes contaminés par différents types de polluants tels que les pesticides ou les hydrocarbures.

Ces études sont nécessaires afin d'améliorer les connaissances sur les mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens ou d'autres toxiques pour établir des liens de cause à effet entre exposition et effets sur la santé, définir ainsi des normes compatibles avec la santé physiologique optimale des organismes vivants dans les milieux perturbés par les activités humaines et développer de nouvelles technologies pour réduire les émissions dans l'eau ou l'air dans un souci de préservation et de maintien de l'intégrité du biotope.

8. CONCLUSION

L'une des conséquences d'une démographie mondiale en pleine expansion et de l'accroissement parallèle des besoins dans les domaines de la nutrition, de la santé et du développement économique a été l'augmentation remarquable de la production de l'industrie chimique (De Voogt, 1996). Plusieurs des substances utilisées dans l'industrie ou l'agriculture se retrouvent dans l'environnement et en particulier dans les milieux aquatiques, ce qui ne va pas sans poser de sérieux problèmes environnementaux. L'amélioration de la connaissance des effets écotoxicologiques de ces substances au cours de la dernière décennie a conduit à restreindre, voire interdire, l'usage de certaines d'entre elles avec la mise en évidence de leurs effets persistants sur l'environnement (Hargrave *et al.*, 1992). La recherche dans le domaine de l'écotoxicologie doit cibler les liens de causalité entre l'exposition à des polluants environnementaux dans le milieu et les effets néfastes à la santé afin d'établir des seuils sans effets pour ces nombreuses substances chimiques utilisées par nos sociétés. La recherche mécanistique, qui vise à élucider les mécanismes d'action au niveau des organes et des cellules cibles, génère des données irréfutables et essentielles pour l'évaluation du risque environnemental.

Les biomarqueurs constituent des outils intéressants pour la surveillance de l'environnement ; cependant, l'interprétation des résultats doit être faite avec précaution notamment dans l'évaluation d'une atteinte éventuelle des écosystèmes. En effet, l'un des principaux problèmes qui se posent dans l'évaluation du risque reste l'extrapolation des résultats

obtenus sur un petit nombre d'individus à la population entière et à l'écosystème entier étant donné les variations intra- et interspécifiques qui existent. La plupart des études réalisées *in situ* montrent qu'il est difficile de détecter des modifications d'activité métabolique ou enzymatique sur un échantillonnage de faible effectif. Chez le poisson, des travaux précédents ont en effet largement démontré l'amplitude des variations individuelles (Roche et Bogé, 1996). Ce type d'étude fait appel, pour l'interprétation des données, à des analyses statistiques plus complexes qui ne peuvent être réalisées qu'avec des échantillonnages plus importants pour chaque groupe d'individus. Une approche multidisciplinaire réunissant des méthodologies propres à l'écotoxicologie, à l'endocrinologie et physiologie fauniques, ainsi qu'à l'écologie et la biochimie, est essentielle pour une estimation valable des impacts de la pollution sur la santé des organismes exposés dans l'écosystème. Les biomarqueurs hormonaux doivent être considérés comme des outils de détection des effets sur la santé qui nous permettront, d'une part, de prendre des décisions concernant l'état de nos écosystèmes et, d'autre part, de nous fournir des informations précieuses sur les processus et les mécanismes physiologiques que les espèces fauniques utilisent pour répondre aux perturbations environnementales.

RÉFÉRENCES

- AUDET, C. et G. CLAIREAUX (1992). « Diel and seasonal changes in resting levels of various blood parameters in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 49, p. 870-877.
- BENTLEY, P.J. (1998). *Comparative Vertebrate Endocrinology*, 3^e éd., Cambridge, UK, Cambridge University Press.
- BISSON, M. et A. HONTELA (2002). « Cytotoxic and endocrine-disrupting potential of atrazine, diazinon, endosulfan and mancozeb in adrenal steroidogenic cells of rainbow trout exposed *in vitro* », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 180, p. 110-117.
- BLEAU, H., C. DANIEL, G. CHEVALIER, H. VAN-TRA et A. HONTELA (1996). « Effects of acute exposure to mercury chloride and methylmercury on plasma cortisol, T₃, T₄, glucose and liver glycogen in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) », *Aquatic Toxicology*, vol. 34, p. 221-235.
- BRODEUR J.C., C. DANIEL, A.C. RICARD et A. HONTELA (1998). « *In vitro* response to ACTH of the interrenal tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cadmium », *Aquatic Toxicology*, vol. 42, p. 103-113.
- BRODEUR J.C., G. SHERWOOD, J.B. RASMUSSEN et A. HONTELA (1997). « Impaired cortisol secretion in yellow perch (*Perca flavescens*) from lakes contaminated by heavy metals : *In vivo* and *in vitro* assessment », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 54, p. 2752-2758.
- BROUWER, A. et K.C. VAN DEN BERG (1986). « Binding of a metabolite of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl to transthyretin reduces serum vitamin A transport by inhibiting the formation of the protein complex carrying both retinol and thyroxin », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 85, p. 301-312.
- BURY, N.R., L. JIE, G. FLIK, R.A.C. LOCK et S.E. WENDELAAR BONJA (1998). « Cortisol protects against copper induced necrosis and promotes apoptosis in fish gill chloride cells *in vitro* », *Aquatic Toxicology*, vol. 40, p. 193-202.
- CARTIER F., C. DELARUE, I. REMY-JOUE, M.K. KODJO, A. FOURNIER et H. VAUDRAY (1999). « The stimulatory effect of endothelin-1 on frog adrenocortical cells is mediated through both the phospholipase C and the adenylyl cyclase pathways », *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 147, p. 27-36.
- COLBORN, T. (1995). « Pesticides : How research has succeeded and failed to translate science into policy : Endocrinological effects on wildlife », *Environmental Health Perspectives*, vol. 103, p. 81-85.
- COPER, R.L. et R.J. KAVLOCK (2001). « Determining indicators of exposure and effects for endocrine disrupting chemicals (EDCs) : An introduction », *Human and Ecological Risk Assessment*, vol. 7, p. 971-978.
- DAWSON, J.H. (1988). « Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxydases », *Science*, vol. 240, p. 433-439.
- GUTTERIDGE, J.M.C. et B. HALLIWELL (1990). « The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems », *TIBS*, vol. 15, p. 129-135.
- DE VOOGT, P. (1996). « Ecology of chlorinated aromatic hydrocarbons », *Environmental Science and Technology*, vol. 6, p. 89-112.
- DORVAL, J. et A. HONTELA (2003). « Role of glutathione redox cycle and catalase in defence against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 192, p. 191-200.
- DORVAL, J., V.S. LEBLOND, C. DEBLOIS et A. HONTELA (2003). « Oxidative stress as a biomarker of chronic exposure to pesticides in white sucker (*Catostomus commersoni*) from the Yamaska, a river draining an agricultural area in Quebec », soumis à *Environmental Toxicology and Chemistry*.

- DORVAL, J., V.S. LEBLOND et A. HONTELA (2003). «Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed *in vitro* to endosulfan, an organochlorine pesticide », *Aquatic Toxicology*, vol. 63, p. 229-241.
- DRINGEN, R. et B. HAMPRECHT (1997). « Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells », *Brain Research*, vol. 759, p. 67-75.
- FREEMAN, H.C. et G.B. SANGALANG (1977). « A study of the effects of methyl mercury, cadmium, arsenic, selenium, and a PCB (Aroclor 1254) on adrenal and testicular steroidogenesis *in vitro*, by the gray seal *Halichoerus grypus* », *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 5, p. 369-383.
- GOULET, B.N. et A. HONTELA (2003). « Toxicity of cadmium, endosulfan and atrazine in adrenal steroidogenic cells of two amphibian species, *Xenopus laevis* and *Rana catesbeiana* », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 22, p. 2106-2113.
- HARGRAVE, B.T., G.C. HARDING, W.P. VASS, P.E. ERICKSON, B.R. FOWLER et V. SCOTT (1992). « Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in the Arctic ocean food web », *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 22, p. 41-54.
- HARVEY, P.W. (1996). *The Adrenal in Toxicology: Target Organ and Modulator of Toxicity*, Londres, Taylor and Francis.
- HEATH, A.G. (1995). *Water Pollution and Fish Physiology*, 2^e éd., Boca Raton, FL, CRC Press, Lewis Publishers.
- HINKLE, P.M., P.A. KINSELLA et K.C. OSTERHOUDT (1987). « Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 262, p. 16333-16337.
- HINKLE, P.M. et M.E. OSBORNE (1994). « Cadmium toxicity in rat pheochromocytoma cells: studies on the mechanism of uptake », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 124, p. 91-98.
- HONTELA, A. (1997). « Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: Role of glucocorticosteroid hormones », *Reviews in Toxicology*, vol. 1, p. 1-46.
- HONTELA, A. (1998). « Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: *In vivo* and *in vitro* assessment », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 17, p. 44-48.
- HONTELA, A., C. DANIEL et J.B. RASMUSSEN (1997). « Structural and functional impairment of the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish exposed to bleached kraft mill effluent in the St. Maurice River, Québec », *Ecotoxicology*, vol. 6, p. 1-12.
- HONTELA, A., C. DANIEL et A.C. RICARD (1996). « Effects of acute and subacute exposures to cadmium on the interrenal and thyroid function in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* », *Aquatic Toxicology*, vol. 35, p. 171-182.
- HONTELA, A. et A. LACROIX (2004). « Heavy metals », dans J. Carr et D.O. Norris (dir.), *Endocrine Disruptors: Biological Basis for Health Effects in Wildlife and Humans*, New York, Oxford University Press.
- HORNSBY, P.J. (1989). « Steroid and xenobiotic effects on the adrenal cortex: Mediation by oxidative and other mechanisms », *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 6, p. 103-115.
- LACROIX, M. (2002). Caractérisation de la voie signalétique menant à la synthèse de cortisol chez la Truite arc-en-ciel: effet(s) de pesticides sur la transduction du signal, mémoire de maîtrise en biologie, Université du Québec à Montréal.
- LACROIX, M. et A. HONTELA (2001). « Regulation of acute cortisol synthesis by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C in a teleost species, the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) », *Journal of Endocrinology*, vol. 169, p. 71-78.
- LAFLAMME, J.S., Y. COUILLARD, P.G.C. CAMPBELL et A. HONTELA (2000). « Interrenal metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu, and Zn exposure in yellow perch, *Perca flavescens*, from Abitibi lakes », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 57, p. 1692-1700.

- LAGADIC, L., T. CAQUET et J.C. AMIARD (1997). « Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions », dans L. Lagadic, T. Caquet, J.-C. Amiard et F. Ramade (dir.), *Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux*, Paris, Masson.
- LASKEY, J.W. et P.V. PHELPS (1991). « Effects of cadmium and other metal cations on *in vitro* Leydig cell testosterone production », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 108, p. 296-306.
- LEBLOND, V.S., M. BISSON et A. HONTELA (2001). « Inhibition of cortisol secretion in dispersed head kidney cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by endosulfan, an organochlorine pesticide », *General and Comparative Endocrinology*, vol. 121, p. 48-56.
- LEBLOND, V.S. et A. HONTELA (1999). « Effects of *in vitro* exposures to cadmium, mercury, zinc, and 1-(2-chlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane on steroidogenesis by dispersed interrenal cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 157, p. 16-22.
- LEVESQUE, H., J. DORVAL, G.J. VAN DER KRAAK, P.G.C. CAMPBELL et A. HONTELA (2003). « Hormonal, morphological and physiological responses of yellow perch (*Perca flavescens*) to chronic environmental metal exposure », *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 66, p. 657-676.
- LEVESQUE, H., T.W. MOON, P.G.C. CAMPBELL et A. HONTELA (2002). « Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field », *Aquatic Toxicology*, vol. 60, p. 257-267.
- LOCKHART, W.L., J.F. UTHE, A.R. KENNEY et P.M. MEHRLE (1975). « Methylmercury in northern pike (*Esox lucius*): Distribution, elimination, and some biochemical characteristics of contaminated fish », *Journal of Fisheries Research Board of Canada*, vol. 29, p. 1519-1523.
- MATHIAS, S.A., O.P. MGBONYEBI, E. MOTLEY, J.R. OWENS et J.J. MROTEK (1998). « Modulation of adrenal cell functions by cadmium salts. 4. Ca^{2+} -dependent sites affected by CdCl_2 during basal and ACTH-stimulated steroid synthesis », *Cell Biology and Toxicology*, vol. 14, p. 225-236.
- MCDONALD, D.G. et C.M. WOOD (1993). « Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish », dans J.C. Rankin et F.B. Jensen (dir.), *Fish Ecophysiology*, Londres, Chapman and Hall.
- MCGEER, J.C., C. SZEDEDINSKY, D.G. McDONALDS et C.M. WOOD (2000). « Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs », *Aquatic Toxicology*, vol. 50, p. 231-243.
- MGBONYEBI, O.P., C.T. SMOTHERS et J.J. MROTEK (1994). « Modulation of adrenal cell functions by cadmium salts: 3. Sites affected by CdCl_2 during stimulated steroid synthesis », *Cell Biology and Toxicology*, vol. 10, p. 35-43.
- MICHIELS, C., M. RAES, O. TOUSSAINT et J. REMACLE (1994). « Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress », *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 17, p. 235-248.
- MOMMSEN, T.P., M.M. VIJAYAN et T.W. MOON (1999). « Cortisol in teleosts: Dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation », *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, vol. 9, p. 211-268.
- NISHIYAMA, S., K. NAKAMURA et M. OGAWA (1985). « Effects of heavy metals on corticosteroid production in cultured rat adrenocortical cells », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 81, p. 174-176.
- NORRIS, D.O. (2002). « Adrenal system in vertebrates », dans J. Carr et D.O. Norris (dir.), *Endocrine Disruptors: Biological Basis for Health Effects in Wildlife and Humans*, New York, Oxford University Press.
- NORRIS, D.O., S. DONAHUE, R. DORES, J.K. LEE, T. MALDONADO, T. RUTH et J.D. WOODLING (1998). « Impaired adrenocortical response to stress by brown trout, *Salmo trutta*, living in metal-contaminated waters of the Eagle River, Colorado », *General and Comparative Endocrinology*, vol. 113, p. 1-8.

- OTTO, D.M.E. et T.W. MOON (1996). « Phase I and II enzymes and antioxidant responses in different tissues of brown bullheads from relatively polluted and non-polluted systems », *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 31, p. 141-147.
- PANDEY, S., I. AHMAD, S. PARVEZ, B. BIN-HAFEEZ, R. HAQUE et S. RAISUDDIN (2001). « Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish *Channa punctatus* Bloch : 1. Protection against lipid peroxidation in liver by copper preexposure », *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 41, p. 345-352.
- PANKHURST, N.W. et G.J. VAN DER KRAAK (2000). « Evidence that acute stress inhibits ovarian steroidogenesis in rainbow trout *in vivo*, through the action of cortisol », *General and Comparative Endocrinology*, vol. 117, p. 225-237.
- PATINO, R., C.S. BRADFORD et C.B. SCHRECK (1986). « Adenylate cyclase activators and inhibitors, cyclic nucleotide analogs, and phosphatidylinositol : Effects on interrenal function of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) *in vitro* », *General and Comparative Endocrinology*, vol. 63, p. 230-235.
- POTTINGER T.G., P.H.M. BALM et A.D. PICKERING (1995). « Sexual maturity modifies the responsiveness of the pituitary-interrenal axis to stress in male rainbow trout », *General and Comparative Endocrinology*, vol. 98, p. 311-320.
- PRATAP, H.B. et S.E. WENDELAAR BONGA (1990). « Effects of waterborne cadmium on plasma cortisol and glucose in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus* », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 95C, p. 313-317.
- RICARD, A.C., C. DANIEL, P. ANDERSEN et A. HONTELA (1998). « Effects of subchronic exposure to cadmium chloride on endocrine and metabolic functions in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* », *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 34, p. 377-381.
- ROCHE, H. et G. BOGÉ (1996). « Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication », *Marine Environmental Research*, vol. 41, p. 27-43.
- SASTRY, K.V., S. SACHDEVA et P. RATHEE (1997). « Chronic toxic effects of cadmium and copper, and their combination on some enzymological and biochemical parameters in *Channa punctatus* », *Journal of Environmental Biology*, vol. 18, p. 291-303.
- SCOTT, W.B. et E.J. CROSSMAN (1973). *Freshwater Fishes of Canada*, Ottawa, Fisheries Research Board of Canada, Bulletin 184.
- SHERWOOD, G.D., J.B. RASMUSSEN, D.J. ROWAN, J. BRODEUR et A. HONTELA (2000). « Bioenergetic costs of heavy metal exposure in yellow perch (*Perca flavescens*) : *In situ* estimates with a radiotracer (¹³⁷Cs) technique », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 57, p. 441-450.
- SHERWOOD, G.D., J. KOVACS, A. HONTELA et J.B. RASMUSSEN (2002a). « Simplified food webs lead to energetic bottlenecks in polluted lakes », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 59, p. 1-5.
- SHERWOOD, G., I. PAZZIA, A. MOESER, A. HONTELA et J.B. RASMUSSEN (2002b). « Shifting gears : Enzymatic evidence for the energetic advantage of switching diet in wild-living fish », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 59, p. 229-241.
- SIES, H. (1991). « Oxidative stress : Introduction », dans H. Sies (dir.), *Oxidative Stress, Oxidants and Antioxidants*, San Diego, Academic Press.
- SJÖBECK, M.L., C. HAUX, Å. LARSSON et G. LITHNER (1984). « Biochemical and hematological studies on perch, *Perca fluviatilis*, from the cadmium-contaminated river Emån », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 8, p. 303-312.
- STEGEMAN, J.J., M. BROUWER, R.T. DI GIULIO, L. FÖRLIN, B.A. FOWLER, B.M. SANDERS et P.A. VAN VELD (1992). « Molecular responses to environmental contamination : Enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect », dans R.J. Hugget, R.A. Kimerle, P.M. Mehrle et H.L. Bergman (dir.), *Biomarkers, Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*, Boca Raton, FL, Lewis Publishers.
- STOCCO, D.M. (2000). « Intramitochondrial cholesterol transfer », *Biochimica Biophysica Acta*, vol. 1486, p. 184-197.

- VAN DER KRAAK, G.J., M. HEWITT, A. LISTER, M.E. MCMASTER et K.R. MUNKITTRICK (2001). « Endocrine toxicants and reproductive success in fish », *Human and Ecological Risk Assessment*, vol. 7, p. 1017-1025.
- VELTMAN, J.C. et M.D. MAINES (1986). « Alterations of heme, cytochrome P450, and steroid metabolism by mercury in rat adrenal », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 248, p. 467-478.
- WALSH, L.P., C. MCCORMICK, C. MARTIN et D.M. STOCCO (2000). « Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression », *Environmental Health Perspectives*, vol. 108, p. 769-776.
- WALSH, L.P. et D.M. STOCCO (2001). « Effects of lindane on steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression », *Biology of Reproduction*, vol. 63, p. 1024-1033.

RÉTINOÏDES

Biomarqueurs et base moléculaire d'effets de substances toxiques

MONIQUE BOILY

*Centre de recherche en toxicologie
de l'environnement (TOXEN) et
Département des sciences biologiques,
Université du Québec à Montréal*

MARJOLAINE BISSON

*Centre de recherche en toxicologie
de l'environnement (TOXEN) et
Département des sciences biologiques,
Université du Québec à Montréal*

PHILIP A. SPEAR

*Centre de recherche en toxicologie
de l'environnement (TOXEN) et
Département des sciences biologiques,
Université du Québec à Montréal*

RÉSUMÉ

Les rétinoïdes sont des composés dont la structure ressemble à celle du rétinol et qui sont formés à partir des caroténoïdes acquis par le biais de la nourriture. Un certain nombre de rétinoïdes, associés à « la vitamine A », sont responsables d'effets biologiques ou sont des précurseurs de formes biologiquement actives. Puisque les animaux n'ont pas la capacité de synthèse *de novo* des rétinoïdes, le stockage de fortes concentrations est une stratégie pour pallier à des carences transitoires dues à des facteurs environnementaux ou physiologiques. Les rétinoïdes sont essentiels à une vaste gamme de fonctions dans l'organisme comprenant divers aspects de la reproduction, du développement de l'embryon et de la croissance. Une carence ou un excès en rétinoïdes ainsi que des effets sur le système de signalisation de l'acide rétinoïque peuvent occasionner des effets néfastes pour l'organisme.

La recherche complétée à ce jour démontre que les contaminants de type hydrocarbures halogènes polyaromatiques et hydrocarbures aromatiques polycycliques affectent les rétinoïdes chez plusieurs groupes d'animaux. L'effet le plus courant réside dans la diminution des rétinoïdes stockés au niveau du foie. Cet effet est utilisé comme biomarqueur chez les oiseaux et poissons. Une extension de cet effet, le stockage/mobilisation de rétinoïdes dans les œufs d'oiseaux, sert également de biomarqueur. Une relation directe de cause à effet entre les contaminants et les rétinoïdes n'a pas été établie. Et bien que l'activité des enzymes LRAT et HER (responsables de l'assimilation des rétinoïdes) soit affectée par des contaminants de type organochloré, l'ensemble des résultats n'indique toujours pas de mécanisme d'action probable.

Par ailleurs, des corrélations négatives sont souvent repérées entre les concentrations hépatiques de rétinoïdes et les enzymes dépendantes du système CYP450 (EROD, AHH), ou l'induction du CYP1A. Ces corrélations sont associées à des organismes qui subissent différents niveaux d'exposition aux substances inductrices du CYP450; les plus exposés ont les plus faibles concentrations de rétinoïdes. Ces corrélations n'impliquent pas de relation de cause à effet entre le CYP450 et le stockage de rétinoïdes. Cependant, le système CYP450 est capable de métaboliser l'acide rétinoïque, une forme très active, par le biais de sa liaison avec les récepteurs nucléaires RAR et RXR. Un tel changement pourrait amener de multiples effets dans différents types de cellules par la diminution d'un ligand de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque et par la production de métabolites (p. ex., l'acide 4-oxo-rétinoïque) ayant aussi une grande affinité pour ces récepteurs.

La concentration plasmatique de rétinol, ou de déhydro-rétinol pour certaines espèces, est le résultat de plusieurs interactions homéostatiques. Les effets des substances toxiques sur ces formes de rétinoïdes sont difficiles à interpréter, mais quelques études de terrain démontrent des corrélations intéressantes.

Nous présentons deux projets de biosurveillance incluant les rétinoïdes qui permettent de statuer sur leur utilisation comme biomarqueurs.

1. INTRODUCTION

Les rétinoïdes sont des composés essentiels à plusieurs fonctions biologiques de base : différenciation cellulaire, croissance, développement, reproduction et vision. Un excès ou un manque de rétinoïdes peut entraîner des conséquences néfastes pour un organisme et, dans certains cas, compromettre sa survie. Certaines formes de rétinoïdes peuvent avoir des effets nuisibles ; par exemple, le rétinol peut être cytotoxique en endommageant les membranes cellulaires et l'acide rétinoïque a des pouvoirs tératogènes. En contrepartie, le rétinol est la forme de transport sanguine privilégiée et l'acide rétinoïque est indispensable au développement embryonnaire. Récemment, on a mis en évidence le rôle joué par les rétinoïdes dans la migration des cellules lors de la formation du tube et de la crête neurale (Pijnappel *et al.*, 1993 ; Maden *et al.*, 1998) et dans le patron des structures embryonnaires par leur activation des gènes Hox (Marshall *et al.*, 1996). Les rétinoïdes sont donc des composés physiologiques essentiels et, parce que leur concentration est critique à toutes les étapes de la vie, le système de « signalisation rétinoïde » est équipé d'enzymes et de récepteurs spécifiques, primordiaux à sa régulation.

Traditionnellement, les rétinoïdes ont fait l'objet de nombreuses études dans le domaine de la nutrition et des revues exhaustives concernant leurs fonctions et leurs propriétés ont été publiées (Goodman et Blaner, 1984 ; Underwood, 1984 ; Blomhoff *et al.*, 1991 ; Barua et Furr, 1998). Utilisés dans des programmes de biosurveillance, les rétinoïdes se sont avérés sensibles à la présence de contaminants environnementaux. Dans les premières études de terrain impliquant des biomarqueurs et des colonies d'oiseaux des Grands Lacs, les rétinoïdes se sont avérés efficaces pour révéler les conditions environnementales de cet écosystème et l'état de santé des populations d'oiseaux. Depuis, les recherches se sont étendues à d'autres écosystèmes et à d'autres espèces animales. Combinée à une technologie qui ne cesse de s'améliorer, la recherche sur les rétinoïdes est en plein essor et la littérature abonde pour faire état des aspects physiologiques, cellulaires et moléculaires, continuellement remis à jour.

Les pages qui vont suivre résument les principales connaissances se rattachant aux rétinoïdes dans des conditions d'homéostasie et lors de déséquilibres provoqués par des substances toxiques. Nous accordons une attention particulière à l'utilisation des rétinoïdes comme biomarqueurs tout en faisant état des recherches les plus récentes dans le domaine.

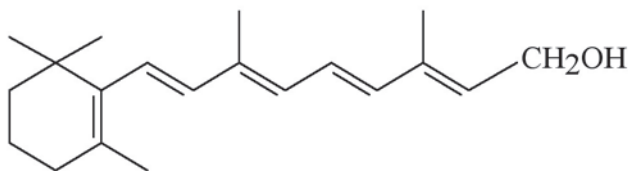
2. BIOCHIMIE, MÉTABOLISME ET ACTION MOLÉCULAIRE

2.1. ABSORPTION, MÉTABOLISME, STOCKAGE ET TRANSPORT DES RÉTINOÏDES MAJEURS

Les rétinoïdes sont des molécules dont la structure s'apparente au rétinol, mieux connu sous le nom de « vitamine A ». De façon générale, les molécules de rétinoïdes consistent en une chaîne de carbones dont les extrémités sont occupées par un cycle méthylé et un groupe fonctionnel (figure 5.1). Les rétinoïdes peuvent être biologiquement actifs (rétinol, acide rétinoïque) ou constituer une réserve dans différents tissus. La réserve la plus importante se trouve au niveau du foie, où les rétinoïdes sont estérifiés ; environ 90 % de ces esters sont sous forme de palmitate de rétinol chez les mammifères.

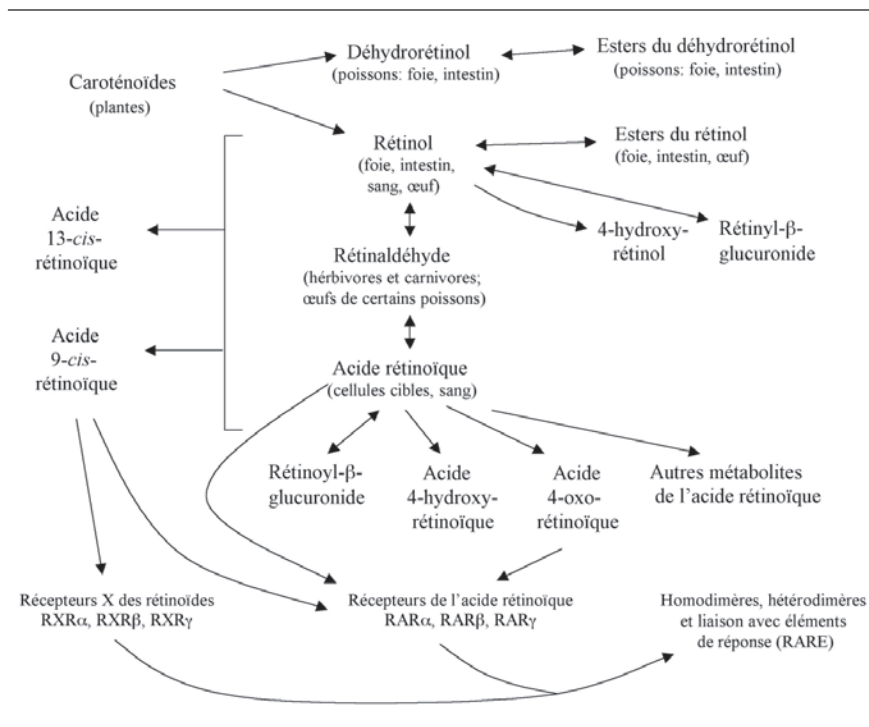
Figure 5.1

Structure générale des rétinoïdes



Les rétinoïdes sont issus de précurseurs, des caroténoïdes, que la majorité des vertébrés assimilent par le biais de la nourriture. Faute de pouvoir synthétiser la vitamine A *de novo*, les animaux peuvent stocker des quantités relativement élevées de rétinoïdes dans le foie, ce qui leur permet de compenser les fluctuations dues à la disponibilité de la nourriture. La vitamine A ainsi stockée peut être mobilisée de façon ponctuelle pour répondre à certaines exigences physiologiques (besoins accrus pour la formation des œufs, par exemple) ou à un apport nutritionnel inadéquat (diète associée à l'hivernage ou à la migration).

Selon Underwood (1984) les sources les plus importantes de rétinoïdes pour les animaux sont les isoformes α , β et γ de la carotène ainsi que la cryptoxanthine. Les caroténoïdes sont des provitamines qui peuvent être converties en rétinoïdes (figure 5.2). Dans la muqueuse intestinale, l'enzyme 15,15'-dioxygénase peut convertir le β -carotène en rétinaldéhyde, qui est ensuite réduit en rétinol sous l'action réversible de la rétinaldéhyde réductase. Plusieurs xanthophylles naturelles n'ont pas la structure moléculaire nécessaire pour être scindées sous l'action de cette enzyme et, par conséquent, ne sont pas reconnues comme des provita-

Figure 5.2**Schéma général des interactions concernant les rétinoïdes**

mines. Par exemple, la lycopène, la zéaxanthine et la lutéine, qui sont des caroténoïdes que l'on retrouve en abondance, ne produisent pas de rétinoïdes biologiquement actifs (Underwood, 1984). Chez le poisson, du rétinol peut être généré à partir des caroténoïdes oxygénés comme l'astaxanthine, la cantaxanthine et l'isozéanthine (Gross et Budowski, 1966 ; Barua, 1978 ; Olson, 1983, 1989). En plus du rétinol et des esters de rétinol, on retrouve également chez le poisson du déhydrorétinol et des esters dérivés du déhydrorétinol stockés dans le foie. Ceci est dû à un métabolisme spécialisé sur la lutéine, l'anhydrolutéine et possiblement d'autres caroténoïdes. Des études nutritionnelles démontrent qu'il existe des variations interspécifiques considérables dans les voies métaboliques de labiosynthèse des rétinoïdes. Par exemple, chez le poisson xiphophore, *Xiphophorus variatus*, les rétinoïdes de type rétinol sont les plus abondants, tandis que les rétinoïdes de type déhydrorétinol sont prédominants chez le guppy, *Lebistes reticulatus*, après l'absorption de régimes riches en β-carotène (Gross et Budowski, 1966). Goswami et Barua (1981) ont classé

les poissons d'eau douce de l'Inde selon la dominance du rétinol ou du déhydrorétinol dans les tissus sans être capables de spécifier si les différences interspécifiques observées étaient dues à des caractéristiques biochimiques génétiquement déterminées ou à une alimentation différente en termes de caroténoïdes.

Lors de l'absorption par les cellules intestinales, le rétinol est estérifié par les enzymes LRAT (Lécithine rétinol acyltransférase) ou ARAT (Acyl-coenzyme A rétinol acyltransférase) et les esters ainsi formés sont incorporés dans les chylomicrons. Ceux-ci sont transportés au foie par le système lymphatique où ils sont stockés dans les hépatocytes et, dans une plus grande proportion, dans les cellules étoilées. D'autres organes peuvent également emmagasiner des rétinoïdes : les reins, les intestins et les poumons pour ne nommer que ceux-là. Ganguly (1989) a suggéré que le hareng, le saumon et la truite (genre et espèces non spécifiés) peuvent stocker une plus grande quantité de vitamine A dans leurs tissus viscéraux, plus particulièrement dans le caecum pylorique, que dans le foie. De la même façon, la partie antérieure de l'intestin de l'omble de fontaine, *Salvelinus fontinalis*, et de l'esturgeon jaune, *Acipenser fulvescens*, a été identifiée comme étant un site de stockage du palmitate de rétinol et du palmitate de déhydrorétinol (Ndayibagira *et al.*, 1995).

Selon les besoins de l'organisme, les esters du rétinol peuvent être hydrolysés par une enzyme comme la HER (hydrolase des esters du rétinol) et atteindre les cellules cibles par le biais de la circulation sanguine ; le rétinol est alors lié à une protéine de transport (*Retinol-Binding Protein* ou RBP) pour former le complexe rétinol-RBP, lui-même lié à la transthyrétine (TTR). Lorsqu'il atteint un site cible, le rétinol se dissocie des protéines de transport, entre dans la cellule et se lie à une autre protéine intracellulaire (*Cellular Retinol-Binding Protein* ou CRBP). Il peut être transformé en rétinaldéhyde et ensuite en acide rétinoïque, qui a son propre transporteur cytosolique (*Cellular Retinoic Acid-Binding Protein* ou CRABP). La production d'acide rétinoïque intracellulaire confirme l'hypothèse que la régulation de l'activité de la vitamine A est déterminée en partie par le métabolisme de cette forme très active dans les cellules cibles (voir les sections 2.2 et 2.3).

Pour passer de la circulation sanguine à une forme de réserve et, inversement, être mobilisés du foie vers une distribution périphérique, les rétinoïdes sont tour à tour hydrolysés et estérifiés. Harrison (1993) a publié une revue des principales activités d'hydrolyse des esters de rétinol. Des hydrolases d'esters de rétinol (HER) ont été identifiées dans le pancréas, les poumons et les tissus oculaires, mais les activités d'hydrolyse dans le foie et les intestins sont davantage documentées.

La réaction d'hydrolyse, qui consiste à couper la longue chaîne des esters, n'est pas spécifique aux hydrolases ; *in vitro*, des lipases et des carboxylases peuvent catalyser la réaction. Des efforts ont toutefois été consentis pour identifier et caractériser l'activité de la HER et à ce jour, plusieurs hydrolases ont été répertoriées selon l'influence des sels biliaires sur leur activité. D'autres facteurs jouent un rôle dans l'identification de ces isoenzymes : la quantité et la nature du substrat, le tissu ou les fractions cellulaires utilisés, la température, le pH et même la concentration des protéines de transport, notamment la forme libre de CRBP (apo-CRBP).

Si le manque de spécificité caractérise l'hydrolyse des esters de rétinol, l'estérification, en revanche, se limite à deux enzymes pour assurer la conversion du rétinol sous forme d'esters : la LRAT et l'ARAT. Jusqu'à maintenant, l'activité ARAT a été associée au rétinol libre alors que l'activité de la LRAT se rapporte au rétinol lié à sa protéine de transport (RBP-CRBP). La plupart des études impliquant l'enzyme LRAT ont été effectuées chez le rat, au niveau du foie et des intestins (Levin *et al.*, 1987 ; Ong *et al.*, 1988 ; Herr et Ong, 1992). Les tests *in vitro* se réalisent à pH neutre ou alcalins et l'emploi d'inhibiteurs spécifiques permet de circonscrire l'activité de la LRAT, qui, contrairement à l'enzyme ARAT, n'est pas dépendante d'un donneur « acyl ».

Parce que la LRAT semble impliquée dans la régulation de la vitamine A, plusieurs recherches lui sont consacrées. Dernièrement, cette enzyme a été identifiée et caractérisée dans les microsomes hépatiques de l'omble de fontaine (Ndayibagira et Spear, 1999) et dans le sac vitellin de la caille japonaise (Boily, 2000). L'activité de la LRAT pourrait être influencée par l'hormone thyroïdienne T3 (Matsuura *et al.*, 1996) et par l'expression de l'acide rétinoïque (Matsuura et Ross, 1993 ; Shimada *et al.*, 1997 ; Ross *et al.*, 1997). Certains contaminants organochlorés peuvent avoir un impact sur les activités d'hydrolyse et d'estérification associées aux rétinoides (voir la section 2.1). Des substances endogènes peuvent également influencer le taux d'hydrolyse. Entre autres, on identifie des substrats comme le rétinol pour l'activité de la LRAT (Randolph et Ross, 1991) et l'acide rétinoïque (formes *cis* et *all trans*) pour l'activité de la HER (Ritter et Smith 1996). Enfin, un effet inhibiteur sur la HER a été associé aux vitamines E et K₁ (Napoli *et al.*, 1984 ; Napoli et Beck, 1984).

Chez les vertébrés ovipares, le vitellus des œufs constitue un autre site de stockage des rétinoides. Les oiseaux et les reptiles pondent des œufs dits « cléidoïques », c'est-à-dire des œufs dont la coquille dure isole l'embryon du monde extérieur et contient, dès la ponte, tous les éléments nécessaires à son développement. Chez les oiseaux, les œufs téloécithes sont très riches en éléments nutritifs et le jaune occupe la majeure partie de l'œuf (Needham, 1963 ; Hamilton, 1965). Dans ce jaune se trouvent le

β -carotène et les rétinoïdes déposés par la femelle. Dans l'œuf non incubé, le rétinol est la forme de rétinoïde dominante, mais avec l'incubation, il tend à diminuer, alors que dans les 10 jours précédant l'éclosion, le palmitate de rétinol augmente (Parrish *et al.*, 1951 ; Joshi *et al.*, 1973). Parce que les esters de rétinoïdes augmentent avec l'incubation, Joshi *et al.* (1973) ont émis l'hypothèse que les esters pouvaient être synthétisés dans le sac vitellin et transportés dans le foie de l'embryon pour y être emmagasinés. Il se peut également que les esters soient transportés dans l'intestin et suivent ensuite la voie de transport connue pour les mammifères : hydrolyse dans le lumen intestinal, ré-estérification du rétinol dans les entérocytes et transport vers le foie par le biais des chylomicrons. Cette dernière possibilité implique un système lymphatique performant. Or, chez les oiseaux, du moins les adultes, le système lymphatique est très peu développé (Burley et Vadehra, 1989). Et en acceptant l'idée qu'il en soit autrement pour l'embryon, l'hypothèse émise par Joshi *et al.* (1973) pourrait expliquer l'absorption et le métabolisme des rétinoïdes lors de la dernière partie du développement de l'oiseau, quand le foie est suffisamment formé pour stocker des lipides. Des études réalisées par Noble (1987) sur l'embryon de poulet ont clairement démontré que les lipides sont absorbés à un rythme soutenu, jusqu'à 0,1 g par jour, pendant la dernière semaine d'incubation. Ses recherches ont par ailleurs prouvé que les lipides étaient bel et bien estérifiés dans le sac vitellin pour être retournés dans le vitellus. Les rétinoïdes, de nature lipophile, pourraient donc suivre un patron similaire.

Ces différents éléments fournissent des renseignements importants sur l'absorption et le transport des rétinoïdes pour l'embryon d'oiseau, vers la fin de son développement. Mais le début de la vie embryonnaire, caractérisé par une grande différenciation cellulaire, nécessite un apport soutenu de rétinoïdes biologiquement actifs. Or, aucune contribution scientifique n'a été en mesure d'éclairer la manière utilisée par le jeune embryon d'oiseau pour s'approvisionner en rétinoïdes.

Une ou deux possibilités retiennent toutefois l'attention. Au début de l'embryogénèse, certaines structures sphériques du vitellus appelées granules sont utilisées pour l'obtention de certains éléments nutritifs de base. Dans le vitellus d'œuf de la poule domestique, *Gallus sp.*, on a pu identifier que les granules sont constituées, entre autres, de lipides, de lipoprotéines, de lipovitellines α et β et de lécithine. Leur structure laisse supposer un libre accès aux différents éléments qui les constituent pour une utilisation immédiate. Les caroténoïdes du vitellus peuvent être utilisés de manière similaire et constituer, pour l'embryon, une source de rétinol par la métabolisation du β -carotène. Avec l'incubation, le développement du sac vitellin s'accroît et cette structure assure le lien entre

le vitellus (source d'éléments nutritifs) et l'embryon. Fortement vascularisée sur la couche externe, la couche interne est, quant à elle, convolutionnée pour maximiser un contact avec le vitellus. Le sac vitellin assure des fonctions qui seront plus tard attribuées aux organes comme le foie, l'intestin et l'estomac, en plus d'être le lieu de synthèse de plusieurs produits impliquant la présence de nombreuses enzymes, y compris des enzymes inductibles : l'adénosine déaminase, l'aldrine époxydase, l'ECOD (éthoxycoumarine-*O*-dééthylase) et l'EROD (éthoxyrésorufine-*O*-dééthylase) (De Boeck *et al.*, 1975; Henrich-Hirsch *et al.*, 1990). Récemment, des enzymes propres au système des rétinoïdes ont été caractérisées dans le sac vitellin de la caille japonaise au sixième jour d'incubation démontrant ainsi qu'un système de régulation des rétinoïdes est présent, et ce, tôt dans le développement (Boily, 2000).

Ce type de recherche se rapportant à l'utilisation des rétinoïdes *in ovo* remplit un double mandat. D'abord, en contribuant à l'acquisition de connaissances dans un domaine encore obscur de l'embryologie. Ces informations permettent, par la suite, une meilleure interprétation des résultats obtenus lors de l'utilisation des rétinoïdes de l'œuf comme biomarqueurs.

2.2. MÉTABOLISME DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE ET FORMES APPARENTÉES

L'acide rétinoïque est formé à partir de rétinaldéhyde par des déhydrogénases d'aldéhyde ou par les isoformes du cytochrome P450, les CYP1A1 et CYP1A2 (Duester, 1996). Ces oxydations sont essentiellement irréversibles. Puisque les concentrations intracellulaires nécessaires au déclenchement des réponses biologiques sont très faibles, dans la gamme de quelques nanomolaires, on peut imaginer une régulation très précise entre la formation et le métabolisme de l'acide rétinoïque. Ceci peut impliquer la protéine de liaison CRABP, la concentration de l'acide rétinoïque et des isomérases (interconversions entre les formes all-*trans*, 9-*cis* et 13-*cis*); toutefois, nous n'avons qu'un aperçu rudimentaire de ces interactions.

Quant au métabolisme de l'acide rétinoïque, la recherche se concentre sur deux voies : l'hydroxylation/oxydation initiées par le système multifonctionnel dépendant du cytochrome P450 terminal et la conjugaison par l'UDP-glucuronyltransférase. Dans leurs publications clés, Roberts *et al.* (1979; 1980) ont révélé que les microsomes hépatiques et intestinaux de cobaye, incubés en présence de NADPH, d'oxygène et d'acide rétinoïque, formaient les acides all-*trans*-4-hydroxy- et all-*trans*-4-oxo-rétinoïque. Des inhibiteurs du cytochrome P450 empêchaient la formation de ces métabolites, tandis que les inducteurs, phénobarbital, 3-méthylcholanthrène et même le substrat, augmentaient cette activité.

Roberts *et al.* (1979) ont pu démontrer que le métabolite 4-hydroxy est le produit direct du cytochrome P450 et qu'il est ensuite transformé en acide all-*trans*-4-oxo-rétinoïque en présence de NAD ou de NADP par une réaction indépendante du cytochrome P450. Deux décennies plus tard, on sait que l'hydroxylation de l'acide all-*trans*-rétinoïque est catalysée par certaines isoformes des cytochromes P450 codés par des gènes qui se retrouvent parmi les sous-familles suivantes: *CYP1A*, *CYP2A*, *CYP2B*, *CYP2C*, *CYP2D*, *CYP2E*, *CYP2G*, *CYP3A* et *CYP26* (Leo *et al.*, 1989; Roberts *et al.*, 1992; Martini et Murray, 1993; Muindi et Young, 1993; Abu-Abed *et al.*, 1998; Nadin et Murray, 1999). De plus, l'isoforme P450RAI de la famille *CYP26* a été cloné chez le danio zébré et est le seul spécifiquement identifié chez le poisson capable de métaboliser l'acide all-*trans*-rétinoïque (White *et al.*, 1996). Ces expériences *in vitro* ont démontré que le métabolite principal est l'acide all-*trans*-4-hydroxyrétinoïque avec la formation de quantités inférieures d'autres métabolites tels que le 14-hydroxy et le 18-hydroxy.

L'hydroxylation de l'acide all-*trans*-rétinoïque et l'oxydation de l'acide all-*trans*-4-hydroxyrétinoïque par les microsomes hépatiques ont été démontrées pour la truite arc-en-ciel et l'omble de fontaine (Gilbert *et al.*, 1995; Boyer *et al.*, 2000), tandis que seule l'hydroxylation a été décelée dans le cas de l'esturgeon jaune (Doyon *et al.*, 1999). Outre les poissons, le métabolisme oxydatif de l'acide rétinoïque a été constaté chez la caille japonaise (Bilodeau 1996), le ouaouaron, *Rana catesbeiana* (K. Boucher, Université du Québec à Montréal, résultats non publiés) et plusieurs espèces de mammifères.

L'acide all-*trans*-rétinoïque incubé dans une suspension microsomale hépatique avec l'acide uridine diphosphoglucuronique est transformé en all-*trans*-rétinoylglucuronide (RAG) (Lippel et Olson, 1968). Cette réaction est catalysée par l'uridine diphosphoglucuronyltransférase (UDP-GT). Cependant, les isoformes de cette enzyme responsables de la conjugaison avec l'acide rétinoïque n'ont pas été identifiés. La formation de RAG a aussi été démontrée dans les microsomes de l'intestin et du rein chez les mammifères (Frolik, 1984) et dans les microsomes hépatiques de l'omble de fontaine (Boyer *et al.*, 2000).

2.3. INTERACTIONS AU NIVEAU DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES

L'activité biologique associée à la vitamine A se produit suite aux liaisons entre ligands et récepteurs nucléaires. Depuis l'identification des premiers récepteurs de l'acide rétinoïque (Giguère *et al.*, 1987; Petkovich *et al.*, 1987) ils ont été classés, selon leur homologie, comme membres de la superfamille des récepteurs stéroïdiens-thyroïdiens (Evans, 1988). Deux

séries de récepteurs existent : les RAR ou « récepteurs de l'acide rétinoïque » et les RXR ou « récepteurs X des rétinoïdes ». Chaque série comprend plusieurs types (α , β , γ), et chacun de ces types comprend plusieurs isoformes ; au total, on compte 14 récepteurs différents (Chambon, 1996). Les RAR lient principalement les acides all-*trans* et 9-*cis*-rétinoïque, tandis que les RXR lient d'avantage l'acide 9-*cis*-rétinoïque. Cependant, une gamme de rétinoïdes, y compris l'acide all-*trans*-4-oxo-rétinoïque et l'acide all-*trans*-3,4-déhydro-rétinoïque, démontrent la capacité de lier avec haute affinité les récepteurs et de produire les effets typiquement associés à la vitamine A (Beckett et Petkovich, 1999). Une fois liés par leurs ligands, les récepteurs RAR et RXR forment les hétérodimères RAR:RXR qui peuvent se lier à l'ADN et, plus spécifiquement, aux éléments de réponse de l'acide rétinoïque (*retinoic acid response elements* ou RARE) des gènes cibles. L'influence sur la transcription génétique peut être une activation ou une répression : la fixation du complexe ternaire (RAR-RA-RXR) sur les RARE en position 5' induit la transcription tandis que sa fixation sur les RARE en position 3' la réprime. Il faut noter que la formation des homodimères RXR:RXR est aussi possible et que les récepteurs sans ligands peuvent lier l'ADN, mais la signification de ces interactions *in vivo* n'est toutefois pas évidente.

La multiplicité d'effets biologiques, ou « effets pléotropiques », de la vitamine A (voir section 2.4) s'explique par le grand nombre de combinaisons possibles entre les ligands, les isoformes de RAR et les isoformes de RXR. La distribution des isoformes des récepteurs peut varier en fonction du tissu et du stade de développement de l'organisme, mais les RXR semblent bien conservés entre l'amphibien, le poisson, l'oiseau et le mammifère (Beckett et Petkovich, 1999). Ces chercheurs ont démontré que les fonctions mêmes des RXR sont très semblables chez le poisson et le mammifère, ce qui suggère l'importance de la signalisation des rétinoïdes au cours de l'évolution des vertébrés.

Le nombre d'isoformes des récepteurs et le nombre de ligands potentiels se distinguent des hormones connues, comme l'estrogène, qui n'a que deux récepteurs. Par contre, les interactions sont encore beaucoup plus complexes dans le cas des rétinoïdes. Les hétérodimères peuvent se former entre les RXR et autres récepteurs (p. ex., le récepteur de l'hormone thyroïdienne, TR) avec leurs ligands respectifs (p. ex. : le triiodothyronine, T_3) (Chambon, 1996). Dans plusieurs cas, tel que celui de l'hormone thyroïdienne, l'hétérodimère ainsi formé (9-*cis*-AR+RXR:TR+ T_3) peut lier l'élément de réponse de l'hormone avec une plus grande affinité que le complexe TR+ T_3 seul. Donc, le RXR peut coordonner l'expression des gènes impliqués dans la signalisation de l'acide rétinoïque et celle de

plusieurs autres facteurs (p. ex., hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes, vitamine D₃, facteur de prolifération des peroxisomes, facteur de croissance, cholestérol) (Chambon, 1996 ; Beckett et Petkovich, 1999).

Très peu de publications portent sur l'effet d'un contaminant environnemental sur les récepteurs. Harmon *et al.* (1995) ont démontré que le métabolite acide méthoprène, un produit de dégradation du pesticide méthoprène, est capable de lier et d'activer les récepteurs mammaliens RXR α , γ . Cependant, ces effets ont été produits aux concentrations relativement élevées de 10⁻⁵ à 10⁻⁴ M, tandis que l'affinité de l'acide 9-*cis*-rétinoïque est nettement plus forte pour les RXR à 10⁻⁸ M (Mangelsdorf *et al.*, 1994). Suite aux résultats de Harmon et collègues, plusieurs groupes de recherche ont proposé que les malformations chez les amphibiens pouvaient s'expliquer par un tel mécanisme. Cependant, ni une gamme de concentrations de méthoprène, ni le méthoprène irradié avec une lumière ultraviolette afin de produire l'acide méthoprène, n'ont causé des malformations chez la grenouille léopard, *Rana pipiens* (Ankley *et al.*, 1998). Des fractions d'effluents d'usines de pâtes et papiers ainsi que le 2,3,7,8-TCDD diminuent l'expression génétique induite par l'acide rétinoïque (Weston *et al.*, 1995 ; Scoff et Ankley, 2002).

2.4. ASPECTS NUTRITIONNELS DE LA VITAMINE A ET EFFETS D'UN EXCÈS EN ACIDE RÉTINOÏQUE SUR L'EMBRYON

La vitamine A est obtenue par la nourriture sous forme de rétinoïdes et de caroténoïdes. Les rétinoïdes, auxquels les effets biologiques de la vitamine A sont attribués, se retrouvent uniquement dans les aliments d'origine animale (p. ex. : foie, rein). Les caroténoïdes sont des anticancérigènes connus comme des antioxydants naturels diminuant les radicaux libres qui endommagent l'ADN (Davison *et al.*, 1993 ; Léo *et al.*, 1993). Les caroténoïdes sont présents principalement dans les végétaux, mais aussi chez certains invertébrés. Selon la voie biochimique, une molécule de β -carotène produirait une molécule de rétinaldéhyde et ensuite du rétinol (figure 5.2). Cependant, selon Sommer (1995), il faudrait environ six fois plus de β -carotène pour obtenir le même effet biologique que le rétinol parce que les caroténoïdes se transforment et s'absorbent moins bien.

Les animaux insectivores, tels que plusieurs espèces d'oiseaux, acquièrent leur vitamine A par les caroténoïdes concentrés dans l'hémolymphe et dans le tégument des insectes sous forme d'astaxanthine. Chez les poissons planctivores et insectivores, les sources de vitamine A comprennent le zooplancton et certaines larves aquatiques. Les crevettes, crabes et homards renferment de l'astaxanthine dans leurs téguments (Moore, 1957). Grangaud *et al.* (1949) ont observé, à plusieurs reprises,

des crevettes à demi digérées et complètement décolorées dans le tractus digestif des merluches (*Merluccius vulgaris*) en Méditerranée. L'utilisation de l'astanxanthine, qui est le pigment caroténoïque responsable de la coloration des crustacés, servirait probablement à la synthèse de la vitamine A chez ce poisson. Christiansen *et al.* (1994) ont démontré que l'astaxanthine est essentielle aux alevins de saumon de l'Atlantique, *Salmo salar*, au début de leur alimentation.

Lors d'un niveau trop élevé de vitamine A dans l'organisme, des mécanismes biochimiques s'activent pour retrouver un niveau normal. Il y a réduction de l'absorption de vitamine A, une augmentation de son oxydation et de son excrétion biliaire, fécale et urinaire (Olson, 1994). Par contre, comme tout système a ses limites, des carences ou des excès peuvent survenir. Chez l'animal, un déséquilibre au niveau de ces formes, est associé à plusieurs types d'anomalies.

Les symptômes d'une déficience en vitamine A sont connus depuis des milliers d'années. Déjà, quelque 1550 ans av. J.C., les Égyptiens traitaient les problèmes de cécité, associés à une carence en vitamine A, avec des compresses d'extrait de foie de bœuf broyé sur les yeux (Wolf, 1996). Malgré des connaissances de plus en plus précises sur les mécanismes biochimiques et moléculaires de la vitamine A dans l'organisme, les problèmes reliés à sa déficience sont encore très nombreux à être observés chez les humains et les animaux.

Effets d'une carence (hypovitaminose)

Les effets d'une carence en vitamine A risquent d'apparaître davantage chez les jeunes individus qui n'ont pas eu le temps d'emmagasiner des concentrations importantes de rétinoïdes ; un adulte auparavant bien approvisionné en vitamine A peut survivre longtemps en mobilisant ses réserves de rétinoïdes sans démontrer de symptômes de carence. Presque tous les organes ou tissus peuvent être affectés par une carence en rétinoïdes lors du développement de l'embryon. Le cerveau postérieur, la vue, l'ouïe, plusieurs organes ou tissus dérivant de la crête neurale, les structures crânio-faciales et pharyngiennes, la glande thyroïde et les parathyroïdes requièrent différentes concentrations de vitamine A lors d'une certaine période de l'embryogenèse (Luo *et al.*, 1996 ; Clagett-Dame et Plum, 1997 ; Maden, 1999 ; Ross *et al.*, 2000 ; Wendling *et al.*, 2000). Une augmentation de l'apoptose et une altération de la migration des cellules de la crête neurale seraient responsables des anomalies attribuées à une carence en vitamine A (Maden, 1999). On peut également noter que les carences en rétinoïdes peuvent entraîner la mortalité embryonnaire, ce qui vient masquer la manifestation de ces malformations.

Les oiseaux ont fait l'objet de recherches détaillées sur les effets d'une carence en vitamine A. Parmi les symptômes les plus importants on constate des effets au niveau de la vue, de la croissance osseuse, de la reproduction et du maintien des tissus épithéliaux (Thompson, 1976). Cet auteur a même attribué plusieurs effets d'hypovitaminose A à des manques de différenciation et de fonctions des cellules épithéliales comme la kératinisation de l'épithélium des voies respiratoires, alimentaires et urogénitales, et des glandes salivaires et lacrymales pour ne nommer que celles-là. Un apport nutritionnel inadéquat en vitamine A affecte plusieurs aspects de la reproduction chez les oiseaux, y compris des caractéristiques secondaires sexuelles, le poids des testicules, la spermatogenèse, la ponte des œufs, la taille des œufs, la survie des embryons, le temps d'incubation et l'éclosion. Un supplément d'acide rétinoïque peut contrer les effets de carence, en général, et même les effets de la dégénérescence testiculaire observée chez des oiseaux déficients en vitamine A (Thompson, 1976). Quelques études par Zile et ses collaborateurs portent sur les effets d'une carence alimentaire en vitamine A sur le développement cardiovasculaire des cailles japonaises, *Coturnix coturnix japonica*, lors de l'embryogenèse. Dans 75 % des cas, une carence cause une asymétrie cardiaque. De plus, il est proposé que c'est la forme biologiquement active, all-*trans* acide rétinoïque, qui intervient directement dans le développement cardiovasculaire lors des premières 22 à 28 heures de l'embryogenèse des oiseaux (Dersch et Zile, 1993 ; Zile *et al.*, 1998).

Peu d'études portent sur le rôle de la vitamine A chez les téléostéens. Selon Taveekijakarn *et al.* (1994), une carence en vitamine A dans la diète du *cherry salmon*, *Oncorhynchus masou*, a démontré une diminution de la croissance, une dépigmentation cutanée, un museau tronqué, des hémorragies au niveau des nageoires et une anémie sévère. Les observations microscopiques ont révélé différentes altérations telles que la dégénération du tissu squelettique et des fibres musculaires cardiaques, l'atrophie et la nécrose du parenchyme hépatique. Ces effets ont diminué ou disparu suite à l'administration d'une diète complète. De jeunes alevins qui ont été nourris avec un régime déficient en vitamine A dès le tout début de leur alimentation ont démontré une croissance ralentie, des débuts d'œdèmes et des lésions cornéennes avec dégénération de la rétine. Toutefois, ces observations n'ont pas été notées chez ceux plus âgés nourris avec la même diète déficiente mais qui avaient préalablement bénéficié d'une nourriture équilibrée (Poston *et al.*, 1977).

Chez les mammifères, Underwood (1984) a identifié comme symptômes les plus importants la susceptibilité à l'infection, la perte d'appétit, l'élévation de la pression du fluide cérébro-rachidien et la diminution du taux de croissance. Les effets sur la reproduction des mammifères

comprennent l'inhibition de la spermatogenèse, l'incapacité à maintenir l'implantation, résultant en avortements ou fausses couches, la résorption du fœtus et la kératinisation vaginale accompagnée d'une susceptibilité accrue à l'infection. Une carence aiguë en vitamine A est associée à l'inhibition du cycle œstral. Chez les mammifères, un supplément d'acide rétinoïque peut rétablir plusieurs symptômes causés par une carence en vitamine A, à l'exception de la vue et de la reproduction.

Effets d'un excès (hypervitaminose)

Les excès de vitamine A causent des symptômes caractérisés, en général, par la fragilité des os, des lésions cutanées, des malformations, une perte de poids et l'inhibition de la croissance (Thompson, 1976 ; Kamm *et al.*, 1984).

Chez des juvéniles de truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, les signes de toxicité dus à une hypervitaminose A se manifestent par une diminution de croissance, une augmentation de la mortalité, la nécrose des nageoires ainsi qu'un foie d'une couleur jaunâtre. Suite à une diète enrichie en vitamine A, celle-ci augmente dans le foie en même temps qu'on y observe une diminution de la concentration de fer (Hilton, 1983).

Effets d'un excès en acide rétinoïque sur l'embryon

Au cours du développement, le système de signalisation de l'acide rétinoïque déclenche la transcription génétique des gènes *Hox* responsables du patron axial et de la polarité antéro-postérieure des membres chez les vertébrés (Hofmann et Eichele, 1994 ; Tabin, 1995 ; Lu *et al.*, 1999 ; Stratford *et al.*, 1999 ; Ross *et al.*, 2000). Par exemple, au niveau du bourgeon des membres, un gradient d'acide rétinoïque assure le patron des doigts. Un excès en acide rétinoïque provoque l'absence, la duplication ou l'orientation anormale des phalanges (Eichele *et al.*, 1985 ; Sundin et Eichele, 1992). Le développement du patron morphologique du cerveau est aussi sous régulation du système de signalisation de l'acide rétinoïque, et les concentrations légèrement en excès causent des malformations crânio-faciales. Ces effets sont produits chez les mammifères, les oiseaux, les amphibiens et les poissons (Morris-Kay *et al.*, 1991 ; Sive *et al.*, 1990 ; Hill *et al.*, 1995 ; Tabin, 1995 ; Alexandre *et al.*, 1996 ; Zhang *et al.*, 1996 ; Vandersea *et al.*, 1998).

Le parallèle entre les symptômes de carence ou d'excès en vitamine A et les effets constatés dans les populations fauniques contaminées par les substances toxiques mérite une considération particulière. Un affaiblissement du système immunitaire a été associé à la mortalité accrue dans plusieurs populations de mammifères marins qui ont subi de fortes expositions aux substances toxiques. De plus, la diminution du taux de

reproduction, les malformations, la fréquence des cancers et des lésions dermiques peuvent être associées aux déséquilibres en rétinoïdes chez les mammifères marins (voir la section 3.2). Dans le cas des oiseaux, les effets sur la reproduction, la mortalité des embryons et les malformations crânio-faciales (p. ex., le bec-croisé) sont les effets majeurs constatés également lors d'une carence (voir les sections 3 et 4.1). Chez les poissons et les amphibiens, les problèmes de reproduction et les malformations (surtout l'absence ou la multiplication des nageoires et des pattes, ainsi que les malformations crânio-faciales chez les poissons) sont semblables aux effets caractéristiques du système de signalisation des rétinoïdes (voir les sections 3 et 4.2).

3. DÉSÉQUILIBRES DES RÉTINOÏDES

3.1. DÉSÉQUILIBRE DES FORMES DE STOCKAGE

La capacité d'accumuler des rétinoïdes est une fonction commune de tous les vertébrés étudiés à ce jour et les formes de rétinoïdes stockés sont relativement constantes entre différents groupes taxonomiques. Les formes « déhydro » (p. ex., 3,4-didéhydro-rétinol, souvent nommé déhydrorétinol dans la littérature) sont fréquentes dans les organismes habitant les écosystèmes aquatiques; cependant les différences interspécifiques sont énormes. Par exemple, le foie de la barbotte brune, *Ameiurus nebulosus*, contient presque la totalité de sa vitamine A en formes déhydro, tandis que chez le meunier noir, *Catostomus commersoni*, et le meunier rouge, *Catostomus catostomus*, les formes non déhydro prédominent. Longtemps ignorés, peut-être à cause de leur faible représentation chez les mammifères, les formes déhydro ont dernièrement été reconnues comme précurseurs des ligands capables de lier à haute affinité les récepteurs nucléaires de l'embryon avien et mammalien (Repa *et al.*, 1996).

Typiquement, aux stades du développement les plus rudimentaires, les sources externes telles que le vitellus chez les amphibiens, reptiles, poissons et oiseaux, ou le sang maternel chez les mammifères fournissent les rétinoïdes. Par exemple, chez certaines espèces de poissons et d'oiseaux, peu de temps suivant l'éclosion, une masse importante de vitellus passe du côté de l'embryon et les jeunes profitent ainsi de réserves accumulées par la génération précédente. Les études chez les mammifères et les poissons suggèrent que l'accumulation de rétinoïdes a tendance à continuer pendant toute la vie d'un organisme en santé et, par conséquent, les concentrations augmentent en fonction de son âge. De nombreuses publications portent sur les effets de contaminants environnementaux sur le stockage des rétinoïdes dans les organes et une compilation de ces études est présentée au tableau 5.1.

Tableau 5.1

Effets des contaminants sur le stockage de rétinoïdes majeurs au niveau du foie

Espèce	Xénobiotique	Effet sur les rétinoïdes stockés dans le foie	Références
Oiseaux :			
Pigeon domestique	DDT	↓	Jeffries et French, 1971
Caille japonaise	DDT	↓	Cecil <i>et al.</i> , 1973
Caille japonaise	BPC	↓	Cecil <i>et al.</i> , 1973
Goéland argenté	Environnement contaminé - dioxine, BPC, OC	↓	Spear <i>et al.</i> , 1986
Tourterelle à collier	3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle	↓	Spear <i>et al.</i> , 1986 ; 1989
Eider à duvet	3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle	↓	Murk <i>et al.</i> , 1994b
Grand cormoran	Environnement contaminé-dioxine, furanne, BPC	Sans effet	van den Berg <i>et al.</i> , 1994
Hirondelle bicoloré	Environnement contaminé - BPC, OC	↓	Bishop <i>et al.</i> , 1999
Goéland bourgmestre	Environnement contaminé - OC	Sans corrélation	Henriksen <i>et al.</i> , 2000
Poissons :			
Notopterus	HgCl	↑	Verma et Tonk, 1983
Touladi	3,3',4,4',5-pentachlorobiphényle	↓	Palace et Brown, 1994
Truite arc-en-ciel	3,3',4,4',5-pentachlorobiphényle	↓	Brown <i>et al.</i> , 2002
Omble de fontaine	3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle	↓	Ndayibagira <i>et al.</i> , 1995
Omble de fontaine	3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle	↓	Boyer <i>et al.</i> , 2000
Truite arc-en-ciel	3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle	Sans effet	Gilbert <i>et al.</i> , 1995
Ombre arctique	3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle	Sans effet	Palace <i>et al.</i> , 2001
Flet commun	BPC	Sans effet	Besselink <i>et al.</i> , 1996
Flet commun	Sédiments contaminés - BPC, HAP	↓	Besselink <i>et al.</i> , 1998
Esturgeon jaune	Furanne	Sans effet	Palace <i>et al.</i> , 1996

Tableau 5.1 (suite)

Effets des contaminants sur le stockage de rétinoïdes majeurs au niveau du foie

Espèce	Xénobiotique	Effet sur rétinoïdes stockés dans le foie	Références
Truite arc-en-ciel	Furanne	↓	Brown <i>et al.</i> , 1998
Meunier noir	Environnement contaminé – BPC	↓	Branchaud <i>et al.</i> , 1995
Esturgeon jaune	Environnement contaminé – BPC	↓	Doyon <i>et al.</i> , 1998
Touladi	Environnement contaminé	↓ ↑	Palace <i>et al.</i> , 1998a
Touladi	Environnement contaminé – Fe	↓	Payne <i>et al.</i> , 1998
Barbotte brune	Environnement contaminé – HAP	↓	Arcand-Hoy et Metcalf, 1999
Choque-mort	Environnement contaminé – BPC	↓	Nacci <i>et al.</i> , 2001
Amphibiens :			
Grenouille tigrée	DDT	↓	Keshavan et Desmukh, 1984
Grenouille tigrée	Carbaryl	↓	Keshavan et Desmukh, 1984
Mammifères :			
Rat, lapin	1,2-dibenzanthracène	↓	Goerner et Goerner, 1939a,b
Rat	1,2-dibenzanthracène	↓	Bauman <i>et al.</i> , 1941
Rat	3-méthylcholanthrène	↓	Bauman <i>et al.</i> , 1941
Rat	Benzo(a)pyrène	↓	Bauman <i>et al.</i> , 1941
Rat	DDT	↓	Phillips, 1963
Rat	BPC	↓	Bitman <i>et al.</i> , 1972
Rat	Dioxine	↓	Thunberg <i>et al.</i> , 1979
Vison d'Amérique	BPC	↓	Hakansson <i>et al.</i> , 1992 ; Kakela <i>et al.</i> , 1999
Vison d'Amérique	Cu	Sans effet	Kakela <i>et al.</i> , 1999
Loutre d'Europe	BPC	Relation négative	Murk <i>et al.</i> , 1998
Rat	Poissons contaminés – BPC, dioxine, furanne	↓	Iverson <i>et al.</i> , 1998

3.1.1. Stockage au niveau du foie et certains organes

Oiseaux

Chez les oiseaux, les expériences de laboratoire ont démontré une diminution typique des rétinoïdes hépatiques suite à des expositions aux organochlorés. Par exemple, Jeffries et French (1971) ont observé qu'une exposition au DDT avait causé une diminution des niveaux de la vitamine A dans le foie du pigeon domestique, *Columba livia*. Par ailleurs, des expositions au DDT ou l'Aroclor 1242 (un mélange de BPC) durant deux mois, ont entraîné une diminution de la concentration de vitamine A dans le foie de la caille japonaise (Cecil *et al.*, 1973). Dans la même optique, deux injections d'un BPC coplanaire, le 3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle, ont diminué les concentrations de rétinol dans le foie de la tourterelle à collier, *Streptopelia risoria*, deux mois après la première injection, alors que le palmitate de rétinol n'était pas affecté (Spear *et al.*, 1986 ; 1989). Le même congénère de BPC injecté aux oisillons d'eiders à duvet, *Somateria mollissima*, a provoqué une baisse de palmitate de rétinol hépatique dix jours suivant l'injection, sans toutefois affecter le niveau de rétinol et de stéarate de rétinol (Murk *et al.*, 1994b). Quand les oisillons d'eider à duvet ont reçu une injection de Clophen A50, un mélange de BPC, dans le cadre de cette dernière expérience sur les oisillons d'eiders à duvet, le stockage de rétinoïdes hépatiques n'a pas été affecté. Cette expérience, qui n'a duré que dix jours, était peut-être trop courte pour une évaluation des effets possibles sur le stockage de rétinoïdes.

Une autre étude effectuée sur des oisillons avec des BPC a donné des résultats similaires. Des oisillons d'hirondelle bicolore, *Tachycineta bicolor*, ont été prélevés à l'âge de 16 jours sur 7 sites des Grands Lacs et du fleuve Saint-Laurent. Parmi ces sites, deux près de Cornwall sur le fleuve, où les plus fortes concentrations en BPC ont été détectées dans les œufs, ont obtenu les plus faibles taux de rétinol et de palmitate de rétinol hépatiques. Ces chercheurs ont également démontré que les faibles concentrations en rétinoïdes n'étaient pas reliées à l'alimentation, puisque les niveaux de rétinol et de α -carotène dans les insectes consommés par les oisillons étaient les plus élevés à ces sites (Bishop *et al.*, 1999).

Des œufs de grand cormoran, *Phalacrocorax carbo*, provenant de deux sites aux Pays-Bas, ont été examinés afin d'évaluer les concentrations en rétinoïdes stockés au moment de l'éclosion. Aucune différence significative entre les sites n'a été observée pour les concentrations de rétinol ou de palmitate de rétinol hépatique. Les résultats de ces observations sont cohérents puisque les concentrations en substances toxiques (BPC, dioxines, furannes) et l'activité EROD n'étaient pas différentes entre les deux colonies (van den Berg *et al.*, 1994). Une autre étude, cette fois en

Norvège, n'a démontré aucune relation entre les concentrations d'organo-chlorés hépatiques des individus, le rétinol et le palmitate de rétinol qui ont été quantifiés dans les foies de 31 goélands bourgmestres, *Larus hyperboreus*, échantillonnés sur un seul site (Henriksen *et al.*, 2000).

Poissons

Des effets ont été démontrés au niveau des rétinoïdes hépatiques chez différentes espèces de poissons vivant dans des sites contaminés ou exposés en laboratoire. Verma et Tonk (1983) ont observé une hausse de la concentration en vitamine A hépatique accompagnée d'une diminution dans les ovaires et les muscles du téléostéen d'eau douce de l'ordre des Clupéiformes, *Notopterus notopterus*, exposé au chlorure de mercure pendant quatre jours. Une diminution de la vitamine A dans le tissu musculaire a aussi été constatée chez un téléostéen d'eau douce de la famille des Ictaluridae, *Heteropneustes fossilis*, suite à une exposition de 30 jours au chlorure de mercure (Gupta et Shastry, 1981).

Les résultats obtenus suite à l'exposition aux différents congénères de BPC chez les poissons semblent relativement constants. Huit semaines après une seule exposition de 3,3',4,4',5-pentachlorobiphényle chez le touladi, *Salvelinus namaycush*, des chutes de rétinol, de déhydro-rétinol et de palmitate de rétinol hépatique ont été constatées (Palace et Brown, 1994). Des ombles de fontaine ayant reçu une seule injection d'un congénère coplanaire, le 3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle, ont vu leur taux de croissance affecté et leurs teneurs en palmitate de rétinol et en palmitate de déhydro-rétinol diminuer dans l'intestin, huit semaines après l'injection (Ndayibagira *et al.*, 1995). Lors de cette même expérience, la concentration du palmitate de déhydro-rétinol hépatique a significativement diminué dans le groupe exposé au BPC coplanaire (Ndayibagira *et al.*, 1995 ; Boyer *et al.*, 2000). Par contre, avec le même protocole expérimental, les concentrations en rétinoïdes hépatiques de la truite arc-en-ciel n'ont pas été affectées (Gilbert *et al.*, 1995). Cette observation peut s'expliquer par une différence de sensibilité propre aux espèces étudiées. Chez l'omble arctique, *Thymallus arcticus*, exposé au 3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle, les concentrations de rétinoïdes hépatiques n'étaient pas affectées (Palace *et al.*, 2001).

Une étude sur un poisson marin, le flet commun, *Platichthys flesus*, a démontré que les rétinoïdes stockés ne sont pas affectés 2 et 10 jours après l'injection de différentes doses d'un mélange de BPC (Besselink *et al.*, 1996). Ces auteurs ont également remarqué que l'activité d'EROD, même significativement élevée en fonction des doses de BPC, était relativement faible comparativement à d'autres espèces de poissons. Il est possible que la courte durée de cette expérience ne permette pas de dépister des effets sur le stockage des rétinoïdes. Lors d'une autre expérience avec le flet

commun exposé pendant trois ans aux sédiments contaminés provenant du port de Rotterdam, aux Pays-Bas, une diminution de la concentration de rétinol hépatique ainsi qu'une hausse de l'activité d'EROD et des protéines CYP1A hépatiques ont été observées comparativement à un groupe témoin (Besselink *et al.*, 1998). Lors de cette même étude, toujours avec le flet commun, mais cette fois-ci exposé au lixiviat des sédiments contaminés (mais pas aux sédiments), les effets sur la vitamine A étaient plus marqués : le rétinol et le palmitate de rétinol étaient en plus faibles concentrations. Cependant, ni l'EROD, ni la concentration de protéines CYP1A n'ont été changées par une exposition au lixiviat.

Des composés de furannes ont été testés sur deux espèces de poissons, des juvéniles d'esturgeon jaune et des mâles de la truite arc-en-ciel. Aucun effet sur les rétinoïdes hépatiques n'a été remarqué pour les esturgeons 27 jours après avoir été exposés *per os* au 2,3,7,8-tétrachlorodibenzofurane (Palace *et al.*, 1996). Par contre, l'activité de l'EROD avait doublé dans le groupe d'esturgeons exposés. Des effets sur les rétinoïdes stockés ont été constatés seulement chez les truites ayant reçu une injection de 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofurane (Brown *et al.*, 1998). De façon plus spécifique, les concentrations hépatiques de rétinol, de déhydroretinol et de palmitate de rétinol étaient plus faibles chez les truites mâles 10 mois et demi après l'injection au furanne. On a également remarqué une forte induction d'EROD.

Plusieurs recherches sur le terrain ont été effectuées sur des sites contaminés avec différents polluants et les résultats sont très similaires à ceux obtenus en laboratoire. Des meuniers noirs ont été échantillonnés sur un site contaminé à proximité de Montréal et sur un site témoin situé dans la région d'Abitibi (Branchaud *et al.*, 1995). Les poissons provenant du site près de Montréal avaient des concentrations hépatiques nettement plus faibles en rétinol et en palmitate de rétinol comparativement aux poissons témoins. Le stockage de rétinoïdes par les poissons du site de référence augmentait significativement avec l'âge, ce qui n'était pas le cas des poissons capturés près de Montréal. De plus, une fréquence plus élevée de la mortalité des embryons et de la tératogenèse ainsi qu'une plus grande induction d'EROD ont été observées chez les poissons échantillonnés près de Montréal. Lors de cette même étude, il a été noté que le taux de malformations parmi les larves était positivement corrélé avec l'activité de l'EROD chez les mères (Branchaud *et al.*, 1995). Ces résultats sont comparables avec ceux obtenus pour la tératogenèse, l'activité de l'EROD et les rétinoïdes relatés pour l'esturgeon jaune (section 4.2).

Palace *et al.* (1998a) ont observé, lors d'une étude avec le touladi échantillonné au lac Supérieur (moins contaminé) et au lac Ontario (le plus contaminé des Grands Lacs), de plus fortes concentrations en

déhydrorétinol hépatique chez les touladis adultes du lac Ontario. Toutefois, de plus faibles concentrations de rétinol et de palmitate de rétinol ont aussi été obtenues. Ces résultats ne démontrent pas une association entre la contamination chimique et le stockage de rétinoïdes hépatiques. Cependant, les analyses du rein ont démontré que les touladis du lac Ontario avaient de plus fortes concentrations en rétinol, en déhydrorétinol et en palmitate de déhydrorétinol comparativement aux poissons du lac Supérieur. Ces auteurs ont aussi observé une hausse du palmitate de rétinol rénal lors d'une expérience en laboratoire (Palace et Brown, 1994) et ils en ont déduit que la contamination augmente la résorption rénale du rétinol (Palace *et al.*, 1998a). Toujours chez les touladis, on a enregistré des concentrations hépatiques de rétinol et de palmitate de rétinol nettement inférieures pour des femelles adultes capturées dans un site contaminé par les effluents d'une mine de fer à Terre-Neuve-et-Labrador par rapport à des femelles provenant d'un site de référence. Un lien a été établi entre les concentrations de rétinoïdes hépatiques et une hausse d'effets associés au stress oxydatif sur l'ADN (Payne *et al.*, 1998).

Une autre étude, réalisée cette fois sur les Grands Lacs et avec la barbotte brune, a démontré des concentrations de déhydrorétinol et de palmitate de rétinol hépatiques significativement plus faibles pour les poissons associés à deux sites contaminés par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) comparés aux sites de référence (Arcand-Hoy et Metcalfe, 1999). De plus, la diminution des rétinoïdes à ces sites était corrélée avec la présence de lésions hépatiques, une hausse de l'activité de l'EROD, des augmentations de la fluorescence biliaire (indicateur de composés semblables aux HAP) et l'apparition de lésions dermiques.

Dans le port de New Bedford au Maine, une région située sur la côte atlantique, des femelles choque-morts, *Fundulus heteroclitus*, ont été capturées sur deux sites contaminés par les BPC et sur un site de référence. Les concentrations en palmitate de rétinol hépatiques étaient plus élevées au printemps (avant la période de reproduction) qu'en automne (après la période de reproduction) et ce, pour les trois sites (Nacci *et al.*, 2001). Cependant, lors de l'échantillonnage printanier, le palmitate de rétinol était détecté en concentrations plus faibles aux sites contaminés comparativement au site de référence. Cette observation était toutefois moins évidente en automne puisqu'un seul site contaminé était différent du site de référence.

Amphibiens

Des adultes de grenouille tigrée, *Rana tigrina*, placés dans l'eau contenant du DDT ou du Sevin (carbaryl) ont subi une baisse de la concentration en vitamine A au niveau du foie après 4 jours d'exposition (Keshavan et Desmukh, 1984).

Mammifères

Comparativement aux autres groupes d'animaux, une littérature prolifique porte sur les effets de substances toxiques chez les mammifères. Nous nous limiterons ici à quelques exemples afin de prioriser les études pertinentes se rattachant aux espèces fauniques.

Il y a soixante ans, les recherches effectuées en laboratoire avec les rats ont révélé que le 1,2-dibenzanthracène, le 3-méthylcholanthrène et le benzo(a)pyrène causaient une baisse de la concentration de vitamine A dans le foie (Goerner et Goerner, 1939a, 1939b ; Bauman *et al.*, 1941). Lors de l'époque de la grande production industrielle des organochlorés, on note l'apparition des premiers articles démontrant que les contaminants environnementaux persistants comme les DDT, BPC et TCDD provoquent le même genre d'effet sur le stockage de rétinoides chez les mammifères (Phillips, 1963 ; Bitman *et al.*, 1972 ; Thunberg *et al.*, 1979).

Certaines expériences supportent l'hypothèse que l'action des substances toxiques implique une situation physiologique semblable à une carence en vitamine A. Dans le cas des animaux exposés au dibenzanthracène, au phénobarbital, à un mélange de BPC ou à un biphenyle halogéné coplanaire et soumis à des régimes alimentaires à faible teneur en vitamine A, des symptômes de carence en vitamine A sont apparus (Bauman *et al.*, 1941 ; Backes *et al.*, 1979 ; Darjono *et al.*, 1983). Cependant, des animaux ayant gardé le même régime alimentaire mais non exposés aux contaminants n'étaient pas symptomatiques. Une autre expérience effectuée dans cette optique porte sur la non-apparition des symptômes chez les rats exposés à un mélange de BPC causée par un supplément alimentaire de vitamine A (Innami *et al.*, 1974). Ces expériences démontrent donc une association entre la diminution des stocks de rétinoides par des contaminants et les symptômes de carence en vitamine A. Une des différences importantes entre les cas d'intoxication et ceux de carence nutritionnelle réside dans l'épuisement des réserves hépatiques. Typique d'une carence nutritionnelle, l'épuisement est rarement observé lorsque l'organisme est affecté par des substances toxiques. Ce constat amène l'idée que l'intoxication est plutôt associée aux dérangements métaboliques ou fonctionnels de la vitamine A et, de cette façon, l'intoxication se distingue d'une simple carence.

Une diminution importante des stocks de rétinoides hépatiques a été signalée chez les visons d'Amérique femelles adultes, *Mustela vison*, exposés par le biais de la nourriture à un mélange commercial de BPC, le Clophen A50 (Hakansson *et al.*, 1992). Un mélange de BPC non-*ortho* dans des proportions égales à celles du mélange commercial a eu le même effet, tandis que d'autres mélanges de congénères BPC spécifiques n'ont pas affecté le stockage de rétinoides totaux (Hakansson *et al.*, 1992). Une autre

expérience chez le vison d'Amérique exposé aux BPC a démontré une diminution des déhydroréтиноïdes au niveau du foie. Cependant, les réтиноïdes n'ont pas été affectés (Kakela *et al.*, 1999). Quand les visons femelles ont subi une exposition au cuivre ou au cuivre + BPC, aucun effet sur le stockage de réтиноïdes n'a été constaté (Kakela *et al.*, 1999).

Chez les carcasses de loutres d'Europe, *Lutra lutra*, retrouvées au Danemark et en Europe centrale, Murk *et al.* (1998) ont démontré des relations négatives entre les TCDD-EQ à base de BPC analysés dans le foie et les concentrations de rétinol et de palmitate de rétinol.

Lors d'une expérience impliquant plusieurs générations, plusieurs groupes de rats ont été nourris de régimes équilibrés (y compris l'apport vitaminique) et préparés à base de saumon chinook, *Oncorhynchus tshawytscha*, provenant des Grands Lacs et contaminés par les BPC, dioxines et furannes. Seul le palmitate de rétinol a été analysé au niveau du foie. Dans le cas du régime contenant 20 % du saumon du lac Ontario, le niveau d'exposition était le plus fort en TCDD-EQ et le palmitate de rétinol hépatique a subi une diminution chez les rats adultes F₀, chez les rats F₁ au sevrage et chez les F₁ femelles adultes (Iverson *et al.*, 1998).

3.1.2. Corrélations entre enzymes et réтиноïdes hépatiques stockés

Les expériences sur les oiseaux dévoilent une tendance, autant sur le terrain que dans le laboratoire, quant à une baisse des réтиноïdes stockés au niveau du foie et l'induction des enzymes de la famille CYP1A. Chez la tourterelle à collier ayant reçu une injection de BPC coplanaire, le rétinol hépatique a diminué avec l'augmentation de l'activité d'hydroxylase d'hydrocarbures arylés (AHH) (Spear *et al.*, 1986). Dans le cas des goélands argentés du lac Ontario, une corrélation négative entre le rétinol hépatique et l'AHH a été démontrée (Spear *et al.*, 1992). Des oisillons d'hirondelle bicoloré ont été échantillonnés à l'âge de 16 jours à sept sites sur les Grands Lacs et le fleuve Saint-Laurent – le rétinol hépatique était négativement corrélé avec l'activité de l'EROD (Bishop *et al.*, 1999). Lors d'une étude sur les goélands bourgmestres en Norvège, aucune relation n'a été identifiée entre les enzymes CYP1A et le stockage de réтиноïdes hépatiques (Henriksen *et al.*, 2000).

Chez les poissons, trois articles mentionnent un rapport entre réтиноïdes et enzymes CYP1A. Dans le cas du flet commun exposé aux sédiments contaminés, la diminution de rétinol hépatique était associée à une hausse de la concentration protéique en CYP1A, mais pas à l'activité enzymatique de l'EROD (Besselink *et al.*, 1998). Pour la barbotte brune, échantillonnée à cinq sites sur les Grand Lacs, une corrélation négative hautement significative a été signalée entre l'activité de l'EROD et la concentration de palmitate de rétinol hépatique (Arcand-Hoy et Metcalfe,

1999). Chez des ombles arctiques femelles exposées au 3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle, le rétinol hépatique était positivement corrélé avec l'activité de l'EROD (Palace *et al.*, 2001).

Lorsque des rats ont reçu une injection de différents congénères de BPC, la diminution de la vitamine A totale (rétinol + palmitate de rétinol) au niveau des microsomes hépatiques a été négativement corrélée avec les activités de l'AHH et de l'UDP-GT (Narbonne *et al.*, 1990).

À l'origine, ce type de relation a été perçu comme une preuve que les contaminants environnementaux peuvent diminuer les rétinoïdes hépatiques, peut-être par le métabolisme des rétinoïdes associé aux enzymes CYP1A (Spear *et al.*, 1986). Entre-temps, les recherches ont bien démontré que les substances toxiques peuvent intervenir à plusieurs étapes de la voie métabolique des rétinoïdes, y compris par la modification des activités de plusieurs cytochromes P450.

3.1.3. Réserve au niveau des œufs

Oiseaux (voir aussi la section 4.1)

Lorsqu'on a injecté à des tourterelles à collier adultes du 3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle, on a remarqué des retards dans la ponte des œufs et une mortalité embryonnaire avoisinant les 43 % entre le 4^e et le 7^e jours d'incubation (Spear *et al.*, 1989). Au niveau du vitellus, les concentrations de rétinol et de palmitate de rétinol n'ont pas changé dans les œufs produits par les femelles témoins au cours de cette « fenêtre » de mortalité. Dans le groupe exposé, par contre, le rétinol et le palmitate de rétinol ont diminué entre les jours trois et huit d'incubation (Spear *et al.*, 1989).

Lorsque les œufs de grand héron ou de goéland argenté ont été prélevés dans le système des Grands Lacs et fleuve Saint-Laurent, les concentrations des rétinoïdes du vitellus ont été corrélées avec les teneurs en substances toxiques dans les tissus (Spear *et al.*, 1990 ; Boily *et al.*, 1994). Dans le cas des grands hérons, le palmitate de rétinol était corrélé négativement avec les teneurs en mono-*ortho*-tétrachlorobiphényles et avec deux congénères mono-*ortho*-pentachlorobiphényles ou leur TCDD-EQ. Chez les goélands argentés, le ratio molaire rétinol : palmitate de rétinol dans le vitellus était positivement corrélé avec la TCDD-EQ à base des dioxines et furannes analysés dans les œufs, avec les concentrations en 2,3,7,8-TCDD et avec la sommation des différents congénères de dioxines et furannes.

Dans le cadre d'une expérience sur neuf colonies de sternes pierregarins, *Sterna hirundo*, en Europe, les concentrations de déhydrorétinoïdes dans le sac vitellin à l'éclosion étaient nettement moindres dans les colonies à contamination forte ou moyenne au mono-*ortho*-BPC que dans la colonie dont le degré de contamination était le plus faible (Musk

et al., 1996). De plus, la teneur en palmitate de rétinol dans le vitellus des œufs échantillonnés pendant la période d'incubation était nettement plus élevée dans la colonie à plus faible contamination comparativement aux autres colonies.

Dans une expérience menée par Zile *et al.* (1997), on a nourri des poules domestiques pendant sept semaines au moyen d'un régime contenant de la carpe, *Cyprinus carpio*, provenant d'un site hautement contaminé des Grands Lacs. Un autre groupe de poules, servant de groupe de référence, a reçu un régime préparé à partir des poissons non contaminés. Les concentrations et la quantité totale en rétinol (déhydro-rétinol + rétinol) étaient significativement plus faibles dans les œufs pondus par les poules contaminées. La quantité totale de palmitate de rétinol était plus grande dans les œufs du groupe exposé, ce qui correspondait à une diminution du ratio molaire rétinol : palmitate de rétinol.

Des résultats différents caractérisent une autre étude effectuée avec deux groupes de cailles japonaises ; dans un groupe, les femelles ont reçu des injections d'un BPC coplanaire (dissous dans l'huile de maïs) pendant six semaines, alors que d'autres femelles composant un groupe témoin n'ont reçu que des injections d'huile de maïs (Boily, 2000 ; Boily *et al.*, 2003a). Chez les femelles traitées avec le BPC, les concentrations de rétinol dans le vitellus ont augmenté de façon significative dans les œufs pondus, aux 5^e et 6^e semaines de traitement. Cependant, après six jours d'incubation, l'effet sur le rétinol était négligeable, mais les concentrations de palmitate de rétinol ont augmenté de façon très significative à partir de la 3^e semaine de traitement. Dans cette étude, les rétinoïdes ont été analysés dans les trois plus gros jaunes des ovaires et à ce moment-là, l'effet du BPC a semblé se manifester sur le rétinol, car les concentrations étaient plus élevées chez les femelles exposées au BPC que chez les femelles du groupe de référence.

Poissons

Un taux élevé de mortalité a été enregistré au moment où des larves de touladi du lac Ontario ont commencé à nager dans la colonne d'eau (*swim-up stage*) (Mac et Gilbertson, 1990). Ce stade larvaire coïncide avec la résorption du sac vitellin et un transfert important des BPC contenus dans le vitellus. Afin d'examiner l'implication du stress oxydatif et des vitamines antioxydantes dans ce phénomène, Palace *et al.* (1998b) ont pêché le touladi d'un lac de référence et du lac Ontario. Les œufs ont été prélevés des femelles et les embryons ont été élevés de manière à identifier les deux groupes : (i) les génitrices dont les œufs sont associés à un taux élevé de mortalité au stade larvaire et (ii) les génitrices produisant des œufs ayant peu de mortalité une fois développés au stade larvaire. La concen-

tration totale des caroténoïdes était plus élevée dans les œufs du site de référence que dans ceux des deux groupes du lac Ontario et cette tendance (non statistiquement significative) s'est maintenue jusqu'à l'éclosion (Palace *et al.*, 1998b). Cependant, on n'a constaté aucune différence entre les groupes pour la concentration du déhydrorétinol dans les œufs, les embryons ou les larves. Chez les femelles génitrices, on n'a trouvé aucun lien entre les rétinoïdes hépatiques et la mortalité larvaire.

Des choque-morts provenant de sites contaminés aux BPC du port de New Bedford, Maine, ont été comparés à un site de référence. Les concentrations en rétinaldéhyde étaient plus faibles dans les œufs provenant des sites contaminés (Nacci *et al.*, 2001). Une corrélation positive a aussi été constatée entre le rétinaldéhyde des œufs et le palmitate de rétinol hépatique. Par ailleurs, ces chercheurs ont proposé que la population de choque-morts du port de New Bedford se serait adaptée aux BPC au point de démontrer une grande résistance quant aux concentrations de BPC normalement létales aux premiers stades de développement (Nacci *et al.*, 1999). La reproduction et la survie des embryons ne semblaient pas menacées par la contamination aux BPC dans le port de New Bedford (Nacci *et al.*, 1999).

Amphibiens

Des adultes femelles de deux espèces d'anoures ont été exposées par gavage à un mélange de BPC, le Clophen A50, et les rétinoïdes ont été analysés dans les embryons entiers provenant de ces femelles (Gutleb *et al.*, 1999). Aucun effet sur les rétinoïdes n'a été constaté dans le cas de la grenouille africaine, *Xenopus laevis*, mais pour les embryons de la grenouille rousse, *Rana temporaria*, on a observé des hausses de la teneur en rétinol et en palmitate de rétinol dans le groupe exposé (Gutleb *et al.*, 1999).

3.1.4. Effet des contaminants sur la HER, la LRAT, et l'ARAT

Étant donné qu'on a constaté un déséquilibre des rétinoïdes chez des organismes vivant dans des sites contaminés, il est tout à fait plausible que des contaminants puissent affecter les activités des enzymes HER, LRAT et ARAT et ainsi provoquer des changements dans les concentrations de rétinoïdes.

Des contaminants de type organochloré ont été testés en laboratoire sur ces enzymes. D'après l'ensemble des études, les contaminants de type organochloré semblent produire une baisse de l'activité d'hydrolyse tandis que l'influence sur l'activité de la LRAT varie davantage (tableau 5.2). Au point où en sont les recherches dans ce domaine, les résultats obtenus avec les enzymes (augmentation ou diminution de l'activité), ne peuvent pas toujours expliquer les concentrations de rétinoïdes mesurées

dans les tissus. Ainsi, bien que la teneur en palmitate de rétinol augmente dans la muqueuse intestinale de rats traités avec le TCDD, les activités de l'ARAT et de la LRAT sont comparables à celles mesurées chez le groupe témoin (Hanberg *et al.*, 1998). Des constats similaires caractérisent l'étude de Nilsson *et al.* (2000) menée sur le même contaminant et sur la même espèce animale. Malgré une baisse de la teneur en esters hépatiques chez les rats traités avec le TCDD, aucun changement n'est rapporté pour l'activité d'hydrolyse de la HER.

Tableau 5.2

Effets des organochlorés sur l'activité de l'ARAT, de la LRAT et de la HER

Enzyme	Xénobiotique	Espèce/tissu	Effet	Références
ARAT	2,3,7,8-TCDD	Rat/reins	↑	Jurek <i>et al.</i> , 1990
ARAT	2,3,7,8-TCDD	Rat/intestin	Sans effet	Hanberg, 1996
LRAT	2,3,7,8-TCDD	Rat/intestin	Sans effet	Hanberg, 1996
LRAT	2,3,7,8-TCDD	Rat/foie	Sans effet	Nilsson <i>et al.</i> , 1996
LRAT	3,3',4,4'-TCB	Poisson/foie	Sans effet	Ndayibagira et Spear, 1999
LRAT	2,3,7,8-TCDD	Rat/rein	↑	Nilsson <i>et al.</i> , 2000
LRAT	3,3',4,4'-TCB	Caille/sac vitellin <i>In vivo</i> <i>In vitro</i>	↓ Sans effet	Boily, 2000 Boily <i>et al.</i> , 2003a
LRAT	2,3,3',4,4'-PCB	Caille/cas vitellin <i>In vitro</i>	Sans effet	Boily <i>et al.</i> , 2003b
LRAT	2,3',4,4'-TCB	Caille/cas vitellin <i>In vitro</i>	↑	Boily <i>et al.</i> , 2003b
HER	3,3',4,4'-TCB	Rat/rein	↑	Powers, 1987
HER	3,3',4,4'-TCB	Rat/foie	↓	Mercier <i>et al.</i> , 1990
HER	3,3',4,4',5,5'-HBB	Rat/foie	↓	Jensen <i>et al.</i> , 1987
HER	2,3,7,8-TCDD	Rat/foie	Sans effet	Nilsson <i>et al.</i> , 1996
HER	3,3',4,4'-TCB	Caille/sac vitellin <i>In vivo</i> <i>In vitro</i>	↓ ↑	Boily, 2000 Boily <i>et al.</i> , 2003a
HER	2,3,3',4,4'-PCB	Caille/sac vitellin <i>In vitro</i>	↑	Boily <i>et al.</i> , 2003b
HER	2,3',4,4'-TCB	Caille/sac vitellin <i>In vitro</i>	Sans effet	Boily <i>et al.</i> , 2003b
HER	3,3',4,4'-TCB	Poisson/foie	↓	Ndayibagira et Spear, 1999

Il faut donc supposer que l'action des contaminants peut se manifester de façon indirecte et qu'il faudra tester d'autres paramètres qui interviennent dans le métabolisme des rétinoïdes.

Les enzymes ARAT, LRAT et HER n'ont pas fait l'objet d'une attention particulière en ce qui a trait à d'autres espèces animales. L'activité de la LRAT a été identifiée dans les intestins de poulets âgés de 14 jours (Goda *et al.*, 1993) mais aucun contaminant n'a été testé sur cette activité. Cependant, quand des femelles de cailles japonaises reçoivent par injection du 3,3',4,4'-TCB, on observe une diminution de l'activité de la HER et de la LRAT dans le sac vitellin des embryons âgés de 6 jours (Boily, 2000 ; Boily *et al.*, 2003a). Dans la même étude, le congénère de BPC, injecté directement dans l'œuf, a provoqué une augmentation de l'activité HER. Un résultat similaire est obtenu avec l'injection du 2,3,3',4,4'-PCB tandis que le 2,3',4,4'-TCB a plutôt entraîné une hausse de l'activité de la LRAT (Boily *et al.*, 2003b).

En somme, les résultats de la contamination sur les activités enzymatiques de l'ARAT, de la LRAT et de la HER demeurent difficiles à interpréter. Plusieurs aspects du métabolisme des rétinoïdes restent à éclaircir et des recherches plus poussées seront nécessaires pour établir un lien entre la contamination, les enzymes et les rétinoïdes stockés. Il est toutefois intéressant de constater que ces activités enzymatiques sont sensibles à une contamination de type organochloré. Les enzymes HER, ARAT et LRAT sont des atouts dans la compréhension du système rétinoïde et pourraient éventuellement contribuer, du moins en partie, à expliquer certains déséquilibres observés au niveau du stockage.

3.1.5. Conclusions à propos du stockage de rétinoïdes

Le nombre d'expériences effectuées par des équipes de recherche indépendantes, en laboratoire et sur le terrain, a démontré que le stockage de rétinoïdes est un biomarqueur fiable chez les oiseaux et les poissons. Pour l'ensemble des publications, se dégage une tendance vers la diminution des rétinoïdes stockés en présence de contaminants lipophiles et persistants (p. ex., les BPC, dioxines, furannes, pesticides organochlorés) et parfois non persistants (p. ex., les hydrocarbures aromatiques polycycliques). Pour d'autres catégories de polluants, tels les pesticides (non organochlorés) et les métaux, la littérature est insuffisante pour porter un jugement sur des effets concernant le stockage des rétinoïdes. Dans le cas des mammifères, une littérature abondante se rapporte aux études de laboratoire. Par contre, les études sur le terrain avec des populations de mammifères indigènes sont des cas isolés. Le manque d'information scientifique est encore plus évident dans le cas des amphibiens, mais les résultats en ce sens ne devraient tarder étant donné l'intérêt pour la sauvegarde de cette classe d'organismes et les hypothèses impliquant les rétinoïdes dans les malformations observées chez les amphibiens.

Bien qu'il existe de nombreuses preuves scientifiques concernant les effets des contaminants sur les rétinoïdes emmagasinés dans les tissus, leur utilisation comme biomarqueurs est plus efficace dans le cadre d'études multidisciplinaires impliquant plusieurs biomarqueurs. Les études écotoxicologiques doivent prendre en considération certaines variables, autres que l'exposition aux substances toxiques, qui risquent d'influencer les résultats. Des expériences ont démontré une diminution des stocks de rétinoïdes chez les mammifères et les oiseaux d'élevage atteints d'une maladie infectieuse ou parasitaire. Dans ces cas, une évaluation pathologique peut être avantageuse. La quantité de caroténoïdes et de rétinoïdes ingérée peut varier entre les sites d'échantillonnage et en fonction de la disponibilité et de la qualité de la nourriture. Par exemple, une seule espèce de plante peut contenir des quantités variables en caroténoïdes entre le printemps et l'automne. Cette plante peut être consommée en grande quantité par un organisme juvénile ayant une certaine taille. Cependant, le choix de la nourriture peut changer quand l'organisme atteint une taille plus importante. Puisque l'accumulation de rétinoïdes semble continuer au fil des années, les concentrations retrouvées chez les organismes plus grands ou plus âgés ont tendance à être plus importantes. La planification d'une campagne d'échantillonnage doit donc minimiser l'effet de ces variables (p. ex., sélectionner des âges/tailles spécifiques) ou couvrir une gamme relativement complète de ces variables à chaque site. Parfois, la différence entre sexes est significative et, en théorie, le stockage de plus faibles concentrations en rétinoïdes chez la femelle peut être attribué à l'influence de la mobilisation des stocks lors de l'ovogenèse.

La majorité des expériences en écotoxicologie qui impliquent les rétinoïdes utilisent un protocole d'échantillonnage destructif, entraînant la mort des animaux lors du prélèvement des tissus. Les chercheurs doivent explorer davantage des modes d'échantillonnage non destructifs ou ayant un impact minimum sur les populations fauniques qu'ils souhaitent protéger (p. ex., prélèvement sanguin et collecte d'œufs).

3.2. RÉTINOL SANGUIN

Les résultats des expériences de laboratoire sont toujours contradictoires quant aux effets de substances toxiques sur le rétinol sanguin. Ce dernier a été rapporté par différents groupes de recherche comme étant augmenté, diminué, inchangé ou simplement variable chez les organismes exposés. Même en nutrition, il est difficile d'interpréter les concentrations de rétinol dans le sang, qui sont considérées de faible utilité quant au diagnostic d'une carence en vitamine A (Underwood, 1984). L'utilisation du rétinol

sanguin comme biomarqueur en écotoxicologie a déjà été qualifiée de « pré-maturée » (Spear et Bourbonnais, 1998). Néanmoins, certaines études récentes de terrain suggèrent que l'exposition chronique à faible niveau chez les populations fauniques puisse être associée à une baisse de rétinol sanguin, mais cette tendance n'est pas universelle (voir aussi la section 4).

Le rétinol sanguin peut être affecté, en présence de substances toxiques, par la liaison d'un métabolite du 3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle avec la protéine de transport, ce qui correspond aussi à une baisse du complexe rétinol-RBP-TTR. Brouwer et van den Berg (1986) ont proposé que les BPC, dioxines et furannes ou leurs métabolites peuvent diminuer le transport du rétinol dans le sang.

Un autre mécanisme implique une diminution de la teneur en TTR dans le sang. Une forte dose de 3,3',4,4',5,5'-hexabromobiphényle peut diminuer la consommation de nourriture et, conséquemment, provoquer une baisse du rétinol sérique (Spear *et al.*, 1988). Lorsqu'une dose moins forte est utilisée, ce congénère diminue l'ingestion de nourriture pendant 1 jour seulement, ce qui correspond également à une baisse transitoire du taux de rétinol sérique (Spear *et al.*, 1994). De plus, une restriction alimentaire cause une diminution importante du rétinol et du TTR dans le groupe exposé. Ces résultats vont dans le sens d'un effet sur la synthèse du TTR, probablement associé à un faible apport calorifique en protéines, donc un effet toxique indirect.

Un troisième mécanisme implique la mobilisation en masse des stocks hépatiques de rétinoïdes. Plusieurs groupes de recherche ont trouvé que l'intoxication par les BPC et dioxines amorce une augmentation importante du flux de rétinol du foie vers les reins, ce qui expliquerait une hausse du taux de rétinol dans le sang (Zile, 1992).

Oiseaux

Dans une étude de Spear *et al.* (1989), des tourterelles à collier ont reçu l'injection d'un BPC coplanaire, le 3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle. Comparativement au groupe de référence, le taux de rétinol sérique était plus élevé chez les mâles et les femelles exposés. Il est intéressant de noter que ces oiseaux ont produit des œufs dont les embryons se sont développés normalement.

Chez les eiders à duvet juvéniles ayant reçu une injection de 3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle, le taux de rétinol plasmatique a diminué après 1 jour, mais a augmenté après 10 jours (Murk *et al.*, 1994b). De plus, le taux de rétinol plasmatique était positivement corrélé avec la teneur du congénère de BPC dans le tissu adipeux.

Le rétinol plasmatique des oisillons de sternes pierregarins était différent entre diverses colonies échantillonnées aux Pays-Bas, mais aucune relation avec la contamination aux BPC n'a été établie (Murk *et al.*, 1994a).

Dans les études de van den Berg *et al.* (1994) impliquant des grands cormorans fraîchement éclos provenant de deux colonies aux Pays-Bas, aucun effet sur le rétinol plasmatique n'a été relevé en présence de contaminants comme les BPC, les furannes ou les dioxines.

Dans le cadre des études sur le goéland argenté et le grand héron dans le système des Grands Lacs et du fleuve Saint-Laurent, des corrélations négatives ont été obtenues entre le rétinol plasmatique et la concentration de contaminants lipophiles et persistants (Grasman *et al.*, 1996; Champoux *et al.*, 2000) (voir la section 4.1).

Le rétinol plasmatique de quinze goélands bourgmestres capturés à un seul site en Norvège était positivement corrélé avec l'activité de l'EROD hépatique, mais non avec les BPC analysés dans le même tissu (Henriksen *et al.*, 1998). Le même groupe de recherche a échantillonné dix oisillons de cormoran huppé, *Phalacrocorax aristotelis*, à un seul site peu de temps après l'éclosion et établi une corrélation positive entre le taux de rétinol plasmatique et la teneur en BPC dans le vitellus (Murvoll *et al.*, 1999).

Poissons

Le 3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle a provoqué une baisse du taux de rétinol plasmatique chez l'omble de fontaine et la truite arc-en-ciel (Ndayibagira *et al.*, 1995; N. Gilbert, Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, résultats non publiés).

Chez le flet commun exposé aux sédiments contaminés ou au lixiviat de ces sédiments, une baisse du taux de rétinol plasmatique a été rapportée (Besselink *et al.*, 1998). Cependant, le mélange de BPC Clophen A50 n'a pas eu d'effet sur ce paramètre biochimique (Besselink *et al.*, 1996).

Mammifères

La population de bélugas, *Delphinapterus leucas*, du fleuve Saint-Laurent a accumulé des teneurs élevées en BPC, en DDT et en autres organochlorés dans les tissus. Cette population est à seulement 10 % de son niveau pré-industriel et plusieurs pathologies graves, y compris le cancer biliaire et les infections opportunistes, ont été documentées (Martineau *et al.*, 1987, 1988; DeGuise *et al.*, 1995). Outre les pathologies, les scientifiques soupçonnent l'immunodépression et l'altération de la reproduction. En incorporant de la graisse contaminée de bélugas du Saint-Laurent à la

nourriture de rats, on a détecté la présence du métabolite acide all-*trans*-4-oxo-rétinoïque dans le plasma (P.A. Spear, M.J. Cloutier, S. De Guise et M. Fournier, Université du Québec, résultats non publiés).

Des maladies infectieuses sont apparues dans plusieurs autres populations de mammifères marins contaminées par les organochlorés; ces épisodes ont été souvent associés à un taux de mortalité élevé. Parce qu'une immunodépression peut être causée par un déséquilibre en vitamine A (voir la section 2.4), le rétinol sanguin a fait l'objet d'études en tant que biomarqueur. Lors d'une expérience semi-contrôlée, des phoques communs femelles, *Phoca vitulina*, ont été exposés aux BPC par le biais de la nourriture. Le taux de rétinol plasmatique chez les femelles gestantes et non gestantes a chuté dans les groupes exposés (Brouwer *et al.*, 1989). Chez les jeunes phoques communs (avant sevrage) échantillonnés du côté Pacifique nord-américain, la teneur en contaminants de type BPC, dioxines et furannes (TCDD-EQ) démontrait une corrélation positive avec le taux de rétinol sanguin (Simms *et al.*, 2000). Cependant, dans le cas des jeunes éléphants de mer, *Mirounga angustirostris*, et phoques gris, *Halichoerus grypus*, des corrélations négatives ont été obtenues entre les contaminants organochlorés et le taux de rétinol sanguin (Jenssen *et al.*, 1995; Shaw, 1998).

Chez la loutre d'Europe, gardée dans des centres de réhabilitation en Angleterre et aux Pays-Bas et sans exposition intentionnelle, les concentrations de rétinol plasmatique ne démontraient aucune relation avec les TCDD-EQ à base de BPC analysés également dans le sang (Murk *et al.*, 1998). Dans le cas du vison d'Amérique exposé aux BPC dans la nourriture, le taux de déhydro-rétinol (mais pas de rétinol) était plus faible comparé aux témoins (Kakela *et al.*, 1999). Lorsque les visons femelles ont subi une exposition au cuivre ou au cuivre + BPC, le déhydro-rétinol et le rétinol plasmatique ont diminué par rapport aux témoins (Kakela *et al.*, 1999).

3.3. EFFETS SUR LE MÉTABOLISME DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE

Plusieurs auteurs ont signalé que l'hydroxylation *in vitro* de l'acide all-*trans*-rétinoïque et l'oxydation subséquente (voir la section 2.2) augmentent suite à une exposition aux HAP, aux BPC ou aux dioxines. Chez le cobaye, le taux d'hydroxylation/oxydation de l'acide rétinoïque dans les microsomes hépatiques était plus élevé chez les individus exposés au 3-méthylcholantrène ou au phénobarbital (Roberts *et al.*, 1979). Le phénobarbital a eu le même effet chez le rat (Martini et Murray, 1994). Le 3,3',4,4',5,5'-hexabromobiphényle injecté aux rats augmentait l'hydroxylation/oxydation de l'acide rétinoïque par les microsomes du foie (Spear *et al.*, 1988). Fiorella *et al.* (1995) ont rapporté une induction de l'hydroxylation *in vitro* de l'acide rétinoïque par des microsomes du foie, du rein

et du poumon suite à l'exposition des rats à la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine. Chez les poissons, le 3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle a provoqué une hausse de l'hydroxylation de l'acide rétinoïque une fois injecté chez la truite arc-en-ciel et une hausse de l'hydroxylation/oxydation au niveau des microsomes hépatiques de l'omble de fontaine (Gilbert *et al.*, 1995; Boyer *et al.*, 2000). Les études sur le terrain suggèrent que les contaminants de type BPC coplanaires peuvent augmenter l'hydroxylation de l'acide rétinoïque chez l'esturgeon jaune (voir la section 4.2).

Quant à la glucuronidation de l'acide rétinoïque par l'UDP-GT, Spear *et al.* (1988) ont constaté une hausse de cette activité dans les microsomes hépatiques de rats exposés au 3,3',4,4',5,5'-hexabromobiphényle. Dans le cas des rats gavés de 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine, une augmentation du taux de glucuronidation *in vitro* a été signalée au niveau du rein et du foie (Bank *et al.*, 1989). Chez l'omble de fontaine, le 3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle a augmenté la glucuronidation de l'acide rétinoïque telle que mesurée dans des microsomes du foie (Boyer *et al.*, 2000).

4. EXEMPLES DES RÉTINOÏDES COMME BIOMARQUEURS DANS LE CONTEXTE D'ÉTUDES ÉCOTOXICOLOGIQUES

4.1. PROGRAMMES DE SURVEILLANCE DES COLONIES AVIENNES SUR LES GRANDS LACS ET LE FLEUVE SAINT-LAURENT

Les Grands Lacs

Depuis environ 30 ans, le Service canadien de la faune et son homologue américain, le U.S. Fish and Wildlife Service, ont entrepris une bio-surveillance formalisée par l'*Accord de 1978 relatif à la qualité de l'eau dans les Grands Lacs*. Cet accord, remanié en 1989 par la Commission mixte internationale États-Unis et Canada, comprend, entre autres responsabilités gouvernementales, « la mise au point et l'utilisation de paramètres biochimiques, physiologiques et de reproduction chez la faune, le poisson et l'être humain pour servir d'indicateurs d'effets¹ ». Ceci a été conçu dans le contexte d'un système intégral de biosurveillance afin de prévoir les problèmes associés aux substances toxiques. En 1998, l'Accord était toujours une priorité de la Commission mixte internationale.

1. Le terme « bioindicateur » est utilisé ici au lieu de « biomarqueur », qui n'était pas connu à l'époque.

Pour exercer cette biosurveillance, on a sélectionné le goéland argenté, *Larus argentatus*, comme espèce sentinelle. Cette espèce occupe un maillon trophique supérieur (principalement carnivore et piscivore) ; elle est fidèle à son site de nidification et ne migre que rarement des Grands Lacs en hiver. De plus, les niveaux de contamination des tissus du goéland argenté démontrent des variations selon les sites d'échantillonnage (Peakall *et al.*, 1978 ; Mineau *et al.*, 1984). Il faut souligner qu'au plus fort des effets exercés par la pollution environnementale, plusieurs populations d'oiseaux ont connu des baisses importantes de leur effectif de sorte que peu d'espèces se trouvaient représentées par un nombre suffisant d'oiseaux pour faire partie d'un programme de surveillance. Le choix d'une espèce sentinelle s'est donc arrêté sur le goéland argenté, une espèce relativement résistante aux contaminants et présentant des effectifs de population suffisants, distribués sur tous les lacs.

Avec la sélection d'une espèce sentinelle, toute une panoplie de biomarqueurs ont été testés. Parmi ces biomarqueurs, les enzymes inducibles associées à l'action du cytochrome P450 ont été largement utilisées. L'activité d'enzymes hépatiques comme AHH et EROD était plus élevée chez les goélands argentés des Grands Lacs lorsque comparée à des oiseaux de la même espèce de la côte atlantique (Ellenton *et al.*, 1985 ; Boersma *et al.*, 1986). Ces activités accrues d'enzymes ont été associées à la présence dominante dans la région des Grands Lacs de contaminants organochlorés : dioxines, furannes, BPC et HAP. Des corrélations ont été établies entre la concentration de ces molécules xénobiotiques et les activités enzymatiques mesurées dans le foie. Les BPC coplanaires (et leurs équivalents toxiques en TCDD) ont également été corrélés avec des malformations observées chez la sterne caspienne, *Sterna caspia*, et le cormorans à aigrette, *Phalacrocorax auritus* (Ludwig *et al.*, 1996). Toute une série d'effets ont alors été répertoriés pour l'ensemble des oiseaux des Grands Lacs sous la désignation de « GLEMEDS » (*Great Lakes embryo mortality, edema, and deformity syndrome*) (Gilbertson *et al.*, 1991). Ces données qualitatives ont permis de faire un suivi des conséquences néfastes de la contamination des Grands Lacs sans fournir d'indices précis sur les mécanismes à l'origine de ces malformations, de potentiels biomarqueurs.

D'autres outils de biosurveillance ont été testés ; on a pu constater que les porphyrines hépatiques des goélands argentés des Grands Lacs étaient 25 à 38 fois plus élevées que chez les goélands argentés de la côte atlantique (Fox *et al.*, 1988). Ces résultats concernent les porphyrines « totales », dont un grand nombre étaient fortement carboxylées, un effet du blocage de la voie métabolique. Des effets de la contamination se sont également manifestés sur le système immunitaire. On a pu déterminer

une relation entre un gradient de contamination mesuré pour certains sites des Grands Lacs et le degré d'immunosuppression chez les goélands argentés et les sternes caspiennes rattachés à ces sites (Grasman *et al.*, 1996).

Tous ces résultats ont constitué des étapes marquantes dans l'établissement d'un système de biosurveillance, sans toutefois démontrer de relations de cause à effet. Le lien tangible entre la manifestation « cellulaire » de ces effets et le piètre succès reproducteur des oiseaux des Grands Lacs demeurerait difficile à cerner. Trois facteurs retiennent l'attention cependant : l'amincissement des coquilles des œufs dû au DDE, les malformations et le comportement des couples nicheurs. En effet, dans des sites très contaminés, les oiseaux négligent la couvaison, le soin accordé aux oisillons et la défense de leur territoire. Ces facteurs ont certainement contribué au déclin de certaines populations d'oiseaux, et bien qu'ils trahissent les effets ultimes d'une contamination environnementale grave, la désignation de « biomarqueurs » ne saurait leur être appliquée.

Parmi les biomarqueurs pouvant avoir un impact sur la reproduction des oiseaux, il faut commenter les essais effectués sur les hormones thyroïdiennes et les rétinoïdes. Toujours en comparant les goélands argentés des Grands Lacs et de la côte est du Canada, on a constaté des différences notables pour la glande thyroïde (masse plus grande pour les goélands argentés des Grands Lacs), y compris une hyperplasie des tissus. En 1992 et 1993, les concentrations de thyroxine plasmatique varient de façon significative selon le site et l'année d'échantillonnage (Grasman *et al.*, 1996). Cependant, aucune association avec des contaminants organochlorés n'a pu être démontrée. On a obtenu des résultats plus encourageants avec les rétinoïdes. Les analyses ont principalement porté sur les rétinoïdes hépatiques (rétinol et palmitate de rétinol) et l'on a pu démontrer que des concentrations significativement plus basses de ces formes de rétinoïdes caractérisaient les goélands argentés des Grands Lacs comparativement aux oiseaux de la côte atlantique. On a également trouvé que les concentrations de rétinoïdes hépatiques variaient entre les différents sites échantillonnés des Grands Lacs et, surtout, que ces concentrations étaient inversement proportionnelles à la contamination en dioxine associée à ces sites (Spear *et al.*, 1986). Dans le cas des goélands argentés du lac Ontario, on a établi une corrélation négative entre le rétinol hépatique et l'AHH (Spear *et al.*, 1992). Cependant, la corrélation n'était évidente que pour l'échantillonnage de 1987, quand les rétinoïdes étaient à leurs plus faibles concentrations comparativement aux campagnes d'échantillonnage de 1982 et 1986 pour la même colonie de goélands.

Ces résultats ont été corroborés dans des expériences contrôlées en laboratoire dans lesquelles la tourterelle à collier a servi de modèle (Spear *et al.*, 1986) (voir les sections 3.1.1 et 3.1.2). Une autre étude portant sur la

tourterelle à collier a démontré que le 3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle pouvait avoir des effets néfastes sur la reproduction, ce qui correspondait aux déséquilibres en rétinol sérique et en rétinoïdes dans le vitellus des œufs (Spear *et al.*, 1989) (voir les sections 3.1.3 et 3.2). Un résultat portant aussi sur le rétinol sanguin et les contaminants a été rapporté par Grasman *et al.* (1996) pour de jeunes goélands argentés des Grands Lacs. Dans cette expérience, les concentrations plasmatiques de rétinol étaient négativement corrélées avec l'exposition aux organochlorés (BPC et DDE) pour les cinq sites échantillonnés. Les résultats de ces études nous amènent à considérer deux points fort importants. D'abord, les rétinoïdes semblent affectés par la contamination de type organochloré. Ils peuvent donc s'avérer des biomarqueurs intéressants. De plus, un déséquilibre des rétinoïdes chez les oiseaux reproducteurs peut avoir un impact direct sur la reproduction et, conséquemment, sur le maintien des populations d'oiseaux.

En période de reproduction, la femelle pondeuse doit incorporer dans les œufs en formation tous les éléments dont l'embryon aura besoin pour connaître les meilleures chances de survie possibles. Entre autres éléments, les rétinoïdes sont déposés dans le vitellus de l'œuf, par le biais de la circulation sanguine. Non seulement les rétinoïdes doivent se retrouver en quantité suffisante dans l'œuf, mais encore faut-il que les proportions entre les différentes formes de rétinoïdes soient respectées pour assurer les conditions indispensables au développement normal de l'embryon. Si un déséquilibre des rétinoïdes est perceptible chez les oiseaux nichant dans des sites contaminés, quelles en sont les répercussions sur les œufs pondus, garants du maintien de l'espèce? La recherche sur le métabolisme des rétinoïdes *in ovo* s'est alors imposée comme une extension à ce qui était déjà connu en terme de rétinoïdes chez les couples d'oiseaux reproducteurs.

Pendant la période de nidification de 1986 et de 1987, on a analysé la concentration en rétinoïdes des œufs de goélands argentés provenant de sept sites des Grands Lacs. Les œufs avaient été incubés entre 2 et 12 jours, période pendant laquelle peu de changements métaboliques interviennent sur les rétinoïdes. Les résultats démontrent que les concentrations de rétinol et de palmitate de rétinol varient de façon significative entre les sites échantillonnés (Spear *et al.*, 1990). Le ratio molaire rétinol:palmitate de rétinol a suivi la même tendance et des corrélations significatives ont été démontrées avec des contaminants mesurés dans ces mêmes œufs : 2,3,7,8-TCDD ($r = 0,87$), sommation de PCDD et PCDF ($r = 0,76$) et leurs équivalents toxiques en TCDD ($r = 0,87$). Ces résultats, ainsi que ceux des expériences de laboratoire (voir la section 3.1.3), nous amènent à constater que les déséquilibres en rétinoïdes stockés *in ovo* peuvent se manifester très tôt dans le développement.

Hormis l'avantage de considérer les rétinoïdes de l'œuf comme biomarqueurs, la collecte des œufs évite d'avoir à supprimer des oiseaux reproducteurs pour obtenir des tissus. De plus, l'outil de biosurveillance représenté par l'œuf d'oiseau amène incontestablement la notion de transfert de la femelle jusqu'à l'œuf et l'influence des contaminants lors de ce transfert ; de nouvelles avenues de recherches.

Ces expériences de terrain et de laboratoire ont validé l'utilisation des rétinoïdes comme biomarqueurs. Non seulement les rétinoïdes peuvent trahir la contamination environnementale de type organochloré, mais leur impact direct sur certains paramètres de la reproduction leur donne, par rapport à d'autres biomarqueurs, un statut particulier et avantageux dans un système de biosurveillance.

Le Saint-Laurent

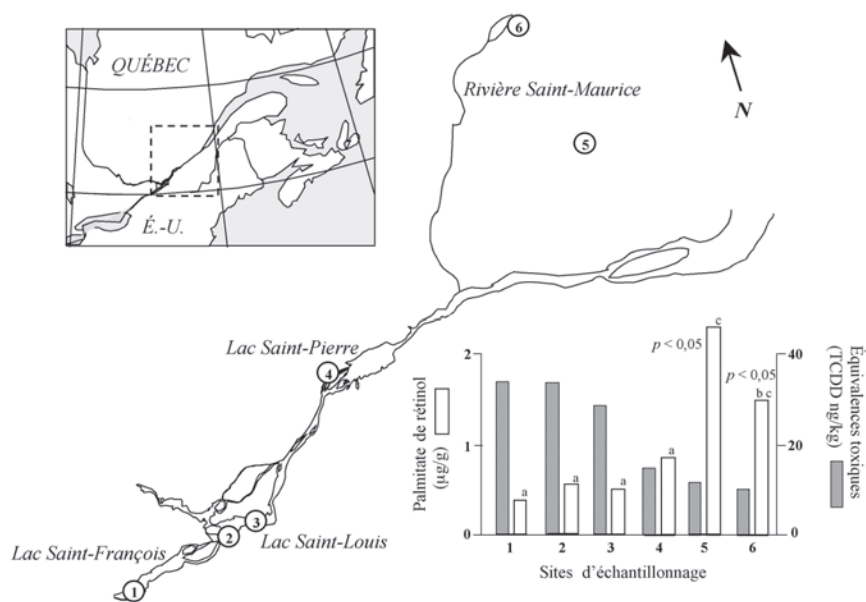
L'ensemble des études réalisées dans la région des Grands Lacs ayant la biosurveillance comme dénominateur commun s'est transposé peu à peu vers l'est, dans les eaux du fleuve Saint-Laurent. Le Plan d'action Saint-Laurent, Vision 2000, avait pour objectif de mettre sur pied un système de biosurveillance pour le fleuve Saint-Laurent. Plusieurs biomarqueurs ont été testés chez deux espèces d'oiseaux, le grand héron (*Ardea herodias*) et le bihoreau gris (*Nycticorax nycticorax*), afin de sélectionner une espèce sentinelle. Le choix s'est finalement porté sur le grand héron. Les colonies de grands hérons sont distribuées tout le long du fleuve Saint-Laurent et les effectifs de population ne démontrent aucun signe de déclin ou d'affaiblissement. Le grand héron se situe dans les maillons supérieurs de la chaîne trophique, ce qui en fait un sujet adéquat pour les contaminants bioaccumulables, d'autant plus qu'il est doté d'une bonne longévité. Le Service canadien de la faune dispose également de nombreuses données sur l'écologie du grand héron du fleuve, ce qui constitue un avantage pour le suivi des populations.

Plusieurs analyses biologiques ont été testées sur le grand héron : les analyses cliniques sanguines, les rétinoïdes, les hormones thyroïdiennes, les oxydases à fonctions mixtes et les porphyrines. Des analyses chimiques en parallèle ont été effectuées pour les métaux lourds et les organochlorés (Champoux *et al.*, 2000). Parmi les biomarqueurs les plus sensibles figurent les rétinoïdes. Des différences significatives entre les colonies échantillonnées caractérisent le rétinol et le palmitate de rétinol hépatiques. De plus, ces rétinoïdes sont négativement corrélés avec des contaminants organochlorés comme les BPC, le *o,p'*-DDE et le mirex. Une relation similaire a été observée pour le rétinol plasmatique des grands hérons juvéniles.

Les rétinoïdes et leur précurseur, le β -carotène, ont été analysés dans des œufs de grand héron prélevés en 1991 (figure 5.3 ; Boily *et al.*, 1994). On remarque des différences significatives entre les colonies pour le palmitate de rétinol et le ratio rétinol : palmitate de rétinol. Dans la partie dulcicole du fleuve (six colonies), une corrélation intéressante a été établie entre le palmitate de rétinol et les BPC mono-*ortho* contenus dans les œufs. Quand des équivalences toxiques en TCDD ont été établies pour les congénères de BPC 105 (2,3,3',4,4'-PCB) et 118 (2,3,4,4',5), cette relation était maintenue ($r = -0,88$). Les équivalences toxiques ne représentent toutefois qu'une partie des congénères de BPC, soit ceux dont le mécanisme d'action s'apparente à celui de la dioxine par le biais du récepteur cytosolique *Ah*. Dans cette étude impliquant les œufs de grand héron, des corrélations ont aussi été démontrées avec d'autres congénères mono-*ortho* qui ne sont pas reconnus pour induire les cytochromes P450 : le BPC 60 (2,3,4,4'-TCB), le BPC 66 (2,3',4,4'-TCB) et le BPC 74 (2,4,4',5-TCB). Enfin, d'autres corrélations ont été trouvées impliquant des organochlorés présents dans les œufs comme le mirex ($r = -0,93$), le photomirex ($r = -0,94$) et l'octachlorostyrène ($r = -0,97$).

Figure 5.3

Étude sur les colonies de grands hérons nichant le long du fleuve Saint-Laurent



Les niveaux de contamination trouvés dans les œufs de grand héron du fleuve Saint-Laurent ne semblent pas affecter l'espèce outre mesure. Le site le plus contaminé, si l'on se fie aux équivalences toxiques calculées à partir des BPC 105 et 118 des œufs, avoisine les 62 ng/kg. Or, des études réalisées chez le grand héron de la Colombie-Britannique relatent des problèmes de reproduction quand les valeurs d'équivalences toxiques atteignent les 200 ng/kg. Il apparaît donc que le grand héron du fleuve soit, pour le moment, à l'abri de tels aléas. Il n'en reste pas moins que le programme de surveillance du fleuve Saint-Laurent se poursuit en échantillonnant régulièrement les œufs de grand héron et en se servant des rétinoïdes comme biomarqueurs.

Lors de tels échantillonnages sur le terrain, des précautions doivent être prises pour sélectionner les œufs se trouvant dans la première moitié du développement, idéalement, dans la première semaine. Après cette période, les rétinoïdes, principalement le rétinol, sont fortement mobilisés du jaune vers l'embryon. Les rétinoïdes mesurés dans l'œuf doivent être statistiquement confrontés avec l'âge de l'embryon pour statuer de l'influence du stade de développement sur les concentrations mesurées. Dans l'étude de Boily *et al.* (1994) le ratio rétinol : palmitate de rétinol se trouvait dépendant du stade de développement, très probablement à cause du rétinol. Pour cette raison, le palmitate de rétinol, aux concentrations indépendantes du stade de développement, s'est avéré un biomarqueur plus sûr.

Les rétinoïdes utilisés comme biomarqueurs s'avèrent des outils de biosurveillance intéressants. Ils sont sensibles à des contaminants organochlorés, même si ceux-ci ne sont pas présents en fortes concentrations. Des réponses peuvent être perçues au niveau du foie, du sang et même dans les œufs des oiseaux. L'utilisation des œufs d'oiseaux comme outil de surveillance constitue un avantage en facilitant l'échantillonnage tout en révélant les conditions de contamination qui prévalent chez les oiseaux reproducteurs de différents écosystèmes. Des expériences de terrain et de laboratoire ont clairement démontré que les rétinoïdes de l'œuf sont sensibles à des contaminants de type organochloré ; qui plus est, cette sensibilité peut se détecter très tôt dans le développement.

Il faut cependant souligner que bien que la relation rétinoïdes-organochlorés soit reconnue et de plus en plus utilisée dans les programmes de surveillance environnementale, les mécanismes cellulaires qui régissent cette relation sont loin d'être identifiés. L'hypothèse la plus vraisemblable réside dans le fait que des contaminants comme les BPC et leurs métabolites peuvent réagir avec le système enzymatique qui prévaut entre les différentes formes de rétinoïdes et provoquer des déséquilibres. Cette hypothèse, liée au fait que des changements peuvent survenir

dès le début de la vie embryonnaire, a orienté des travaux de laboratoire ayant pour modèle la caille japonaise (Boily, 2000 ; Boily *et al.*, 2003a, 2003b). Rétinol et palmitate de rétinol ont été dosés dans des œufs de cailles japonaises exposés à un BPC coplanaire et à deux congénères mono-*ortho*. Dans tous les cas, des effets sur les rétinoïdes ont été observés et les œufs ont été incubés pendant seulement 6 jours, ce qui représente environ 30 % du développement chez cette espèce d'oiseau. Avec un embryon si peu développé on ne peut parler de « stockage » et d'activités enzymatiques de rétinoïdes liés au foie de l'embryon. Mais les activités de deux enzymes importantes (LRAT et HER) ont été trouvées et caractérisées dans le sac vitellin de l'embryon de caille japonaise. Ce système enzymatique s'est révélé très sensible à une exposition aux BPC ; des effets sont perçus à des doses aussi faibles que 0,2 mg/kg. Dans ces études cependant, les activités enzymatiques ne concordent pas toujours avec les concentrations de rétinoïdes mesurées dans le vitellus. Le métabolisme des rétinoïdes *in ovo* peut s'avérer bien plus complexe qu'il n'y paraît en premier lieu. Et bien que des recherches supplémentaires seront indispensables à une meilleure compréhension du fonctionnement des rétinoïdes, leur sensibilité face à la contamination et leur implication dans la vie embryonnaire et la reproduction en font des biomarqueurs pratiquement inévitables de tout programme de biosurveillance.

4.2. ÉTUDES SUR LES POPULATIONS D'ESTURGEON JAUNE

Au Québec, la distribution de l'esturgeon jaune s'étend du sud au nord-ouest jusqu'à la baie James (Scott et Crossman, 1973 ; Bergeron et Brousseau, 1982). Plusieurs expériences suggèrent qu'une seule population existe dans le couloir central du fleuve Saint-Laurent. La comparaison des fragments d'ADN mitochondrial générés par les endonucléases de restriction a démontré un génotype commun entre l'Esturgeon jaune du lac des Deux-Montagnes, de la rivière des Outaouais et de la région de la baie James (Guénette *et al.*, 1993). Par contre, ce génotype n'est pas présent chez l'esturgeon jaune du fleuve, ce qui indique un groupe de poissons distinct. Outre la différence de génotype, des études de capture-marquage-recapture indiquent aussi l'existence d'une population dans le couloir central du fleuve Saint-Laurent. Des adultes ont été marqués près des frayères autour de Montréal et ont par la suite été recapturés à différents endroits sur le fleuve entre les lacs Saint-Louis et Saint-Pierre. Ces résultats correspondent à un déplacement important dans le couloir central (Dumont *et al.*, 1987 ; Fortin *et al.*, 1993). Même si aucune barrière physique ne se trouve entre le lac des Deux-Montagnes et le fleuve Saint-Laurent, ces études démontrent très peu d'échange avec les esturgeons adultes du lac des Deux-Montagnes. Les adultes et juvéniles évitent l'eau

salée et sont rarement pêchés en aval de Gentilly. Des barrages à Beauharnois et à Carillon limitent leur migration plus en amont. En bref, ces études ont permis d'identifier une population d'esturgeon jaune qui semble passer sa vie dans le secteur du fleuve le plus contaminé par des sources de pollution domestiques, industrielles et agricoles.

En habitant un endroit relativement contaminé, les esturgeons du Saint-Laurent risquent de subir une exposition élevée aux produits toxiques. Cependant, plusieurs autres facteurs pourraient également favoriser l'accumulation des substances persistantes et lipophiles. Premièrement, l'esturgeon est un poisson carnivore principalement benthophage, donc en contact avec les sédiments contaminés. Deuxièmement, les Acipenseridae sont considérés comme des poissons « gras », donc prédisposés à accumuler des substances lipophiles. L'esturgeon jaune atteint une taille relativement grande et un âge avancé avant de se reproduire (p. ex., la médiane pour la maturité sexuelle des femelles du fleuve est 133 cm de longueur et 26 ans ; Goyette *et al.*, 1987). L'exposition aux contaminants ainsi que la période potentielle d'accumulation dans les tissus, y compris les gonades, est donc très longue avant même le premier frai. Paul et Laliberté (1988) ont constaté que la concentration moyenne en BPC total de 1,75 mg/g (poids humide) dans la chair de cinq individus d'une taille > 125 cm dépassait la limite établie par Santé Canada pour la consommation humaine. Ces poissons, capturés au Lac Saint-Pierre, avaient les plus fortes teneurs en BPC parmi les sept espèces analysées dans le cadre de la même étude. D'autres chercheurs ont aussi observé une tendance de l'esturgeon jaune pour l'accumulation de fortes concentrations de substances toxiques (Lévesque et Pomerleau, 1986).

L'esturgeon jaune a donc été sélectionné comme une espèce sujette à une forte exposition aux substances toxiques. Une série d'expériences a été effectuée aux sites d'échantillonnage sur le fleuve en comparaison avec des sites « de référence » loin des sources ponctuelles de contamination en Abitibi, dans l'ouest du Québec. Les objectifs de ces expériences étaient d'évaluer si l'esturgeon jaune du fleuve était affecté par les substances toxiques et, plus spécifiquement, de vérifier l'hypothèse voulant que le stockage ainsi que le métabolisme des rétinoïdes soit altérés par la contamination chimique. Un bilan des résultats est présenté dans le tableau 5.3.

Un échantillonnage de plus de 120 esturgeons juvéniles a été réalisé en août et septembre 1995 dans le cadre de la pêche commerciale au lac Saint-Louis, sur le fleuve, et au lac Berthelot, dans la région d'Abitibi. Des sous-échantillons d'un gramme de foie provenant de 10 poissons à chaque site ont été récupérés afin d'obtenir une moyenne par site. Les analyses de 43 congénères spécifiques de BPC ont été effectuées par le ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec, en utilisant la méthode de

Brochu *et al.* (1995). La concentration totale de BPC dans le foie des esturgeons du fleuve était de 760 ng/g (poids humide), soit 18 fois plus que la concentration détectée dans le foie des individus du site de référence (Doyon *et al.*, 1999). Les BPC coplanaires N^{os} 77 et 126 étaient les plus importants dans l'estimation des équivalences toxiques (TCDD-EQ) et ils étaient 20 fois plus élevés dans le cas des esturgeons du fleuve, avec une concentration de 2,8 pg/g (poids humide).

Tableau 5.3

Résumé des résultats¹ chez la population de l'esturgeon jaune, *Acipenser fulvescens*, du fleuve Saint-Laurent comparativement aux sites de référence

TCDD-EQ (à base des congénères BPC)	20 x plus
Induction d'EROD	$p < 0,0005$
Histopathologie du foie :	
Prolifération du canal biliaire	$p < 0,0001$
Fibrose	$p < 0,0001$
Inflammation	$p < 0,001$
Accumulation des lipides	$p < 0,05$
Diminution des mélanomacrophages	$p < 0,01$
Malformations :	
Nageoires – larves (6,3 %)	$p < 0,001$
Crânio-faciales et nageoires – juvéniles et adultes (2,9 %)	
Métabolisme de l'acide rétinoïque :	
Augmentation du taux d'hydroxylation	$p < 0,0001$
Corrélations négatives avec rétinoïdes hépatiques	$p < 0,0001$
Stockage de rétinoïdes hépatiques :	
Moins de rétinol et de déhydrorétinol	$p < 0,0001$
Moins d'esters du rétinol et du déhydrorétinol	$p < 0,0001$
Absence de corrélations positives avec l'âge	
Stockage de rétinoïdes intestinaux :	
Moins d'esters du rétinol et du déhydrorétinol	$p < 0,01$

1. Compilation des résultats de Rousseaux *et al.* (1995); Ndayibagira *et al.* (1995); Doyon *et al.* (1998); Doyon *et al.* (1999).

Les BPC coplanaires sont reconnus pour leur forte capacité d'induire les CYP1A1 et 1A2. Une plus grande activité microsomale de l'EROD, dépendant du cytochrome P4501A1, a été constatée chez l'esturgeon jaune du fleuve comparativement aux poissons du site de référence (Rousseaux *et al.*, 1995). Les cytochromes P450 induits par les BPC coplanaires font partie d'une douzaine d'isozymes qui catalysent l'hydroxylation de l'acide

rétinoïque dans les systèmes mammaliens (Roberts *et al.*, 1992; Muindi et Young, 1993). Afin d'évaluer le métabolisme de l'acide rétinoïque chez l'esturgeon jaune, des conditions d'essai enzymatique au niveau des microsomes hépatiques ont été optimisées. Les essais ont ensuite été effectués dans les microsomes d'une soixantaine d'esturgeons de la région d'Abitibi. Le sexe, l'âge, la taille et le développement gonadique qui ont été observés n'ont démontré aucun effet significatif sur le taux d'hydroxylation (Doyon *et al.*, 1999). Des résultats similaires ont été observés sur une centaine d'esturgeons provenant de trois sites sur le fleuve (lac Saint-Louis, îles de Sorel, rivière des Prairies). Cependant, le taux d'hydroxylation de l'acide rétinoïque était significativement plus élevé pour les esturgeons du fleuve que pour ceux du site de référence (Doyon *et al.*, 1999). Ces résultats concordent avec l'accumulation de BPC coplanaires et l'induction des cytochromes P450 de la famille 1A dans le cas des esturgeons du fleuve.

L'activité biologique de l'acide rétinoïque, des isoformes et de certains métabolites a déjà été discutée (sections 2.2 et 2.3). En théorie, un déséquilibre métabolique de l'acide rétinoïque peut causer divers effets sur l'organisme, y compris des anomalies lors du développement embryonnaire. Des malformations ont été observées parmi des larves et des juvéniles d'esturgeon jaune, de meunier noir et de mené tête-de-boule, *Pimephales promelas*, capturés autour de Montréal (Drapeau, 1990; Branchaud, 1993). Afin de vérifier l'hypothèse que le taux de malformation était plus élevé pour les poissons du Saint-Laurent, il a donc été nécessaire de quantifier les malformations. Des esturgeons et des meuniers adultes ont été prélevés près de leurs frayères à Montréal et en Abitibi. Leurs gamètes ont été collectés et les embryons ont été gardés dans des ruisseaux artificiels. Sous les conditions optimales de ces ruisseaux, les facteurs environnementaux ponctuels (p. ex., température, oxygène, courant, contaminants dans l'eau, micro-organismes) étaient contrôlés et donc considérés non influents dans le cadre de cette étude. Parmi les larves d'esturgeons du fleuve, 6,3 % démontraient des nageoires difformes à un taux significativement plus élevé que les larves d'Abitibi (Doyon *et al.*, 1999). Le taux de malformation de 1,45 % chez le meunier noir de Montréal était significativement plus élevé que celui des meuniers noirs d'Abitibi (Branchaud *et al.*, 1995). Depuis 9 ans, un taux relativement constant de 2,9 % pour les malformations crânio-faciales et des nageoires a été constaté (Doyon *et al.*, 1999). De plus, des malformations tel que le rostrum bifurqué (analogue à la fente palatine ou le bec-de-lièvre chez l'humain) ainsi que le manque ou la multiplication des nageoires, qui sont semblables aux effets de rétinoïdes sur le développement des membres chez les oiseaux, amphibiens et mammifères, ont été observés.

L'histopathologie de l'esturgeon jaune au stade adulte a révélé une accumulation de lipides, une prolifération des cellules épithéliales au niveau du canal biliaire, une fibrose périportale, une diminution des cellules macrophages et une inflammation significativement plus élevées chez les poissons capturés près de Montréal (Rousseaux *et al.*, 1995). Ces observations suggèrent des effets typiquement associés aux substances hépatotoxiques tels que les BPC. De plus, le parallèle entre les effets de rétinoïdes et les pathologies observées par Rousseaux et collaborateurs sont similaires puisque la prolifération des cellules épithéliales, la différenciation des fibroblastes, ainsi que la diminution des cellules clés dans la réponse immunitaire ont été associées aux déséquilibres des rétinoïdes (Gudas *et al.*, 1994). Il faut souligner que l'origine des malformations et des pathologies hépatiques n'est pas connue et que l'implication d'un déséquilibre en acide rétinoïque associé aux contaminants environnementaux n'est qu'une explication possible.

Lors de l'analyse des rétinoïdes majeurs chez des esturgeons adultes ou juvéniles, la population du fleuve Saint-Laurent avait des concentrations plus faibles comparativement aux esturgeons de la région d'Abitibi. Le stockage des rétinoïdes dans la partie antérieure de l'intestin était significativement inférieur dans le cas des esturgeons adultes du Saint-Laurent (Ndayibagira *et al.*, 1995). De plus, les extraits du foie des juvéniles ont présenté des concentrations nettement plus faibles chez les individus du fleuve (figures 5.4 et 5.5). Le même profil a été obtenu pour les deux sites. Le rétinol et le déhydrorétinol étaient typiquement identifiés. Parmi les esters, on en retrouvait deux formés à partir du rétinol (palmitate et oléate) ainsi que cinq formés du déhydrorétinol (palmitate, oléate, linoléate, myristate et stéarate).

Les concentrations de la plupart des rétinoïdes majeurs se trouvent positivement corrélées avec l'âge (entre 21 et 42 ans) pour les individus de la région d'Abitibi (Doyon *et al.*, 1998). Habituellement, un organisme a tendance à accumuler ses réserves de rétinoïdes. Ce phénomène a souvent été rapporté chez les mammifères et les oiseaux d'élevage. Cependant, aucune relation avec l'âge n'a été identifiée dans le cas des esturgeons du Saint-Laurent, ce qui indique une défaillance du stockage de la vitamine A (section 3.1). De plus, les concentrations hépatiques de rétinoïdes ont démontré des corrélations négatives avec l'hydroxylation de l'acide rétinoïque (Doyon *et al.*, 1999). En d'autres mots, les individus qui avaient les plus faibles réserves en rétinoïdes avaient aussi les plus forts taux d'hydroxylation de l'acide rétinoïque. Cette situation est l'inverse de celle qui se produit chez les mammifères lors de changements alimentaires. Chez l'humain, la consommation d'un repas riche en rétinoïdes augmente les métabolites oxydatifs de l'acide rétinoïque dans le plasma

(Arnhold *et al.*, 1996), tandis qu'un régime alimentaire faible en vitamine A aurait l'effet de diminuer le métabolisme de l'acide rétinoïque (Napoli, 1996). Dans ce contexte, les résultats du métabolisme de l'acide rétinoïque et du stockage des rétinoïdes chez l'esturgeon jaune s'expliquent difficilement par des facteurs nutritifs. De plus, le fort taux de productivité primaire et de croissance chez l'esturgeon du fleuve (Fortin *et al.*, 1992) ne concorde pas avec un manque de nourriture ou de vitamine A dans l'alimentation.

Figure 5.4

Chromatogrammes par HPLC des extraits de foie d'esturgeons jaunes, *Acipenser fulvescens*, provenant du fleuve Saint-Laurent et de la région d'Abitibi

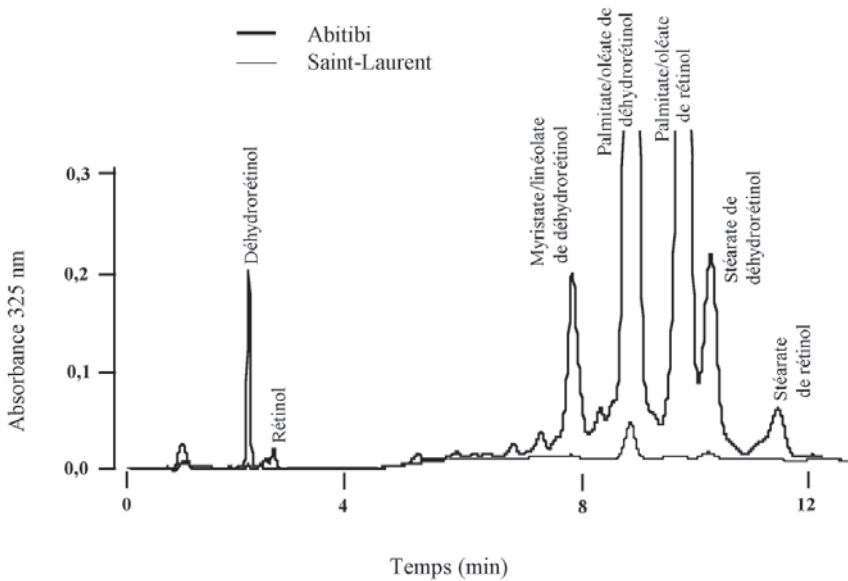
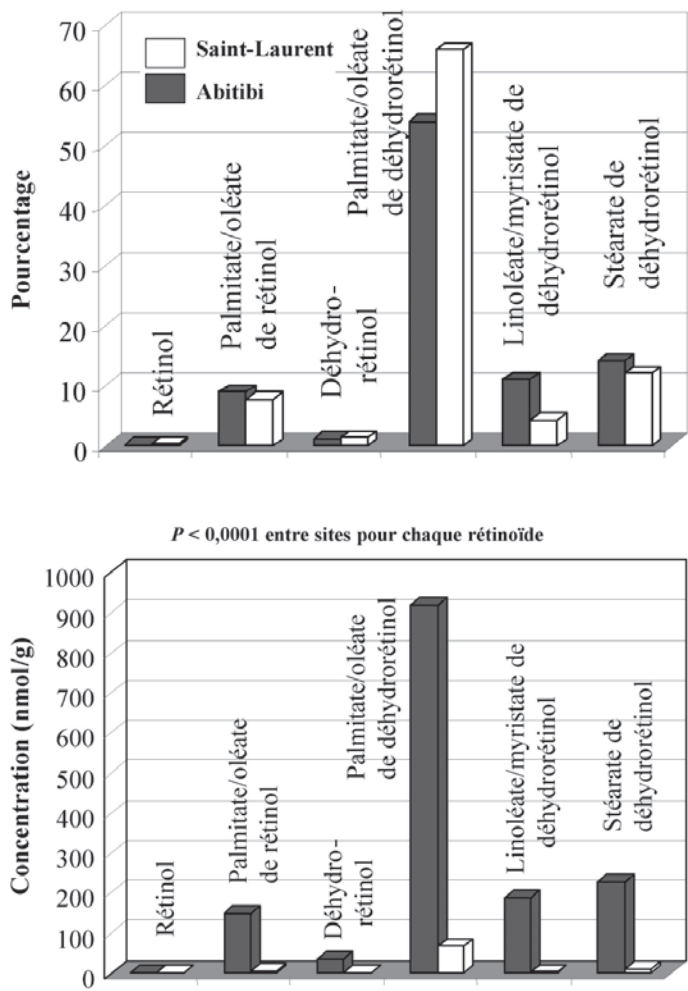


Figure 5.5

Proportions (A) et concentrations (B) de rétinoïdes hépatiques pour l'esturgeon jaune, *Acipenser fulvescens*, du fleuve Saint-Laurent et de la région d'Abitibi (site de référence)



5. CONCLUSION

Les dernières années ont vu se diversifier les recherches entreprises sur les rétinoïdes. Si les études concernant la nutrition ont été maintenues pour des raisons évidentes, l'implication des rétinoïdes pour la santé des humains comme pour celle des animaux constitue un créneau de recherche particulier. Pratiquement chaque forme de rétinoïde a son bataillon de chercheurs spécialisés et les connaissances acquises dans tous les axes alimentent le vaste réseau représenté par le système des rétinoïdes.

En tant que biomarqueurs, les rétinoïdes ont apporté une contribution non négligeable. On a beaucoup mis l'accent sur les formes de stockage de rétinoïdes, le rétinol et le palmitate de rétinol. Les déséquilibres de ces rétinoïdes, mis en relation avec des contaminants environnementaux, représentent la base de leur utilisation comme biomarqueurs. Le fait que les contaminants organochlorés puissent altérer ces formes de stockage et les enzymes qui leurs sont associées est une avenue qui demande à être explorée davantage.

Les œufs des poissons, des amphibiens et des oiseaux offrent un matériel plus qu'intéressant pour l'utilisation des rétinoïdes stockés comme biomarqueurs. Leur utilisation se traduit par un moindre impact sur les populations animales et l'étude du métabolisme des rétinoïdes *in vivo* devrait mener à des découvertes importantes sur la régulation de ce système au tout début de la vie embryonnaire.

Enfin les biomarqueurs sanguins à base de rétinoïdes sont les plus prometteurs. Le prélèvement sanguin peut faire partie d'un protocole expérimental non effractif tout en emboîtant le pas à un axe de recherche très dynamique : l'acide rétinoïque et ses dérivés. Des méthodes d'analyse perfectionnées permettront bientôt de mesurer différentes formes de rétinoïdes biologiquement actives dans le sang et d'avoir un portrait relativement fidèle de l'état de santé des animaux qui peuplent les écosystèmes. N'est-ce pas là le but de tout programme de biosurveillance ?

RÉFÉRENCES

- ABU-ABED, S.S., B.R. BECKETT, H. CHIBA, J.V. CHITHALEN, G. JONES, D. METZGER, P. CHAMBON et M. PETKOVICH (1998). « Mouse P450RAI (CYP26) expression and retinoic acid-inducible retinoic acid metabolism in F9 cells are regulated by retinoic acid receptor γ and retinoid X receptor α », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, p. 2409-2415.
- ALEXANDRE, D., J.D.W. CLARKE, E. OXTOBY, Y.L. YAN, T. JOWETT et N. HOLDER (1996). « Ectopic expression of Hoxa-1 in the zebrafish alters the fate of the mandibular arch neural crest and phenocopies a retinoic acid-induced phenotype », *Development*, vol. 122, p. 735-746.
- ANKLEY, G.T., J.E. TIETGE, D.L. DEFOE, K.M. JENSEN, G.W. HOLCOMBE, E.J. DURHAM et S.A. DIAMOND (1998). « Effects of ultraviolet light and methoprene on survival and development of *Rana pipiens* », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 17, p. 2530-2542.
- ARCAND-HOY, L.D. et C.D. METCALFE (1999). « Biomarkers of exposure of brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) to contaminants in the lower Great Lakes, North America », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 18, p. 740-749.
- ARNHOLD, T., G. TZIMAS, G. WITFOHT, S. PLONAIT et H. NAU (1996). « Identification of 9-*cis*-retinoic acid, 9,13-di-*cis*-retinoic acid, and 14-hydroxy-4,14-*retro*-retinol in human plasma after liver consumption », *Life Sciences*, vol. 59, p. PL69-PL177.
- BACKES, W.L., R.F. KRAUSE et W.J. CANADY (1979). « Observations relating phenobarbital induction of cytochrome P-450 to the obligatory destruction or release of vitamin A », *Nutritional Reports International*, vol. 119, p. 9-14.
- BANK, P.A., K.L. SALYERS et M.H. ZILE (1989). « Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on the glucuronidation of retinoic acid in the rat », *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 993, p. 1-6.
- BARUA, A.B. (1978). « Biosynthesis of dehydroretinol », *World Review of Nutrition and Dietetics*, vol. 31, p. 89-94.
- BARUA, A.B. et H.C. FURR (1998). « Properties of retinoids: Structure, handling and preparation », *Molecular Biotechnology*, vol. 10, p. 167-182.
- BAUMANN, C.A., E.G. FOSTER et P.S. LAVIK (1941). « The effect of certain carcinogens on vitamin A in the liver », *Journal of Nutrition*, vol. 21, p. 431-444.
- BECKETT, B.R. et M. PETKOVICH (1999). « Evolutionary conservation in retinoid signalling and metabolism », *American Zoology*, vol. 39, p. 783-795.
- BERGERON, J. et J. BROUSSEAU (1982). *Guide des poissons d'eaux douces du Québec*, Québec, Ministère du Loisir, et la Chasse et de la Pêche, Direction générale de la faune.
- BESSELINK, H.T., E.M.T.E. FLIPSEN, M.L. EGGENS, A.D. VETHAAK, J.H. KOEMAN et A. BROUWER (1998). « Alterations in plasma and hepatic retinoid levels in flounder (*Platichthys flesus*) after chronic exposure to contaminated harbour sludge in a mesocosm study », *Aquatic Toxicology*, vol. 42, p. 271-285.
- BESSELINK, H.T., S. VAN BEUSEKOM, E. ROEX, A.D. VETHAAK, J.H. KOEMAN et A. BROUWER (1996). « Low hepatic 7-ethoxyresorufin-*O*-de-ethylase (EROD) activity and minor alterations in retinoid and thyroid hormone levels in flounder (*Platichthys flesus*) exposed to the polychlorinated biphenyl (PCB) mixture, Clophen A50 », *Environmental Pollution*, vol. 92, p. 267-274.
- BILODEAU, A. (1996). *Modulation du métabolisme hépatique de l'acide rétinoïque chez la caille japonaise (Coturnix coturnix japonica) par les biphényles polychlorés*, mémoire de maîtrise, Montréal, Université du Québec à Montréal.
- BISHOP, C.A., N.A. MAHONY, S. TRUDEAU et K.E. PETTIT (1999). « Reproductive success and biochemical effects in tree swallows (*Tachycineta bicolor*) exposed to chlorinated hydrocarbon contaminants in wetlands of the Great Lakes and St. Lawrence River basin, USA and Canada », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 18, p. 263-271.

- BITMAN, J., H.C. CECIL et S.J. HARRIS (1972). « Biological effects of polychlorinated biphenyls in rats and quail », *Environmental Health Perspectives*, vol. 1, p. 145-149.
- BLOMHOFF, R., M.H. GREEN, J.B. GREEN, T. BERG et K.R. NORUM (1991). « Vitamin A metabolism: New perspectives on absorption, transport, and storage », *Physiological Reviews*, vol. 71, p. 951-990.
- BOERSMA, D.C., J.A. ELLENTON et A. YAGMINAS (1986). « Investigation of hepatic mixed-function oxidase system in Herring Gull embryos in relation to environmental contaminants », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 5, p. 309-318.
- BOILY, M. (2000). *Effets des BPC sur les rétinoïdes de l'œuf et sur les activités d'hydrolyse et d'estérification du sac vitellin chez la caille japonaise (Coturnix coturnix japonica)*, thèse de doctorat, Montréal, Université du Québec à Montréal.
- BOILY, M.H., L. CHAMPOUX, D.H. BOURBONNAIS, J.L. DESGRANGES, J. RODRIGUE et P.A. SPEAR (1994). « β -carotene and retinoids in eggs of Great Blue Herons (*Ardea herodias*) in relation to St. Lawrence River contamination », *Ecotoxicology*, vol. 3, p. 271-286.
- BOILY, M.H., A. NDAYIBAGIRA et P.A. SPEAR (2003a). « Retinoids, LRAT and REH activities in eggs of Japanese quail following maternal exposure to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl », *Ecotoxicology*, vol. 12, p. 9-21.
- BOILY, M.H., A. NDAYIBAGIRA et P.A. SPEAR (2003b). « Retinoid metabolism (LRAT, REH) in the yolk-sac membrane of Japanese quail eggs and effects of mono-ortho-PCBs », *Comparative Biochemistry and Physiology C*, vol. 134, p. 11-23.
- BOYER, P.M., A. NDAYIBAGIRA et P.A. SPEAR (2000). « Dose-dependent stimulation of hepatic retinoic acid hydroxylation/oxidation and glucuronidation in brook trout, *Salvelinus fontinalis*, after exposure to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 19, p. 700-705.
- BRANCHAUD, A. (1993). *Étude écotoxicologique de la vitamine A et des malformations chez le meunier noir*, mémoire de maîtrise, Montréal, Université du Québec à Montréal.
- BRANCHAUD, A., A. GENDRON, R. FORTIN, P.D. ANDERSON et P.A. SPEAR (1995). « Vitamin A stores, teratogenesis, and EROD activity in white sucker, *Catostomus commersoni*, from Rivière des Prairies near Montréal and a reference site », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, vol. 52, p. 1703-1713.
- BROCHU, C., G. HAMELIN, S. MOORE, D. LALIBERTÉ et Y.D. LAFONTAINE (1995). « Contribution of PCDD/PCDFs, planar and ortho substituted PCB congeners to the total TCDD-equivalent concentration in fish fillet from the St. Lawrence River », *Organohalogen Compounds*, vol. 26, p. 293-298.
- BROUWER, A., P.J.H. REIJNDERS et J.H. KOEMAN (1989). « Polychlorinated biphenyl (PCB)-contaminated fish induces vitamin A and thyroid hormone deficiency in the common seal (*Phoca vitulina*) », *Aquatic Toxicology*, vol. 15, p. 99-106.
- BROUWER, A. et K.J. VAN DEN BERG (1986). « Binding of a metabolite of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl to transthyretin reduces serum vitamin A transport by inhibiting the formation of the protein complex carrying both retinol and thyroxine », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 85, p. 301-312.
- BROWN, S.B., P.D. DELORME, R.E. EVANS, W.L. LOCKHART, D.C.G. MUIR et F.J. WARD (1998). « Biochemical and histological responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 17, p. 915-921.
- BROWN, S.B., A.T. FISK, M. BROWN, M. VILLELLA, D.C.G. MUIR, R.E. EVANS, W.L. LOCKHART, D.A. METNER et H.M. COOLEY (2002). « Dietary accumulation and biochemical responses of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) », *Aquatic Toxicology*, vol. 59, p. 139-152.
- BURLEY, R.W. et D.V. VADEHRA (1989). *The Avian Egg: Chemistry and Biology*, New York, John Wiley and Sons.
- CECIL, H.C., S.J. HARRIS, J. BITMAN et G.F. FRIES (1973). « Polychlorinated biphenyl-induced decrease in liver vitamin A in Japanese quail and rats », *Bulletin of Environmental Toxicology*, vol. 9, p. 179-185.

- CHAMBON, P. (1966). « A decade of molecular biology of retinoic acid receptors », *Journal of the Federation of the American Societies of Experimental Biology*, vol. 10, p. 940-954.
- CHAMPOUX, L. et al. (2000). *Évaluation d'indicateurs biochimiques chez le Grand héron, Ardea herodias, et le Bihoreau gris, Nycticorax nycticorax, en relation avec la contamination du Saint-Laurent*, Série de rapports techniques n° 354, Région du Québec 2000, Québec, Service canadien de la faune.
- CHRISTIANSEN, R., O. LIE et O.J. TORRISSEN (1994). « Effect of astaxanthin and vitamin A on growth and survival during first feeding of Atlantic salmon, *Salmo salar* L », *Aquaculture and Fisheries Management*, vol. 25, p. 903-914.
- CLAGETT-DAME, M. et L.A. PLUM (1997). « Retinoids-regulated gene expression in neural development », *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, vol. 7, p. 299-342.
- DARJONO, S.D. SLEIGHT, H.D. STOWE et S.D. AUST (1983). « Vitamin A status, brominated biphenyl (PBB) toxicosis, and common bile duct hyperplasia in rats », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 71, p. 184-193.
- DAVISON, A., E. ROUSSEAU et B. DUNN (1993). « Putative anticarcinogenic actions of carotenoids : Nutritional implications », *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 71, p. 732-745.
- DE BOECK, S., T. RYMEN et J. STOCKX (1975). « Adenosine deaminase in chicken », *European Journal of Biochemistry*, vol. 52, p. 191-195.
- DEGUISE, S., A. LAGACÉ, P. BÉLAND, C. GIRARD et R. HIGGINS (1995). « Non-neoplastic lesions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) and other marine mammals from the St. Lawrence Estuary », *Journal of Comparative Pathology*, vol. 112, p. 257-271.
- DERSCHE, H. et M.H. ZILE (1993). « Induction of normal cardiovascular development in the vitamin A-deprived quail embryo by natural retinoids », *Developmental Biology*, vol. 160, p. 424-433.
- DOYON, C., S. BOILEAU, R. FORTIN et P.A. SPEAR (1998). « Rapid HPLC analysis of retinoids and dehydroretinoids stored in fish liver : Comparison of two lake sturgeon populations », *Journal of Fish Biology*, vol. 53, p. 973-986.
- DOYON, C., R. FORTIN et P.A. SPEAR (1999). « Retinoic acid hydroxylation and teratogenesis in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) from the St. Lawrence River and Abitibi region, Quebec », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, vol. 56, p. 1428-1436.
- DRAPEAU, J.-P. (1990). « Des animaux malades du fleuve », *Franc-nord*, vol. 7, p. 16-21.
- DUESTER, G. (1996). « Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis », *Biochemistry*, vol. 35, p. 12221-12227.
- DUMONT, P., R. FORTIN, G. DESJARDINS et M. BERNARD (1987). « Biology and exploitation of lake sturgeon in the Québec waters of the Saint-Laurent River », dans C.H. Oliver, (dir.), *Proceedings of a Workshop on the Lake Sturgeon (Acipenser fulvescens)*, Toronto, Ontario Fisheries Technical Report Series no. 23, p. 57-76.
- EICHELE, G., C. TICKLE et B.M. ALBERTS (1985). « Studies on the mechanism of retinoid-induced pattern duplications in the early chick limb bud : Temporal and spatial aspects », *Journal of Cell Biology*, vol. 101, p. 1913-1920.
- ELLENTON, J.A., L.J. BROWNEE et B.R. HOLLEBONE (1985). « Aryl hydrocarbon hydroxylase levels in Herring gull embryos from different locations on the Great Lakes », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 4, p. 615-622.
- EVANS, M.E. (1988). « The steroid and thyroid hormone superfamily », *Science*, vol. 240, p. 889-895.
- FIORIELLA, P.D., J.R. OLSON et J.L. NAPOLI (1995). « 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induces diverse retinoic acid metabolites in multiple tissues of the Sprague-Dawley rat », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 134, p. 222-228.

- FORTIN, R., S. GUÉNETTE et P. DUMONT (1992). *Biologie, exploitation, modélisation et gestion des populations d'esturgeon jaune (Acipenser fulvescens) dans 14 réseaux de lacs et de rivières du Québec*, rapport de recherche, Québec, Ministère du Loisir, de la Chasse et de la Pêche, Service de l'aménagement et de l'exploitation de la faune, et Service de la faune aquatique.
- FORTIN, R., J.-R. MONGEAU, G. DESJARDINS et P. DUMONT (1993). « Movements and biological statistics of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) populations from the St. Lawrence and Ottawa River system, Québec », *Canadian Journal of Zoology*, vol. 71, p. 638-650.
- FOX, G.A., S.W. KENNEDY, R.J. NORSTROM et D.C. WIGFIELD (1988). « Porphyria in herring gulls: A biochemical response to chemical contamination of Great Lakes food chains », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 7, p. 831-839.
- FROLIK, C.A. (1984). « Metabolism of retinoids », dans M.B. Sporn *et al.* (dir.), *The Retinoids*, Montréal, Academic Press, p. 177-209.
- GANGULY, J. (1989). *Biochemistry of Vitamin A*, Boca Raton, FL, CRC Press.
- GIGUÈRE, V., E.S. ONG, P. SEGUI et R.M. EVANS (1987). « Identification of the receptor for the morphogen retinoic acid », *Nature*, vol. 330, p. 624-629.
- GILBERT, N.L., M.-J. CLOUTIER et P.A. SPEAR (1995). « Retinoic acid hydroxylation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the effect of a coplanar PCB, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl », *Aquatic Toxicology*, vol. 32, p. 177-187.
- GILBERTSON, M., T.J. KUBIAK, J.P. LUDWIG et G.A. FOX (1991). « Great Lakes embryo mortality, edema, and deformities syndrome (GLEMEDS) in colonial fish-eating birds: Similarity to chick-edema disease », *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 33, p. 455-520.
- GODA, T., S. FURUTA et S. TAKASE (1993). « Dietary vitamin A modulates lecithin-retinol acyltransferase activity in developing chick intestine », *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1168, p. 153-157.
- GOERNER, A. et M. GOERNER (1939a). « The influence of a carcinogenic compound on the hepatic storage of vitamins », *Journal of Nutrition*, vol. 18, p. 441-446.
- GOERNER, A. et M. GOERNER (1939b). « The effect of dibenzanthracene on the liver », *American Journal of Cancer*, vol. 37, p. 518-520.
- GOODMAN, D.S. et W.S. BLANER (1984). « Biosynthesis, absorption and hepatic metabolism of retinol », dans M.B. Sporn *et al.* (dir.), *The Retinoids*, Toronto, Academic Press, vol. 2, p. 2-39.
- GOSWAMI, U.C. et A.B. BARUA (1981). « Distribution of retinol and dehydroretinol in freshwater fish », *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, vol. 18, p. 383-385.
- GOYETTE, D. *et al.* (1987). *Maturité sexuelle et périodicité de la reproduction chez la femelle de l'esturgeon jaune (Acipenser fulvescens) du fleuve Saint-Laurent*, rapport de travail 06-02, Québec, Ministère du Loisir, de la Chasse et de la Pêche, Service de l'aménagement et de l'exploitation de la faune.
- GRANGAUD, R., R. MASSONET et H. LARROQUE (1949). « Sur la teneur en vitamine A des viscères de *Merluccius vulgaris* », *Comptes rendus de la Société de biologie*, vol. 143, p. 1181-1184.
- GRASMAN, K.A., G.A. FOX, P.F. SCANLON et J.P. LUDWIG (1996). « Organochlorine-associated immunosuppression in prefledgling Caspian terns and Herring gulls from the Great Lakes: An ecopidemiological study », *Environmental Health Perspectives*, vol. 104, p. S829-842.
- GROSS, J. et P. BUDOWSKI (1966). « Conversion of carotenoids into vitamins A1 and A2 in two species of freshwater fish », *Biochemical Journal*, vol. 101, p. 747-754.
- GUDAS, L.J., M.B. SPORN et A.B. ROBERTS (1994). « Cellular biology and biochemistry of the retinoids », dans M.B. Sporn *et al.* (dir.), *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*, New York, Raven Press, p. 443-520.

- GUÉNETTE, S., R. FORTIN et E. RASSART (1993). « Mitochondrial DNA variation in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) from the St. Lawrence River and James Bay drainage basins in Québec, Canada », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, vol. 50, p. 659-664.
- GUPTA, P.K. et K.V. SHASTRY (1981). « Effect of mercuric chloride on enzyme activities in the digestive system and chemical composition of the liver and muscles of the catfish, *Heteropneustes fossilis* », *Ecotoxicological Environmental Safety*, vol. 5, p. 389-400.
- GUTLEB, A.C., J. APPELMAN, M.C. BRONKHORST, J.H.J. VAN DEN BERG, A. SPENKELINK, A. BROUWER et A.J. MURK (1999). « Delayed effects of pre- and early-life time exposure to polychlorinated biphenyls on tadpoles of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*) », *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 8, p. 1-14.
- HAKANSSON, H., E. MANZOOR et U.G. AHLBORG (1992). « Effects of technical PCB preparations and fractions thereof on vitamin A levels in the mink (*Mustela vison*) », *Ambio*, vol. 21, p. 588-590.
- HAMILTON, H.L. (1965). *Lilli's Development of the Chick*, New York, Holt, Rinehart and Winston.
- HANBERG, A. (1996). *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin affects retinol esterification in rat hepatic stellate cells and kidney. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on vitamin A storage in rat hepatic stellate cells*, thèse de doctorat, Stockholm, Institute of Environmental Medicine.
- HANBERG, A., C.B. NILSSON, C. TROSSVIK et H. HAKANSSON (1998). « Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the lymphatic absorption of a single oral dose of [3H]retinol and on the intestinal retinol esterification in the rat », *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 55, p. 331-344.
- HARMON, M.A., M.F. BOEHM, R.A. HEYMAN et D.J. MANGELSDORF (1995). « Activation of mammalian retinoid X receptors by the insect growth regulator methoprene », *Proceedings of the National Academy of Science USA*, vol. 92, p. 6157-6160.
- HARRISON, E.H. (1993). « Enzymes catalyzing the hydrolysis of retinyl ester », *Biochimica Biophysica Acta*, vol. 1170, p. 99-108.
- HEINRICH-HIRSCH, B., D. HORMANN, J. WEBB, et D. NEUBERT (1990). « Activity of aldrin epoxidase, 7-ethoxycoumarin-O-deethylase and 7-ethoxyresorufin-O-deethylase during the development of chick embryos in ovo », *Archives of Toxicology*, vol. 64, p. 128-134.
- HENRIKSEN, E.O., G.W. GABRIELSEN, S. TRUDEAU, J. WOLKERS, K. SAGERUP et J.U. SKAARE (2000). « Organochlorines and possible biochemical effects in glaucous gulls (*Larus hyperboreus*) from Bjornoya, the Barents Sea », *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, vol. 38, p. 234-243.
- HERR, F.M. et D.E. ONG (1992). « Differential interaction of lecithin-retinol acyltransferase with cellular retinol binding proteins », *Biochemistry*, vol. 31, p. 6748-6755.
- HILL, J., J.D.W. CLARKE, N. VARGESSON, T. JOWETT et N. HOLDER (1995). « Exogenous retinoic acid causes alterations in the development of the hindbrain and midbrain of the zebrafish embryo including positional respecification of the Mauthner neuron », *Mechanisms of Development*, vol. 50, p. 3-16.
- HILTON, J.W. (1983). « Hypervitaminosis A in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): Toxicity signs and maximum tolerable level », *Journal of Nutrition*, vol. 113, p. 1737-1745.
- HOFMANN, C. et G. EICHELE (1994). « Retinoids in development », dans M.B. Sporn *et al.* (dir.), *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*, New York, Raven Press, p. 387-441.
- INNAMI, S., A. NAKAMURA et S. NAGAYAMA (1974). « Polychlorobiphenyl toxicity and nutrition: II PCB toxicity and vitamin A₂ », *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, vol. 20, p. 363-370.

- IVERSON, F., R. MEHTA, L. HIERLIHY, S. GUROFSKY, E. LOK, R. MUELLER, D.H. BOURBONNAIS et P.A. SPEAR (1998). « Microsomal activity, glutathione S-transferase-placental form expression, cell proliferation, and vitamin A stores in livers of rats consuming Great Lakes salmon », *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 27, p. S76-S89.
- JEFFRIES, D.J. et M.C. FRENCH (1971). « Hyper- and hypothyroidism in pigeons fed DDT : An explanation for the thin egg shell phenomenon », *Environmental Pollution*, vol. 1, p. 235-242.
- JENSEN, R.K., S.N. MATHUR, S.K. MURTHY et J. GANGULY (1987). « Vitamin A metabolism in rats chronically treated with 3,3',4,4',5,5'-hexabromobiphenyl », *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 926, p. 310-320.
- JENSSEN, B.M., J.U. SKAARE, S. WOLDSTAD, A.T. NASTAD, O. HAUGEN, B. KLOVEN et E.G. SORMO (1995). « Biomarkers in blood to assess the effects of polychlorinated biphenyls in free-living grey seal pups », dans A.S. Blix *et al.* (dir.), *Whales, Seals, Fish and Man*, Amsterdam, Elsevier Science, p. 607-615.
- JOSHI, P.S., S.N. MATHUR, S.K. MURTHY et J. GANGULY (1973). « Vitamin A economy of the developing chick embryo and the freshly hatched chick », *Biochemical Journal*, vol. 136, p. 757-761.
- JUREK, M.A., R.H. POWERS, L.G. GILBERT et S.D. AUST (1990). « The effect of TCDD on Acyl CoA : Retinol acyltransferase activity and vitamin A accumulation in the kidney of male Sprague-Dawley rats », *Journal of Biochemical Toxicology*, vol. 5, p. 155-160.
- KÄKELÄ, R., A. KÄKELÄ, H. HYVÄRINEN, J. ASIKAINEN et S.-K. DAHL (1999). « Vitamins A, A₂ and E in minks exposed to polychlorinated biphenyls (Aroclor 1242) and copper, via diet based on freshwater or marine fish », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 18, p. 2595-2599.
- KAMM, J.J., K.O. ASHENFELDER et C.W. EHMANN (1984). « Preclinical and clinical toxicology of selected retinoids », dans M.B. Sporn *et al.* (dir.), *The Retinoids*, Montréal, Academic Press, vol. 2, p. 288-326.
- KESHAVAN, R. et P.B. DESHMUKH (1984). « Vitamin A concentrations in liver and serum of the frog, *Rana tigrina*, treated with DDT and Sevin », *Indian Journal of Comparative Animal Physiology*, vol. 2, p. 32-36.
- LEO, M.A., J.M. LASKER, J.L. RAUCY, C.-I. KIM, M. BLACK et C.S. LIEBER (1989). « Metabolism of retinol and retinoic acid by human liver cytochrome P450IIC8 », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 269, p. 305-312.
- LEO, M.A., A.S. ROSMAN et C.S. LIEBER (1993). « Differential depletion of carotenoids and tocopherol in liver disease », *Hepatology*, vol. 17, p. 977-986.
- LÉVESQUE, F. et C. POMERLEAU (1986). *Contamination de certaines espèces de la faune aquatique et amphibienne du lac Saint-Pierre par des biphényles polychlorés, le mirex et le mercure*, rapport technique 86-01, Québec, Ministère du Loisir, de la Chasse et de la Pêche, Direction de la faune aquatique.
- LEVIN, M.S., E. LI, D.E. ONG et J.I. GORDON (1987). « Comparison of the tissue-specific expression and developmental regulation of two closely linked rodent genes encoding cytosolic retinol-binding proteins », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 262, p. 7118-7124.
- LIPPEL, K. et J.A. OLSON (1968). « Biosynthesis of β -glucuronides of retinol and retinoic acid *in vivo* and *in vitro* », *Journal of Lipid Research*, vol. 9, p. 168-175.
- LU, H.C., C. THALLER et G. EICHELE (1999). « The role of retinoids in vertebrate limb morphogenesis : Integration of retinoid- and cytokine-mediated signal transduction », dans H. Nau et W.S. Blaner (dir.), *Handbook of Experimental Pharmacology : Retinoids, the Biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoid Action*, Heidelberg, Springer-Verlag, Vol. 139, p. 369-398.

- LUDWIG, J.P., H. KURITA-MATSUBA, H.J. AUMAN, M.E. LUDWIG, C.L. SUMMER, J.P. GIESY, D.E. TILLITT et P.D. JONES (1996). « Deformities, PCBs, and TCDD-equivalents in double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) and Caspian terns (*Hydroprogne caspia*) of the Upper Great Lakes 1986-1991 : Testing a cause-effect hypothesis », *Journal of Great Lakes Research*, vol. 22, p. 172-197.
- LUO, J., H.M. SUCOV, J. BADER, R.M. EVANS et V. GIGUÈRE (1996). « Compound mutants for retinoic acid receptor RAR β and RAR α 1 reveal developmental functions for multiple RAR β isoforms », *Mechanisms of Development*, vol. 55, p. 33-44.
- MAC, M.J. et M. GILBERTSON (1990). « Executive summary », dans *Proceedings of Roundtable on Contaminant-caused Reproductive Problems in Salmonids*, compte rendu du colloque tenu à Windsor, 14-15 sept., International Joint Commission.
- MADEN, M., E. SONNEVELD, P.T. VAN DER SAAG et E. GALE (1998). « The distribution of endogenous retinoic acid in the chick embryo : Implications for developmental mechanisms », *Development*, vol. 125, p. 4133-4144.
- MADEN, M. (1999). « Retinoids in neural development », dans H. Nau et W.S. Blaner (dir.), *Handbook of Experimental Pharmacology : Retinoids, the Biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoid Action*, Heidelberg, Springer-Verlag, vol. 139, p. 399-442.
- MANGELSDORF, D.J., K. UMESONO et R.M. EVANS (1994). « The retinoid receptors », dans M.B. Sporn et al. (dir.), *The Retinoids : Biology, Chemistry and Medicine*, New York, Raven Press, p. 319-349.
- MARSHALL, H., A. MORRISON, M. STUDER, H. PÖPPERL et R. KRUMLAUF (1996). « Retinoids and HOX genes », *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 10, p. 969-978.
- MARTINEAU, D., P. BÉLAND, C. DESJARDINS et A. LAGACÉ (1987). « Levels of organochlorine chemicals in tissues of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence Estuary, Québec, Canada », *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 16, p. 137-147.
- MARTINEAU, D., A. LAGACÉ, P. BÉLAND, R. HIGGINS, D. ARMSTRONG et R.L. SHUGART (1988). « Pathology of stranded beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence estuary, Québec », *Canadian Journal of Comparative Pathology*, vol. 98, p. 287-311.
- MARTINI, R. et M. MURRAY (1993). « Participation of P450 3A enzymes in rat hepatic microsomal retinoic acid 4-hydroxylation », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 303, p. 57-66.
- MATSUURA, T. et C. ROSS (1993). « Regulation of hepatic lecithin : Retinol acyltransferase activity by retinoic acid », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 301, p. 221-227.
- MATSUURA, T., Z. ZHAO et A.C. ROSS (1996). « N-(4-hydroxyphenyl-retinamide) increases lecithin : Retinol acyltransferase activity in rat liver », *Journal of Nutrition*, vol. 126, p. 2464-2480.
- MERCIER, M., G. PASCAL et V. AZAÏS-BRAESCO (1990). « Retinyl ester hydrolase and vitamin A status in rats treated with 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl », *Biochimica Biophysica Acta*, vol. 1047, p. 70-76.
- Mineau, P., G.A. FOX, R.J. NORSTROM, D.V. WESELOH, D.J. HALLETT et J.A. ELLENTON (1984). « Using the herring gull to monitor levels and effects of organochlorine contamination in the Canadian Great Lakes », dans J.O. Nriagu et M.S. Simmons (dir.), *Toxic Contaminants in the Great Lakes*, Toronto, John Wiley and Sons, p. 437-452.
- MOORE, T. (1957). *Vitamin A*, New York, Elsevier.
- MORRIS-KAY, G.M., P. MURPHY, R. HILL et D. DAVIDSON (1991). « Effects of retinoic acid excess on expression of *Hox-2.9* and *Krox-20* and on morphological segmentation of the hindbrain of mouse embryos », *European Molecular Biology Organisation Journal*, vol. 10, p. 2985-2995.
- MUINDI, J.F. et C.W. YOUNG (1993). « Lipid hydroperoxides greatly increase the rate of oxidative catabolism of all-*trans*-retinoic acid by human cell culture microsomes genetically enriched in specified cytochrome P-450 isoforms », *Cancer Research*, vol. 53, p. 1226-1229.

- MURK, A.J., A.T.C. BOSVELD, M. VAN DEN BERG et A. BROUWER (1994a). « Effects of polyhalogenated aromatic hydrocarbons (PHAHs) on biochemical parameters in chicks of the common tern (*Sterna hirundo*) », *Aquatic Toxicology*, vol. 30, p. 91-115.
- MURK, A.J., J.H.J. VAN DEN BERG, M. FELLINGER, M.J.C. ROZENMEIJER, C. SWENNEN, P. DUIVEN, J.P. BOON, A. BROUWER et J.H. KOEMAN (1994b). « Toxic and biochemical effects of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB-77) and Clophen A50 on eider ducklings (*Somateria mollissima*) in a semi-field experiment », *Environmental Pollution*, vol. 80, p. 21-30.
- MURK, A.J., T.J. BOUDEWIJN, P.L. MEININGER, A.T.C. BOSVELD, G. ROSSAERT, T. YSEBAERT, P. MEIRE et S. DIRKSEN (1996). « Effects of polyhalogenated aromatic hydrocarbons and related contaminants on common tern reproduction: Integration of biological, biochemical, and chemical data », *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 31, p. 128-140.
- MURVOLL, K.M., J.U. SKAARE, V.H. NILSEN, C. BECH, J.E. OSTNES et B.M. JENSSEN (1999). « Yolk PCB and plasma retinol concentrations in shag (*Phalacrocorax aristotelis*) hatchlings », *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 36, p. 308-315.
- NACCI, D., L. COIRO, A. KUHN, D. CHAMPLIN, S. JAYARAMAN, R. MCKINNEY, T.R. GLEASON, W. MUNNS, J. SPECKER et K. COOPER (1999). « Adaptations of wild populations of the marine fish *Fundulus heteroclitus* to persistent environmental contaminants », *Marine Biology*, vol. 134, p. 9-17.
- NACCI, D., S. JAYARAMAN et J. SPECKER (2001). « Stored retinoids in populations of the estuarine fish *Fundulus heteroclitus* indigenous to PCB-contaminated and reference sites », *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 40, p. 511-518.
- NADIN, L. et M. MURRAY (1999). « Participation of CYP2C8 in retinoic acid 4-hydroxylation in human hepatic microsomes », *Biochemical Pharmacology*, vol. 58, p. 1201-1208.
- NAPOLI, J.L. (1996). « Retinoic acid biosynthesis and metabolism », *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 10, p. 993-1001.
- NAPOLI, J.L. et C.D. BECK (1984). « α -Tocopherol and phyloquinone as non-competitive inhibitors of retinyl ester hydrolysis », *Biochemical Journal*, vol. 223, p. 267-270.
- NAPOLI, J.L., A.M. MCCORMICK, B. O'MEARA et E.A. DRATZ (1984). « Vitamin A metabolism: α -tocopherol modulates tissue retinol levels *in vivo*, and retinyl palmitate hydrolysis *in vitro* », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 230, p. 194-202.
- NARBONNE, J.-F., P. GROLIER, R. ALBRECHT, V. AZIAS, F. OESCH et L.W. ROBERTSON (1990). « A time course investigation of vitamin A level and lipid composition of the liver endoplasmic reticulum in rats following treatment with congeneric polychlorobiphenyls », *Toxicology*, vol. 60, p. 253-261.
- NDAYIBAGIRA, A., M.-J. CLOUTIER, P.D. ANDERSON et P.A. SPEAR (1995). « Effects of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl on the dynamics of vitamin A in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and intestinal retinoid concentrations in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, vol. 52, p. 512-520.
- NDAYIBAGIRA, A. et P.A. SPEAR (1999). « Esterification and hydrolysis of vitamin A in liver of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the influence of a coplanar polychlorinated biphenyl », *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, vol. 122, p. 317-325.
- NEEDHAM, J. (1963). *Chemical Embryology*, vols I, II, III, New York, Hafner Publishing Company.
- NILSSON, C.B., A. HANBERG, C. TROSSVIK et H. HÅKANSSON (1996). « 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin affects retinol esterification in rat hepatic stellate cells and kidney », *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 2, p. 17-23.
- NILSSON, C.B., P. HOEGBERG, C. TROSSVIK, V. AZAÏS-BRAESCO, W.S. BLANER, G. FEX, E.H. HARRISON, H. NAU, C.K. SCHMIDT, A.M. VAN BENNEKUM, A.M. et H. HÅKANSSON (2000). « 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin increases serum and kidney retinoic acid levels and kidney retinol esterification in the rat », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 169, p. 121-131.

- NOBLE, R.C. (1987). «Lipid metabolism in the chick embryo : Some recent ideas », *Journal of Experimental Zoology*, vol. 1, p. S65-S73.
- OLSON, J.A. (1983). « Formation and function of vitamin A », dans J.W. Porter et S.L. Spurgeon (dir.), *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*, New York, John Wiley and Sons, p. 371-412.
- OLSON, J.A. (1989). « Provitamin A function of carotenoids : The conversion of β -carotene into vitamin A », *Journal of Nutrition*, vol. 119, p. 105-108.
- OLSON, J.A. (1994). « Hypovitaminosis A : Contemporary scientific issues », *Journal of Nutrition*, vol. 124, p. 1461-1466.
- ONG, D.E., P.N. MACDONALD et A.M. GUBITOSI (1988). « Esterification of retinol in rat liver », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 263, p. 5789-5796.
- PALACE, V.P. et S.B. BROWN (1994). « HPLC determination of tocopherol, retinol, dehydroretinol and retinyl palmitate in tissues of lake char (*Salvelinus namaycush*) exposed to coplanar 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 13, p. 473-476.
- PALACE, V.P. et S.B. BROWN (1996). « Oxidative stress in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) orally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran », *Aquatic Toxicology*, vol. 35, p. 79-92.
- PALACE, V.P., C.L. BARON et J.F. KLAVERKAMP (1998a). « An assessment of Ah-inducible phase I and phase II enzymatic activities and oxidative stress indices in adult lake trout (*Salvelinus namaycush*) from Lake Ontario and Lake Superior », *Aquatic Toxicology*, vol. 42, p. 149-168.
- PALACE, V.P., S.B. BROWN, C.L. BARON, J. FITZSIMONS, B. WOODIN, J.J. STEGEMAN et J.F. KLAVERKAMP (1998b). « An evaluation of the relationships among oxidative stress, antioxidant vitamins and early mortality syndrome (EMS) of lake trout (*Salvelinus namaycush*) from Lake Ontario », *Aquatic Toxicology*, vol. 43, p. 195-208.
- PALACE, V.P., S.M. ALLEN-GIL, S.B. BROWN, R.E. EVANS, D.A. METNER, D.H. LANDERS, L.R. CURTIS, J.F. KLAVERKAMP, C.L. BARON et W.L. LOCKHART (2001). « Vitamin and thyroid status in Arctic grayling (*Thymallus arcticus*) exposed to doses of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl that induce the phase I enzyme system », *Chemosphere*, vol. 45, p. 185-193.
- PARRISH, D.B., R.N. WILLIAMS et P.E. SANFORD (1951). « The state of vitamin A in livers and unabsorbed yolks of embryonic and newly hatched chicks », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 34, p. 64-66.
- PAUL, M. et D. LALIBERTÉ (1988). *Teneurs en mercure, plomb, cadmium, BPC et pesticides organochlorés des sédiments et de chair de poissons du fleuve Saint-Laurent et de la rivière des Outaouais en 1985*, rapport technique QEN/QE-86-07, Québec, Ministère de l'Environnement du Québec.
- PAYNE, J.F., D.C. MALINS, S. GUNSELMAN, A. RAHIMTULA et P.A. YEATS (1998). « DNA oxidative damage and vitamin A reduction in fish from a large lake system in Labrador, Newfoundland, contaminated with iron-ore mine tailings », *Marine Environmental Research*, vol. 46, p. 289-294.
- PEAKALL, D.B., G.A. FOX, A.P. GILMAN, D.J. HALLETT et R.J. NORSTROM (1978). « The herring gull as a monitor of Great Lakes contamination », dans B.K. Afgan et D. Mackay (dir.), *Hydrocarbons and Halogenated Hydrocarbons in the Aquatic Environment*, Environmental Science Research, New York, Plenum Press, vol. 16, p. 337-344.
- PETKOVICH, M., N.J. BRAND, A. KRUST et P. CHAMBON (1987). « A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors », *Nature*, vol. 330, p. 444-450.
- PHILLIPS, W.E.J. (1963). « DDT and the metabolism of vitamin A and carotene in the rat », *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, vol. 41, p. 1793-1802.
- PIJNAPPEL, W.W.M., H.F.J. HENDRIKS, G.E. FOLKERS, C.E. VAN DEN BRINK, E.J. DEKKER, C. EDELENBOSCH, P.T. VAN DER SAAG et A.J. DURSTON (1993). « The retinoid ligand 4-oxo-retinoic acid is a highly active modulator of positional specification », *Nature*, vol. 366, p. 340-344.

- POWERS, R.H., L.C. GILBERT et S.D. AUST (1987). « The effect of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl on plasma retinol and hepatic retinyl palmitate hydrolase activity in female Sprague-Dawley rats », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 89, p. 370-377.
- POSTON, A., R.C. RIIS, G.L. RUMSEY et H.G. KETOLA (1977). « The effect of supplemental dietary amino acids, minerals and vitamins on salmonids fed cataractogenic diets », *Cornell Veterinarian*, vol. 67, p. 472-509.
- RANDOLPH, R.K., et R.C. ROSS (1991). « Vitamin A status regulates hepatic lecithin : Retinol acyltransferase activity in rats », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, p. 16453-16457.
- REPA, J.J., L.A. PLUM, P.K. TADIKONDA et M. CLAGETT-DAME (1996). « All-*trans*-3,4-didehydroretinoic acid equals all-*trans*-retinoic acid in support of chick neuronal development », *Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 10, p. 1078-1084.
- ROBERTS, A.B., M.D. NICHOLS, D.L. NEWTON et M.B. SPORN (1979). « *In vitro* metabolism of retinoic acid in hamster intestine and liver », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 254, p. 6296-6302.
- ROBERTS, A.B., L.C. LAMB et M.B. SPORN (1980). « Metabolism of all-*trans*-retinoic acid in hamster liver microsomes : Oxidation of 4-hydroxy- to 4-keto-retinoic acid », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 199, p. 374-383.
- ROBERTS, E.S., A.D.N. VAZ et M.J. COON (1992). « Role of isozymes of rabbit microsomal cytochrome P-450 in metabolism of retinoic acid, retinol and retinal », *Molecular Pharmacology*, vol. 41, p. 427-433.
- ROSS, A.C., D.T. FOULKE, T. MATSUURA, M. TRESINI, J.J. BREEN et J. A. GURR (1997). « Hepatic lecithin : Retinol acyltransferase activity is induced *in vivo* by retinoic acid, but not by triiodothyronine, in vitamin A-deficient, hypothyroid rats », *Nutritional Biochemistry*, vol. 8, p. 456-460.
- ROSS, S.A., P.J. MCCAFFERY, U.C. DRAGËR et L.M. DE LUCA (2000). « Retinoids in embryonal development », *Physiological Reviews*, vol. 80, p. 1021-1054.
- ROUSSEAU, C.G., A. BRANCHAUD et P.A. SPEAR (1995). « Evaluation of liver histopathology and EROD activity in St. Lawrence lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) in comparison with a reference population », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 14, p. 843-849.
- SCOFF, P.K. et G.T. ANKLEY (2002). « Inhibition of retinoid activity by components of a paper mill effluent », *Environmental Pollution*, vol. 119, p. 1-4.
- SCOTT, W.B. et E.J. CROSSMAN (1973). *Freshwater Fishes of Canada*, Ottawa, Fisheries Research Board of Canada, Bulletin 184.
- SHAW, S.D. (1998). *Organochlorines and Biomarkers of Immune and Endocrine Effects in Pacific Harbour Seal and Northern Elephant Seal Pups*, thèse de doctorat, Albany, New York State University.
- SHIMADA, T., A.C. ROSS, D.D. MUCCIO, W.J. BROUILLETTE et Y.F. SHEALY (1997). « Regulation of hepatic lecithin : Retinol acyltransferase activity by retinoic acid receptor-selective retinoids », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 344, p. 220-227.
- SIMMS, W., S. JEFFERIES, M. IKONOMOU et P.S. ROSS (2000). « Contaminant-related disruption of vitamin A dynamics in free-ranging harbour seal (*Phoca vitulina*) pups from British Columbia, Canada and Washington State, USA », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 19, p. 2844-2849.
- SIVE, H.L., B.W. DRAPER, R. DRAPER, R.M. HARLAND et H. WEINTRAUB (1990). « Identification of a retinoic acid-sensitive period during primary axis formation in *Xenopus laevis* », *Genes and Development*, vol. 4, p. 932-942.
- SOMMER, A. (1995). *La carence en vitamine A et ses conséquences*, Genève, Organisation mondiale de la santé.
- SPEAR, P.A., A.Y. BILODEAU et A. BRANCHAUD (1992). « Retinoids : From metabolism to environmental monitoring », *Chemosphere*, vol. 25, p. 1733-1738.

- SPEAR, P.A. et D.H. BOURBONNAIS (1998). « Utilisation des rétinoïdes en tant que biomarqueurs », dans L. Lagadic *et al.* (dir.), *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, Paris, Lavoisier Tec et Doc, p. 202-224.
- SPEAR, P.A., D.H. BOURBONNAIS, R.J. NORSTROM et T.W. MOON (1990). « Yolk retinoids (vitamin A) in eggs of the herring gull and correlations with polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 9, p. 1053-1061.
- SPEAR P.A., D.H. BOURBONNAIS, D.B. PEAKALL et T.W. MOON (1989). « Dove reproduction and retinoid (vitamin A) dynamics in adult females and their eggs following exposure to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl », *Canadian Journal of Zoology*, vol. 67, p. 908-913.
- SPEAR, P.A., H. GARCIN et J.-F. NARBONNE (1988). « Increased retinoic acid metabolism following 3,3',4,4',5,5'-hexabromobiphenyl injection », *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 66, p. 1181-1186.
- SPEAR, P.A., P. HIGUERET et H. GARCIN (1994). « Effects of fasting and 3,3',4,4',5,5'-hexabromobiphenyl on plasma transport of thyroxine and retinol : Fasting reverses elevation of retinol », *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 42, p. 173-183.
- SPEAR, P.A., T.W. MOON et D.B. PEAKALL (1986). « Liver retinoid concentrations in natural populations of herring gulls (*Larus argentatus*) contaminated by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and in ring doves (*Streptopelia risoria*) injected with a dioxin analogue », *Canadian Journal of Zoology*, vol. 64, p. 204-208.
- STRATFORD, T., C. LOGAN, M. ZILE et M. MADEN (1999). « Adnormal anteroposterior and dorsoventral patterning of the limb bud in the absence of retinoids », *Mechanism of Development*, vol. 81, p. 115-125.
- SUNDIN, O. et G. EICHELE (1992). « An early marker of axial pattern in the chick embryo and its respecification by retinoic acid », *Development*, vol. 114, p. 841-852.
- TABIN, C. (1995). « The initiation of the limb bud : Growth factors, Hox genes and retinoids », *Cell*, vol. 80, p. 671-674.
- TAVEEKIJAKARN, P., T. MIYAZAKI, M. MATSUMOTO et S. ARAI (1994). « Vitamin A deficiency in cherry salmon », *Journal of Aquatic Animal Health*, vol. 6, p. 251-259.
- THOMPSON, J.N. (1976). « Fat-soluble vitamins », *Comparative Animal Nutrition*, vol. 1, p. 99-135.
- THUNBERG, T., U.G. AHLBORG et H. JOHNSSON (1979). « Vitamin A (retinol) status in the rat after a single oral dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin », *Archives of Toxicology*, vol. 42, p. 265-274.
- UNDERWOOD, B.A. (1984). « Vitamin A in animal and human nutrition », dans M.B. Sporn *et al.* (dir.), *The Retinoids*, Montréal, Academic Press, p. 282-392.
- VAN DEN BERG, M., B.L.H.J. CRAANE, T. SINNIGE, S. VAN MOURIK, S. DIRKSEN, T. BOUDEWIJN, M. VAN DER GAAG, I.J. LUTKE-SCHIPHOLT, B. SPENKELINK et A. BROUWER (1994). « Biochemical and toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) in the cormorant (*Phalacrocorax carbo*) after *in vivo* exposure », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 13, p. 803-816.
- VANDERSEA, M.W., P. FLEMING, R.A. MCCARTHY et D.G. SMITH (1998). « Fin duplications and deletions induced by retinoic acid signaling », *Development, Genes and Evolution*, vol. 208, p. 61-68.
- VERMA, S.R. et I.P. TONK (1983). « Effect of sublethal concentrations of mercury on the composition of liver, muscles and ovary of *Notopterus notopterus* », *Water, Air and Soil Pollution*, vol. 20, p. 287-292.
- WENDLING, O., C. DENNEFELD, P. CHAMBON et M. MARK (2000). « Retinoid signaling is essential for patterning the endoderm of the third and fourth pharyngeal arches », *Development*, vol. 127, p. 1553-1562.
- WESTON, W.M., P.N. NUGENT et R.M. GREENE (1995). « Inhibition of retinoic acid induced gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 207, p. 690-694.

- WHITE, J.A., Y.-D. GUO, K. BAETZ, B. BECKETT-JONES, J. BONASORO, K.E. HSU, F.J. DILWORTH, G. JONES et M. PETKOVICH (1996). « Identification of the retinoic acid-inducible all-*trans*-retinoic acid 4-hydroxylase », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, p. 29922-29927.
- WOLF, G. (1996). « A history of vitamin A and retinoids », *Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 10, p. 1102-1107.
- ZHANG, Z., J.E. BALMER, A. LOVLIE, S.H. FROMM et R. BLOMHOFF (1996). « Specific teratogenic effects of different retinoic acid isomers and analogs in the developing anterior central nervous system of zebrafish », *Developmental Dynamics*, vol. 206, p. 73-86.
- ZILE, M.H. (1992). « Vitamin A homeostasis endangered by environmental pollutants », *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 201, p. 141-153.
- ZILE, M.H., C. SUMMER, R. AULERICH, S.J. BURSIA, D.E. TILLITT, J.P. GIESY et T.J. KUBIAK (1997). « Retinoids in eggs and embryos of birds fed fish from the Great Lakes », *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 3, p. 277-288.
- ZILE, M.H., I. KOSTETSKII et S.YUAN (1998). « Vitamin A specifies heart asymmetry during avian cardiogenesis », *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 12, p. 319.
- ZILE, M.H. (2001). « Function of vitamin A in vertebrate embryonic development », *Journal of Nutrition*, vol. 13, p. 705-708.

LES INTERACTIONS MULTIPLES EN ÉCOTOXICOLOGIE

Le cas du benzo(a)pyrène et du tributylétain
chez l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*)

JAIME PADRÓS*

Université du Québec à Rimouski –
Institut des sciences de la mer de Rimouski (ISMER)
Département de métabolisme in vitro, Services Pharma MDS

ÉMILIE PELLETIER*

Université du Québec à Rimouski –
Institut des sciences de la mer de Rimouski (ISMER)

CIRO A. OLIVEIRA RIBEIRO*

Departamento de Biologia Celular,
Universidade Federal do Paraná

* Les auteurs tiennent à remercier le personnel technique et professionnel du laboratoire du professeur E. Pelletier à Rimouski et du professeur C.A. Oliveira Ribeiro à Curitiba pour leur appui indéfectible à la réalisation des travaux de laboratoire et au traitement des données. Ces travaux ont bénéficié du soutien financier du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et du Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq du Brésil.

RÉSUMÉ

Les mécanismes biochimiques régissant les interactions multiples en écotoxicologie sont encore peu connus à cause de l'énorme problème que posent le suivi simultané de plusieurs biomarqueurs chimiques et biochimiques ainsi que l'interprétation des données en fonction du métabolisme et des mécanismes biologiques de défense mis en place par l'organisme exposé. Ce chapitre présente l'approche expérimentale ainsi que les principaux résultats obtenus lors d'une étude à long terme sur les interactions métaboliques entre le tributylétain (TBT) et le benzo(a)pyrène (BaP) chez l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*). Les poissons ont été exposés au BaP (3 mg/kg) et au TBT (0,3 mg/kg), soit séparément ou simultanément, via 10 injections intrapéritonéales (une injection tous les six jours). Aux jours 8, 32 et 56 plusieurs biomarqueurs ont été mesurés à différents niveaux de complexité biologique. Les paramètres chimiques étudiés étaient la concentration biliaire de métabolites de BaP et celle du TBT et de ses métabolites DBT et MBT, la concentration des adduits du BaPDE avec l'albumine plasmique, la globine du sang et l'ADN du foie, et la concentration en glutathion dans le foie. Du côté biochimique, les activités hépatiques de l'EROD, de la GST et de la GR ont été mesurées. Au niveau tissulaire, des coupes histologiques du foie ont été examinées en microscopie. Enfin, au niveau physiologique, les indices de condition corporelle, du foie et de la rate ont été mesurés.

Les résultats de cette expérience *in vivo* démontrent clairement l'existence d'interactions métaboliques mutuelles entre le BaP et le TBT. Le TBT peut inhiber la bioactivation *in vivo* du BaP via une modulation temporelle de l'induction du P4501A par le BaP. D'autre part, le BaP peut stimuler le métabolisme du TBT. Cet effet pourrait être dû à l'action protectrice du BaP sur la diminution de l'activité de la GST et des niveaux du glutathion hépatique par le TBT. Les lésions hépatiques observées chez les poissons exposés séparément au BaP ou au TBT sont en accord avec les résultats déjà rapportés pour ces deux contaminants. Cependant, lorsque les polluants ont été administrés simultanément, les lésions étaient moins nombreuses par rapport à celles observées chez les individus exposés séparément à chaque polluant. De plus, on constate une forte utilisation des réserves lipidiques chez les poissons exposés seulement au BaP ou au TBT, alors que l'exposition simultanée au BaP et au TBT montre une situation très comparable à celle du groupe témoin. Enfin, aucun effet n'était observé au niveau des indices de condition. Globalement, ces résultats soulèvent l'hypothèse d'un véritable antagonisme des deux xénobiotiques l'un par rapport à l'autre au niveau métabolique, avec des conséquences aux niveaux cellulaire et tissulaire.

Une nouvelle approche scientifique est proposée pour l'étude des interactions chimiques en toxicologie aquatique, soit la conceptualisation et la prédiction d'interactions en se basant sur les voies métaboliques des polluants considérés et sur leur capacité à moduler l'activité du P450, le système enzymatique clé impliqué à la fois dans la bioactivation et la détoxification des polluants organiques. Cette approche mécanistique repose sur l'utilisation de biomarqueurs permettant d'identifier les bases biochimiques des interactions et peut être couplée à des marqueurs cellulaires et tissulaires qui élargissent le champ de vision du chercheur et permettent d'évaluer les effets visibles des interactions métaboliques.

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Comment aborder la question des interactions multiples en écotoxicologie ? Le problème de la présence simultanée de plusieurs polluants dans un milieu naturel donné et de leurs effets sur des organismes qui y vivent et s'y reproduisent est aussi vieux que la toxicologie environnementale elle-même. Il n'existe pas encore d'approche ou de protocole bien défini pour étudier la toxicité des mélanges chimiques complexes et encore moins l'écotoxicologie des eaux ou des sédiments contaminés par plusieurs familles de xénobiotiques. Cette situation n'est pas un reflet du manque d'intérêt de la communauté scientifique en chimie et toxicologie environnementale ; elle indique plutôt les difficultés et les controverses qui entourent ce domaine d'étude.

Au plan de l'évaluation et de la gestion environnementale, il est évidemment impossible de documenter toutes les interactions additives, synergiques ou antagonistes qui agissent sur un écosystème entier ou même sur une petite communauté biologique d'un site contaminé. L'approche du gestionnaire consiste donc à développer une méthodologie qui donne une vue d'ensemble du problème, le plus souvent en combinant les réponses toxicologiques d'une importante batterie de biotests de laboratoire avec des données de terrain (Yang *et al.*, 1989). Quoique cette approche soit utile, voire essentielle à la gestion des risques environnementaux (Cassee *et al.*, 1998), elle est peu satisfaisante au plan scientifique, car elle n'explique rien des processus et mécanismes d'interactions multiples qui font que certaines substances agissent en synergie et d'autres en antagonisme sur les êtres vivants. Encore fort peu d'études de cas ont été menées sur les interactions multiples à cause de la complexité même de ces interactions et du peu de moyens disponibles en toxicologie environnementale. Il existe tout de même quelques travaux toxicologiques couronnés de succès qui prouvent toute l'importance et la nécessité de telles études pour comprendre les mécanismes chimiques et biochimiques qui régissent ces interactions (Yang, 1994). La construction de modèles toxicodynamiques et toxicocinétiques devrait permettre de prédire la toxicité résultant d'interactions chimiques multiples chez plusieurs espèces vivant en communauté. Quelques auteurs ont proposé des approches intégrées pour l'analyse des interactions toxicologiques des mélanges chimiques qui tiennent compte des aspects mécanistiques et qui privilégient la modélisation mathématique et la simulation par ordinateur (Mackay, 1991 ; El-Masri *et al.*, 1997). L'examen de ces modèles nous montre qu'ils sont encore restreints à des interactions binaires avec une seule réponse biologique parce qu'il n'existe pas de bonnes données expérimentales pour des systèmes à trois ou quatre composantes chimiques indépendantes et, surtout, que ces modèles sont très dépendants d'une bonne connaissance

des mécanismes d'action individuels des xénobiotiques étudiés, permettant d'utiliser les réponses biologiques qui caractérisent le mieux les interactions attendues. Les besoins en données expérimentales de haute qualité pour le développement des modèles analytiques de deuxième ou troisième génération appuient davantage la nécessité des études mécanistiques poussées chez des espèces clés des écosystèmes dulcicoles et marins.

Par exemple, s'il devient nécessaire d'évaluer les effets combinés de métaux, d'hydrocarbures aromatiques et de pesticides chlorés se trouvant tous simultanément dans les eaux et les sédiments d'un même cours d'eau et agissant sur quelques espèces aquatiques clés, il est essentiel de connaître la biodisponibilité de chacun de ces contaminants, d'une part, et les interactions toxiques du mélange chimique, d'autre part. Une analyse rigoureuse de ces interactions repose sur un choix judicieux d'indicateurs d'effets toxiques à court et long termes, et ce choix se doit d'être guidé par une connaissance approfondie des mécanismes d'interaction entre polluants (Landis et Yu, 1995). Un mauvais choix de bioindicateurs peut conduire à une impossibilité à conclure ou, pire, à un diagnostic erroné.

La situation se complique davantage encore quand il faut tenir compte non seulement des effets combinés des xénobiotiques sur les organismes composant un écosystème, mais aussi des stresseurs environnementaux naturels qui agissent sur un écosystème entier. Nous puisons ici un exemple en limnologie, où des chercheurs ont déterminé le synergisme et l'antagonisme résultant de l'application de trois stressors (la température, l'alimentation et une substance toxique) chez *Daphnia* sp. en utilisant le taux de survie et le succès de reproduction comme indicateurs (Folt *et al.*, 1999). Les auteurs conclurent que les modèles classiques d'effets additifs (Hoagland *et al.*, 1993) ou synergiques (Pennings, 1996) ont tendance à surestimer les effets combinés des stressors. De toute évidence, la méconnaissance des mécanismes physiologiques et biochimiques qui sous-tendent la réaction d'organismes déjà incommodés par la chaleur ou la faim et exposés de surcroît à un toxique fait en sorte qu'il est actuellement impossible d'établir un quelconque modèle prédictif.

1.1. L'ANTAGONISME SÉLÉNIUM/MERCURE

Avant de passer à l'objet principal de ce chapitre sur les interactions métaboliques, il nous est apparu intéressant et important de citer le cas de l'interaction sélénium/mercure comme exemple d'un succès collectif pour l'élucidation d'un antagonisme qui a longtemps laissé perplexes les chercheurs en toxicologie environnementale et qui ne pouvait en aucune manière être traité par les modèles d'interactions multiples.

Le cas le mieux documenté d'une interaction antagoniste entre deux substances chimiques est très probablement celui du mercure et du sélénium. Parísek et Ostádalová (1967) furent les premiers à décrire brièvement les effets protecteurs du sélénium à la suite d'une intoxication au mercure chez le rat. Au cours des années qui suivirent, de nombreux chercheurs confirmèrent cette interaction inusitée non seulement chez les mammifères terrestres et aquatiques (Burk *et al.*, 1974 ; Koeman *et al.*, 1975) mais aussi chez certains poissons (Mackay *et al.*, 1975), des invertébrés (Glickstein, 1978) et une microalgue (Gotsis, 1982), laissant soupçonner la présence d'un mécanisme mutuel et universel de détoxification. Les observations en laboratoire chez le rat ont montré que l'administration simultanée par injection ou par la nourriture du sélénite de sodium (Na_2SeO_3) et du chlorure mercurique (HgCl_2) provoquait un effet antagoniste marqué sur la toxicité du mercure, d'une part, et entraînait une rétention accrue et équimolaire du Hg et du Se dans le plasma sanguin, d'autre part (Burk *et al.*, 1974). Les travaux de terrain montrèrent que plusieurs mammifères marins et certains poissons bioaccumulaient dans leur foie du mercure et du sélénium dans un rapport molaire proche de l'unité et qu'il existait parfois une très bonne corrélation linéaire entre la somme des concentrations totales de Se et Hg et la longueur ou l'âge de certains poissons (Pelletier, 1985), laissant supposer que le mécanisme responsable de l'antagonisme devait comporter la formation d'un ou plusieurs complexes du type Hg-Se-protéine et que ces complexes pouvaient être bioaccumulés (Martoja et Viale, 1977 ; Magos et Webb, 1980). Le mécanisme proposé à ce moment impliquait le glutathion (GSH) dans la formation d'un complexe réduit GSSeSG , suivi de la capture d'un cation Hg^{2+} et finalement la formation d'un complexe insoluble HgSe . Cependant, la composition exacte et la forme structurale de ce complexe restaient inconnues.

Il a fallu plusieurs années d'efforts concertés pour percer le mystérieux antagonisme Hg/Se et ce n'est que très récemment qu'un mécanisme structural complet et crédible a été proposé pour les mammifères (Sasakura et Suzuki, 1998 ; Shiobara et Suzuki, 1998 ; Suzuki *et al.*, 1998 ; Gailer *et al.*, 2000). L'ensemble de ces travaux a montré que l'anion SeO_3^{2-} est d'abord capturé par un érythrocyte du sang et que le Se(IV) est réduit en Se(II) par l'action du GSH. L'anion sélénure (Se^{2-}) serait ensuite expulsé de la cellule pour réagir rapidement avec le mercure présent dans le plasma sanguin, probablement sous la forme d'un complexe avec l'albumine (Gailer *et al.*, 2000). Petit à petit, cette réaction se développe en capturant d'autres Se^{2-} et Hg^{2+} conduisant à la formation d'une concrétion pseudocristalline noire où le mercure et le sélénium sont tétracoordonnés et où le GSH jouerait le rôle de ligand externe. Cette concrétion est à son tour capable de se lier à une sélénoprotéine P, mais on ignore le mécanisme précis de cette liaison,

peut-être induite par les groupements libres du GSH de la concrétion et la sélénocystéine de la protéine (Sasakura et Suzuki, 1998). Ce mécanisme explique, d'une part, l'effet antagoniste du SeO_3^{2-} qui forme rapidement après réduction en Se^{2-} une concrétion insoluble et non toxique avec le mercure qui circule dans le plasma sanguin et, d'autre part, l'accumulation des concrétions Hg/Se dans le foie et le rein des mammifères qui y sont transportés par des protéines sanguines. À cause de la présence ubiquiste du GSH dans les tissus biologiques, on peut raisonnablement supposer que ce même mécanisme de protection agit pour d'autres organismes, notamment les poissons et les invertébrés marins. Cependant peu de preuves concrètes y ont été apportées, car la seule présence simultanée du mercure et du sélénium dans un rapport molaire proche de l'unité est insuffisante (Pelletier, 1985).

Le cas du sélénium/mercure est tout à fait unique dans les annales de la toxicologie environnementale, car il s'agit d'une interaction chimique relativement simple qui n'est pas contrôlée par des mécanismes biochimiques et ne semble dépendre que de la présence naturelle et fortuite de biomolécules appropriées (GSH, sélénoprotéines) dans le milieu réactionnel qu'est le sang. Ni le sélénium, ni le mercure ne semblent impliqués dans un processus d'induction ou d'inhibition enzymatique dont dépendrait le développement de l'antagonisme. Par opposition, on pense maintenant que la majorité des autres interactions chimiques qui ont été mentionnées dans la littérature scientifique fait plutôt appel aux notions d'interactions métaboliques (Calabrese, 1991 ; Kedderis, 1997 ; Levy *et al.*, 2000).

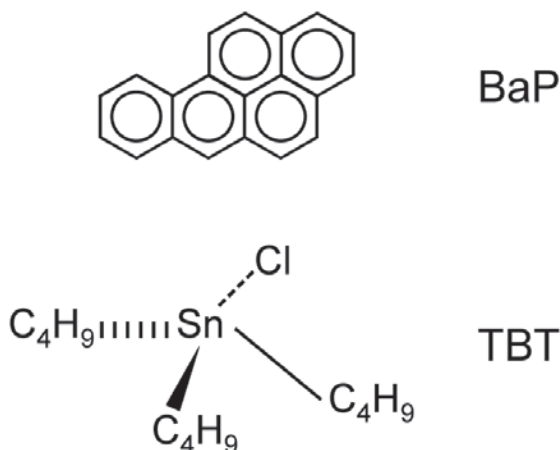
1.2. INTRODUCTION AU PROBLÈME DU TBT ET DU BaP

Le cas de l'interaction métabolique entre le tributylétain (TBT) et le benzo(a)pyrène (BaP) était inconnu avant que notre laboratoire ne décide de s'y intéresser en 1995. L'idée d'explorer à fond les interactions potentielles entre le TBT et le BaP est venue à la fois d'une problématique environnementale aiguë et réelle et de données biochimiques, le plus souvent *in vitro*, montrant que les deux contaminants pouvaient agir individuellement sur les mêmes familles enzymatiques. Au plan environnemental, le TBT est une molécule organométallique (figure 6.1) introduite intentionnellement dans les milieux aquatiques comme biocide puissant dans les peintures antisalissures utilisées pour les navires de grande taille et certaines structures immergées. Malgré la découverte précoce des effets dévastateurs de ce biocide sur les organismes aquatiques non ciblés dans les ports, les marinas et le long des corridors maritimes les plus achalandés (Alzieu, 1996), les peintures au TBT demeurent en usage et ne seront retirées du marché qu'à la fin de la présente décennie en vertu d'une

entente internationale en ce sens, si le puissant lobby des fabricants de peinture à l'étain ne parvient pas à en faire reculer l'échéance encore une fois (voir le site <www.imo.org> pour une mise à jour de l'information). Cette entente est une mince consolation, car le TBT et ses dérivés de dégradation, le dibutylétain (DBT) et le monobutylétain (MBT), resteront présents pour des décennies encore dans les sédiments côtiers où leur dégradation est considérée très lente (Dowson *et al.*, 1996). La disparition définitive de la menace environnementale causée par les butylétains sera encore plus lente dans les pays des hautes latitudes où le froid devient un facteur de ralentissement supplémentaire de leur dégradation.

Figure 6.1

Structures chimiques du benzo(a)pyrène (BaP) et du chlorure de tributylétain (TBTCl)



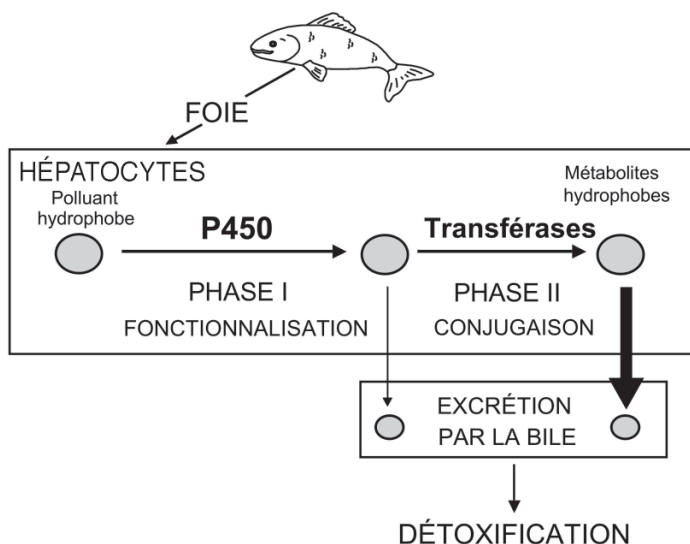
Source : Padrós (2001).

De son côté, le BaP (figure 6.1) est le membre le mieux connu de la vaste famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), un groupe de molécules persistantes formées par la combustion incomplète de la matière organique vivante ou fossile. Le BaP est peu soluble dans l'eau (4 mg/L à 25 °C), mais il est fortement liposoluble ($\log K_{OW} \cong 6,2$). Il s'associe aux particules atmosphériques et aquatiques qui constituent alors son principal vecteur de transfert vers la majorité des organismes terrestres et aquatiques. De multiples travaux de laboratoire ont montré les effets mutagènes et cancérogènes des HAP et en particulier du BaP chez divers organismes, incluant le poisson (Varanasi *et al.*, 1989a; Hall et Grover, 1990). Les HAP, dont le BaP, sont évidemment présents en milieu côtier

en même temps que les hydrocarbures pétroliers et les butylétains, puisque ces contaminants sont tous issus du transport maritime et de l'activité industrielle en général.

La présence simultanée de ces contaminants en un même lieu soulève immédiatement la question de leurs interactions métaboliques chez les organismes aquatiques, puisqu'il est déjà bien établi que le principal mécanisme à la base de multiples interactions chimiques est l'altération du métabolisme d'un xénobiotique par la présence d'un autre xénobiotique (Conney et Burns, 1972 ; Kedderis, 1997 ; Weaver, 2001). Le rôle premier du métabolisme comme système de défense contre les substances étrangères et potentiellement dangereuses pour l'organisme est l'excrétion de ces molécules par un processus de fonctionnalisation (réactions de phase I) et de conjugaison (réactions de phase II) permettant leur élimination par la bile et l'urine chez les poissons et les mammifères, ou encore par les exsudats chez les plantes et les invertébrés (figure 6.2). L'étude de la métabolisation des polluants organiques joue un rôle central en toxicologie, car la conversion métabolique détermine non seulement le devenir biotique du polluant, mais aussi ses effets toxiques. L'addition d'un ou plusieurs groupes fonctionnels à une molécule (ou encore son hydrolyse partielle) a pour premier effet d'augmenter son caractère hydrosoluble, mais aussi et surtout de la rendre réactive à la conjugaison avec des substances endogènes polaires comme le glutathion et l'acide glucuronique. Les métabolites résultant de ce mécanisme sont généralement peu toxiques et facilement excrétés. Il arrive cependant que le fait de fonctionnaliser un xénobiotique le rend « trop réactif » et capable de se lier à des macromolécules biologiques et ainsi d'induire une nouvelle toxicité par un processus appelé bioactivation. Le BaP est un cas type de la bioactivation suite au métabolisme oxydatif induit par le cytochrome P-450.

Le cytochrome P-450 (P450) est un terme générique qui désigne une superfamille d'hémoprotéines ayant pour fonction de catalyser le métabolisme de multiples substances endogènes comme les hormones, les vitamines, les lipides ainsi que les xénobiotiques lipophiles comme les HAP et les biphényles polychlorés (BPC) (Stegeman et Hahn, 1994). On sait aujourd'hui que le P450 est constitué de plusieurs isoenzymes codées par des gènes différents et qui possèdent une spécificité relativement étroite reliée à la structure spatiale des substrats. Ainsi, l'isoenzyme P4501A1 métabolise les molécules ayant une structure planaire simple comme le BaP alors que d'autres ne travaillent que sur des structures spatiales complexes comme les stéroïdes (P4503A4). On sait aussi que l'activité des isoenzymes de la famille des P450 peut être modifiée par des agents chimiques ayant des capacités d'induction ou d'inhibition.

Figure 6.2**Schéma général du métabolisme des xénobiotiques chez le poisson**

Source : Padrós (2001).

L'induction de l'isoenzyme P4501A1 et, de ce fait, l'augmentation de l'activité catalytique associée sont un mécanisme bien documenté chez les mammifères (Whitlock et Denison, 1995). L'inducteur, par exemple un composé planaire comme le BaP, se lie d'abord à une protéine cytosolique, appelée récepteur Ah (*aromatic hydrocarbon*), et le complexe résultant se transporte dans le noyau pour se lier à une région spécifique de l'ADN. Le gène *CYP1A1* est alors activé et la synthèse de la protéine P4501A1 est mise en marche. Chez le poisson, l'induction du P4501A1 semble aussi être contrôlée par le récepteur Ah (Hahn, 1998) quoique des résultats *in vivo* et *in vitro* suggèrent que le mécanisme d'induction est moins spécifique aux composés planaires et que les molécules non planaires peuvent aussi induire cette isoenzyme (Foster *et al.*, 1998 ; Sadar *et al.*, 1996).

Par opposition, on définit un inhibiteur enzymatique comme un composé capable d'abaisser la concentration de l'enzyme et/ou de diminuer ou de bloquer la fonction catalytique associée. Les mécanismes d'inhibition des P450 sont nettement plus nombreux et complexes que l'induction, car les inhibiteurs peuvent entrer en compétition pour les sites actifs, réduire le transport d'électrons, réduire la biosynthèse, ou encore augmenter la dégradation des enzymes ou de ses cofacteurs (Testa et Jenner, 1981). Parmi les composés capables d'inhiber l'activité du P450 chez le

poisson, on note des hétérocycles comme certaines flavones, des pesticides organiques comme le méthidathion et une famille d'organométaux d'un grand intérêt pour nous, les butylétains (Stegeman et Hahn, 1994). Les effets inhibiteurs des butylétains sur différentes isoenzymes du P450 sont connus depuis les années 1980 par des travaux *in vitro* sur la fraction microsomale hépatique du rat (Rosenberg et Drummond, 1983).

1.3. HYPOTHÈSES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

Comme indiqué précédemment, le BaP est un inducteur du P4501A1, ce qui signifie qu'il a la capacité d'induire son propre métabolisme et ainsi de produire des métabolites électrophiles capables de se conjuguer au glutathion pour une élimination rapide. Or, une petite portion de ces métabolites peut se lier à des macromolécules cellulaires (ADN, ARN et protéines) pour former des adduits par liaison covalente aux centres nucléophiles (figure 6.3). Il est maintenant reconnu que la formation d'adduits à l'ADN est la première étape de la cancérogenèse chimique (Harris, 1992; Shaw et Connell, 1994) (figure 6.2). D'autre part, les travaux de Rosenberg mentionnés plus haut montrent que le TBT est capable d'interagir directement et fortement sur l'isoforme P4501A1 par la formation d'une liaison de type substrat avec l'enzyme. Cette interaction provoque la dégradation de l'enzyme vers une forme inactive comme le P420. Enfin, les auteurs notent que le hème microsomal ne semble pas être une cible pour le TBT. L'essentiel de ces observations a été confirmé pour le P450 microsomal hépatique du poisson (Fent et Stegeman, 1991). D'autres études plus récentes ont montré que l'action inhibitrice *in vitro* du TBT sur le P450 semble un phénomène généralisé chez de nombreuses espèces de poissons et de mollusques (Morcillo et Porte, 1997; Reader *et al.*, 1996), de crustacés (Oberdörster *et al.*, 1998) et de mammifères marins (Kim *et al.*, 1998). Les études *in vivo* sont moins nombreuses et moins concluantes à cause de multiples facteurs confondants (Fent et Stegeman, 1993; Kawano *et al.*, 1996), mais la conclusion générale semble tenir : le TBT aurait la capacité d'inhiber le métabolisme dépendant du P4501A1 et, de ce fait, de réduire la bioactivation du BaP. Ainsi, le TBT pourrait paradoxalement avoir une activité anticancérogène envers le BaP et d'autres HAP.

Compte tenu de l'ensemble des connaissances disponibles sur les interactions potentielles du couple BaP/TBT et de l'intérêt de choisir le poisson comme modèle biologique pour ce type d'étude, nous avons formulé les quelques objectifs suivants :

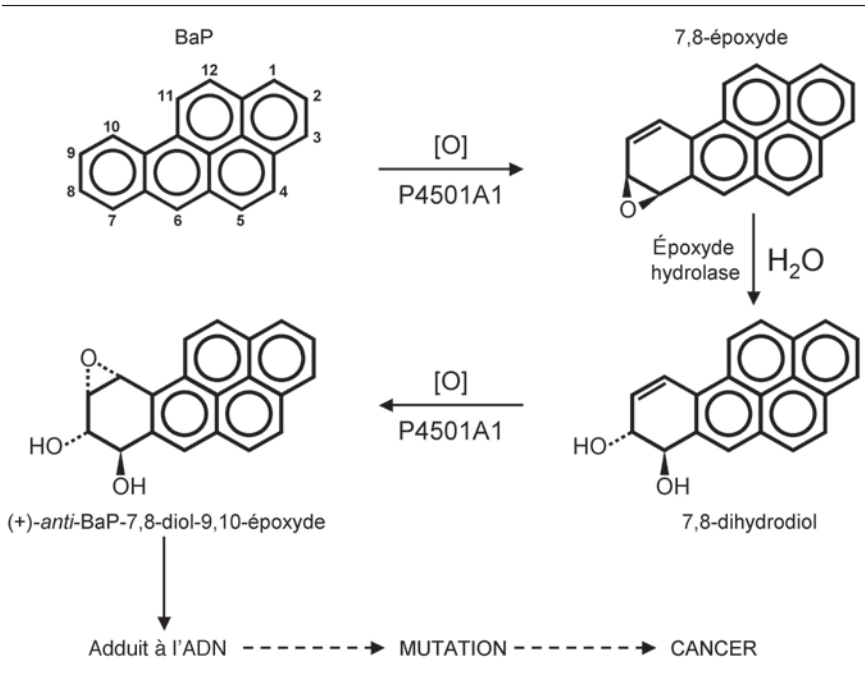
- déterminer le degré du métabolisme des deux xénobiotiques administrés séparément ;
- déterminer les interactions métaboliques mutuelles lorsque les deux xénobiotiques sont administrés simultanément ;

- décrire les mécanismes biochimiques qui gouvernent ces interactions ;
- évaluer l'utilité des réponses biochimiques, cellulaires et physiologiques utilisées comme biomarqueurs d'exposition et/ou d'effet pour le développement de modèles toxicocinétiques/toxicodynamiques prédictifs.

Le présent chapitre décrit les résultats d'une expérience *in vivo* de 56 jours utilisant l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*) et examinant en détail les interactions métaboliques de phases I et II et les effets toxiques aussi bien biochimiques qu'histopathologiques. Ces données sont tirées de la thèse de doctorat de Jaime Padrós (Padrós, 2001). Une partie des résultats discutés ci-après ainsi que des travaux antérieurs sur la formation *in vivo* et la détermination chromatographique des adduits à l'albumine et à la globine ont été publiés dans la littérature scientifique internationale (Padrós *et al.*, 2000, 2003 ; Padrós et Pelletier, 2000, 2001).

Figure 6.3

Processus de bioactivation du BaP en un métabolite cancérogène (+)-anti-BaPDE



Source : Padrós (2001).

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. PRODUITS CHIMIQUES

Le BaP (98 % pur) et le TBT (96 % pur) ont été fournis par la firme Sigma-Aldrich et utilisés tel que reçus. Les étalons BaP tétrols (tétrols I-1 et II-2, purs à 99 %) provenaient du Chemical Carcinogen Repository (National Cancer Institute, USA). L'éthoxyrésorufine et le NADPH provenaient respectivement des firmes Molecular Probes et Boehringer Mannheim. Les solvants organiques étaient de qualité HPLC et provenaient de la firme EM Science. Tous les autres produits étaient de la plus haute pureté disponible et ont été fournis par Sigma-Aldrich.

2.2. POISSONS

Des spécimens immatures d'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*) provenant d'une ferme aquacole locale ont été placés dans des cuves de 500 L avec de l'eau en circuit ouvert, déchlorée, oxygénée et filtrée sur charbon actif pour éliminer toute trace de composés organochlorés qui pourraient interférer sur l'activité des P450. La température de l'eau était de 15 ± 2 °C. La photopériode était maintenue à 12 h de jour et 12 h de nuit, les poissons étant protégés de la lumière directe. Ils ont été acclimatés dans ces conditions pendant deux semaines avant de commencer l'expérience. Les poissons étaient alimentés avec des granules secs trois fois par semaine (1,5 % du poids corporel) pendant la période d'acclimatation et pendant l'expérience. Puisque l'alimentation stimule la sécrétion de bile dans l'intestin et dilue donc le niveau de métabolites dans la bile, les poissons n'ont pas été nourris 72 heures avant l'échantillonnage.

2.3. TRAITEMENTS

Après avoir été anesthésiés au méthanesulfonate de tricaïne (100 mg/L), les poissons ont été exposés aux polluants par injection intrapéritonéale (i.p.). Le protocole de contamination était le suivant : a) le groupe témoin de poissons a reçu le véhicule seul (huile de maïs stérile) ; b) le deuxième groupe a reçu le BaP (3 mg/kg de poisson) ; c) le troisième groupe a reçu le TBT (0,3 mg/kg de poisson) ; et d) le quatrième groupe a reçu le BaP (3 mg/kg) en plus du TBT (0,3 mg/kg). La dose de BaP choisie se situe parmi les plus faibles doses i.p. utilisées dans des études réalisées avec des poissons (Collier et Varanasi, 1991 ; Schiewe *et al.*, 1991 ; Levine *et al.*, 1994 ; Willet *et al.*, 1995). La dose de TBT utilisée est comparable aux concentrations mesurées dans les tissus de poissons exposés *in situ* au TBT (Oshima *et al.*, 1997 ; Senthilkumar *et al.*, 1999). Les injections i.p. ont été

répétées tous les six jours pendant une période de 54 jours afin de simuler une situation naturelle où le poisson est périodiquement exposé aux xénobiotiques. Les poissons ont été sacrifiés 48 heures après les deuxième (jour 8), sixième (jour 32) et dixième (jour 56) injections.

2.4. PRÉLÈVEMENT DES TISSUS CIBLES

À chaque échantillonnage, les poissons ($n = 6/\text{groupe}$) étaient anesthésiés, pesés et mesurés. L'échantillon de sang prélevé par ponction caudale à l'aide de seringues héparinées (100 unités/mL dans du NaCl à 0,9 %) était ensuite centrifugé (7,000 g pendant 3 min) afin de séparer les globules rouges et le plasma, qui ont été conservés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'au moment des analyses. La bile était prélevée à l'aide d'une seringue (1 mL) en évitant soigneusement de contaminer le foie. Elle était placée dans un pilulier ambre et conservée à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le foie était pesé et rincé avec une solution tampon afin d'éliminer toute trace de sang et de bile. Une petite section a été prélevée pour l'histologie et le reste a ensuite été coupé en morceaux et immédiatement placé dans de l'azote liquide puis conservé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour les analyses enzymatiques subséquentes. Le rein et les pseudo-branchies ont été également prélevés pour les analyses histopathologiques. Les indices de condition du foie et de la rate ont été calculés d'après la formule ($\text{poids de l'organe cible} / \text{poids corporel}$) $\times 100$, alors que pour l'indice de condition corporelle, nous avons utilisé la formule ($\text{poids corporel} / \text{longueur}$)³ $\times 100$.

2.5. PRÉPARATION DES ESSAIS ENZYMATIQUES ET DOSAGES BIOCHIMIQUES

Tous les protocoles ont été réalisés sur la glace ou en chambre froide à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Chaque foie était homogénéisé dans une solution tampon (Tris-HCl 0,1 M, sucrose 0,25 M; pH 7,4); les homogénats étaient ensuite centrifugés de façon différentielle afin d'obtenir la fraction microsomale. Les microsomes étaient remis en suspension dans un tampon de reprise (tampon d'homogénéisation contenant 20 % (v/v) de glycérol et dithiothréitol 1 mM) et conservés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. L'activité de l'éthoxyrésorufine-*O*-dééthylase (EROD) dans les microsomes du foie a été mesurée par fluorométrie (Burke et Mayer, 1974). La fraction cytosolique a été obtenue en centrifugeant les homogénats à 13,000 g pendant 30 min. Le surnageant a été utilisé immédiatement pour le dosage de la glutathion *S*-transférase (Habig *et al.*, 1974; avec le CDNB comme substrat), la glutathion réductase (Carlberg et Mannervik, 1985) et le glutathion (Hissin et Hilf, 1976). Les protéines ont été quantifiées par la méthode de Bradford (1976) en utilisant l'albumine sérique bovine comme étalon.

2.6. ANALYSE DES MÉTABOLITES DU BaP DANS LA BILE

Les métabolites du BaP dans la bile de chaque poisson ont été quantifiés par fluorescence, essentiellement selon la méthode de Lin *et al.* (1996). Brièvement, chaque échantillon de bile était dilué (1/20 000 v/v) dans de l'eau nanopure et la fluorescence était ensuite enregistrée à un couple de longueurs d'onde propre au BaP (380 nm en excitation et 430 nm en émission). Les mesures étaient converties en équivalents de BaP utilisant une courbe d'étalonnage de BaP dissous dans un mélange méthanol:eau (50:50 v/v). Les résultats ont été exprimés en µg d'équivalents de BaP par mg de protéine biliaire, mesurée selon la méthode de Bradford (1976).

2.7. ISOLEMENT DES MACROMOLÉCULES

L'hémoglobine des érythrocytes et l'albumine (Alb) du plasma (trois pools comprenant deux échantillons individuels de plasma par pool) ont été obtenues selon les méthodes de Riggs (1981) et Viau *et al.* (1993), respectivement, avec des modifications mineures (Padrós *et al.*, 2000 ; Padrós et Pelletier, 2001). La globine (Gb) a été séparée de l'hème par précipitation avec de l'acétone contenant HCl 5 mM, selon la méthode d'Ascoli *et al.* (1981). L'ADN du foie a été isolé selon la méthode de Gupta (1984) avec quelques modifications mineures. La concentration d'ADN a été déterminée par lecture spectrophotométrique à 260 nm. Les échantillons ont été conservés à -80 °C.

2.8. ANALYSES CHIMIQUES

Les adduits spécifiques entre le BaPDE et la Gb, l'Alb et l'ADN du foie ont été quantifiés sous forme de BaP tétrols par HPLC/fluorescence (Padrós et Pelletier, 2001). Le TBT ainsi que ses produits de dégradation DBT et MBT dans la bile (deux pools correspondant à trois échantillons individuels de bile par pool) ont été détectés et quantifiés par GC-MS (ITD) tel que décrit précédemment (Padrós *et al.*, 2000).

2.9. ANALYSES HISTOPATHOLOGIQUES

Trois poissons par groupe ont été examinés. Pour la microscopie optique, de petites tranches de tissus (2-3 mm d'épaisseur) étaient fixées dans une solution Bouin, déshydratées et montées en paraffine suivant les techniques histologiques habituelles. Les sections microscopiques (5 µm) étaient colorées à l'hématoxyline et l'éosine.

2.10. ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses des données ont été réalisées à l'aide du logiciel SigmaStat®. En premier lieu, la normalité de la distribution de la population était testée pour chacune des variables mesurées par un test de Kolmogorov-Smirnov. Si nécessaire, les données étaient transformées (\log_{10} ou rang). L'homogénéité des variances était ensuite vérifiée par le Levene Median Test. Dans un premier temps, une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs (traitement et temps) a été utilisée. Les résultats ont montré que pour la plupart des paramètres biochimiques, le facteur temps a eu un effet significatif. Afin d'augmenter la puissance du test statistique, les données des différents groupes ont été analysées séparément pour chaque jour d'échantillonnage en utilisant un ANOVA à deux facteurs (BaP et TBT) suivi d'un test de Student-Newman-Keuls. Dans tous les cas, le seuil de significativité a été fixé à $P < 0,05$.

3. RÉSULTATS

La mortalité pendant l'expérience a été $< 10\%$ et aucune différence n'a été observée entre les différents traitements. Les anesthésies et les injections i.p. n'ont pas incommodé les poissons puisque nous n'avons remarqué aucun changement évident dans leur comportement ou leur apparence, aussi bien pour les poissons traités que pour les poissons témoins. Tout au long de l'expérience, nous n'avons observé aucune différence entre les traitements quant aux indices de condition corporelle, du foie ou de la rate (données non présentées).

3.1. EFFETS INTERACTIFS DU BaP ET DU TBT SUR L'ACTIVITÉ DU P4501A

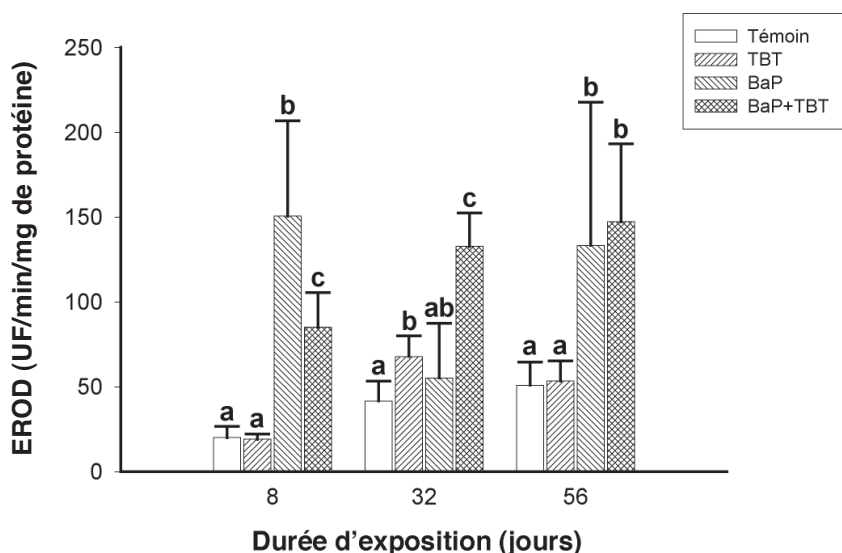
Le P4501A catalyse le métabolisme et la bioactivation du BaP. Par conséquent, nous avons mesuré l'activité du P4501A hépatique en mesurant l'activité de l'EROD, laquelle est catalysée spécifiquement par le P4501A. La figure 6.4 présente l'évolution des effets interactifs du BaP et du TBT sur l'activité de l'EROD. Après deux injections (jour 8), le BaP seul induit l'EROD 7,5 fois plus que le groupe témoin, alors que le TBT seul n'affecte pas l'EROD. Cependant, la présence simultanée de BaP et de TBT atténue significativement l'induction de l'EROD (43 %) relativement à celle observée en présence de BaP seul. Après six injections (jour 32), on observe le phénomène inverse, c'est-à-dire que l'EROD n'est pas affectée par la présence de BaP seul mais qu'elle est induite 1,6 fois par le TBT seul. De plus, cette modeste induction est augmentée de deux fois lorsque le BaP est coprésent. Enfin, après dix injections (jour 56), le BaP seul induit l'activité de l'EROD 2,6 fois, mais le TBT seul n'affecte pas cette activité. Contrairement aux jours 8 et 32, la présence simultanée du TBT n'affecte pas l'activité de l'EROD observée en présence de BaP seul.

3.2. EFFETS DU TBT SUR LE MÉTABOLISME DU BaP

Les données sur l'EROD suggèrent que la présence simultanée de TBT diminue tout d'abord, augmente ensuite et, finalement, n'affecte plus le métabolisme du BaP après respectivement 8, 32 et 56 jours d'exposition répétée à ces deux xénobiotiques. Dans le but de vérifier cette première observation, nous avons quantifié les métabolites de BaP dans la bile comme un indicateur du métabolisme global du BaP (tableau 6.1). Les résultats montrent qu'au jour 8 la présence de TBT abaisse de 43 % la concentration de métabolites biliaires de BaP relativement à celle observée en présence de BaP seul. En revanche, la présence de TBT augmente de 60 % la quantité de métabolites de BaP au jour 32. Enfin au jour 56, aucune différence n'est observée entre les groupes ayant reçu le BaP seul ou une combinaison TBT + BaP. Les données sur les métabolites biliaires du BaP apparaissent donc en étroit accord avec celles de l'EROD.

Figure 6.4

Effets interactifs du BaP et du TBT sur l'activité de l'EROD hépatique (UF/min/mg de protéine)*



* Les poissons ont été exposés soit au BaP seul (3 mg/kg), soit au TBT seul (0,3 mg/kg), ou à une combinaison des deux composés. Les témoins ont reçu seulement l'huile de maïs comme véhicule. Les données sont présentées comme des moyennes \pm erreur type de la moyenne (n = six poissons par traitement et par jour d'échantillonnage). Les données d'un même jour d'échantillonnage surmontées de lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$; ANOVA suivi d'un test de Student-Newman-Keuls).

3.3. EFFETS DU TBT SUR LA BIOACTIVATION DU BaP

La bioactivation du BaP par le P4501A génère des métabolites du type BaPDE qui sont capables de se lier de façon covalente à l'ADN et aux protéines sanguines telles que l'albumine et la globine. Par conséquent, nous avons évalué la bioactivation du BaP en mesurant la formation d'adduits spécifiques entre le BaPDE et l'ADN du foie, l'Alb et la Gb (tableau 6.2). Tout au long de l'expérience nous n'avons détecté que le BaP tétrol I-1, ce qui indique la formation d'adduits exclusivement via le (+)-*anti*-BaPDE (Koreeda *et al.*, 1978). D'après les données sur l'EROD et les métabolites biliaires du BaP, on s'attendait à ce que la présence de TBT réduise (jour 8), augmente (jour 32) et n'affecte pas (jour 56) la formation d'adduits entre le BaPDE et les macromolécules. Les données présentées au tableau 6.2 montrent qu'au jour 8 la présence de TBT inhibe de 53 % la formation d'adduits entre le (+)-*anti*-BaPDE et l'Alb. Au jour 32, le niveau d'adduits entre le (+)-*anti*-BaPDE et l'Alb ou la Gb chez les poissons traités avec le BaP seul est comparable au niveau de ceux traités avec le BaP et le TBT. Par contre, les adduits à l'ADN (détectés seulement au jour 32) sont diminués de 27 % en présence du TBT. Au jour 56, la présence de TBT diminue les adduits à l'Alb et à la Gb de 50 et 58 %, respectivement. Par conséquent, à l'exception du jour 8, les données sur les adduits ne sont pas en accord avec les données sur l'EROD et les métabolites du BaP.

Tableau 6.1
Effets du TBT sur la concentration biliaire
de métabolites du BaP (µg/mg de protéine)

Traitement	Nombre de jours d'exposition		
	8	32	56
BaP	112,6 ± 12,7	81,5 ± 17,9	120,7 ± 15,7
BaP + TBT	64,6 ± 9,9 ^a	130,7 ± 12,0 ^a	121,1 ± 8,2

a Résultat significativement différent de la valeur pour le BaP au même jour d'échantillonnage ($P < 0,05$; ANOVA suivi d'un test de Student-Newman-Keuls). n = 6 poissons par traitement et par jour d'échantillonnage.

Source : Padrós (2001).

Tableau 6.2

Effets du TBT sur la formation *in vivo* des adduits à l'albumine (Alb), à la globine (Gb) et à l'ADN (pg BaP tétrol l-1/mg de macromolécule)

Adduits (+)- <i>anti</i> -BaPDE				
Jour	Traitement	Alb	Gb	ADN ^a
8	BaP	2,08 ± 0,18 (4)	0,159 ± 0,038 (4)	n.d. ^b
	BaP+TBT	0,97 ± 0,85 (4) ^c	0,130 ± 0,064 (4)	n.d.
	% d'inhibition	53	18	—
32	BaP	1,03 ± 0,60 (3)	0,155 ± 0,039 (5)	4,0
	BaP+TBT	1,05 ± 0,07 (3)	0,181 ± 0,028 (6)	2,9
	% d'inhibition	0	0	27
56	BaP	0,88 ± 0,13 (4)	0,461 ± 0,078 (4)	n.d.
	BaP+TBT	0,44 ± 0,14 (4) ^c	0,194 ± 0,047 (4) ^c	n.d.
	% d'inhibition	50	58	—

^a Pour chaque traitement, l'ADN de 3 poissons a été regroupé (n = 2 groupes par traitement). Les données représentent la moyenne de deux analyses ; la gamme de variation des valeurs par groupe était inférieure à ±10 % de la moyenne.

^b Non détecté.

^c Résultat significativement inférieur au BaP seul ($P < 0,05$; ANOVA suivi d'un test de Student-Newman-Keuls).

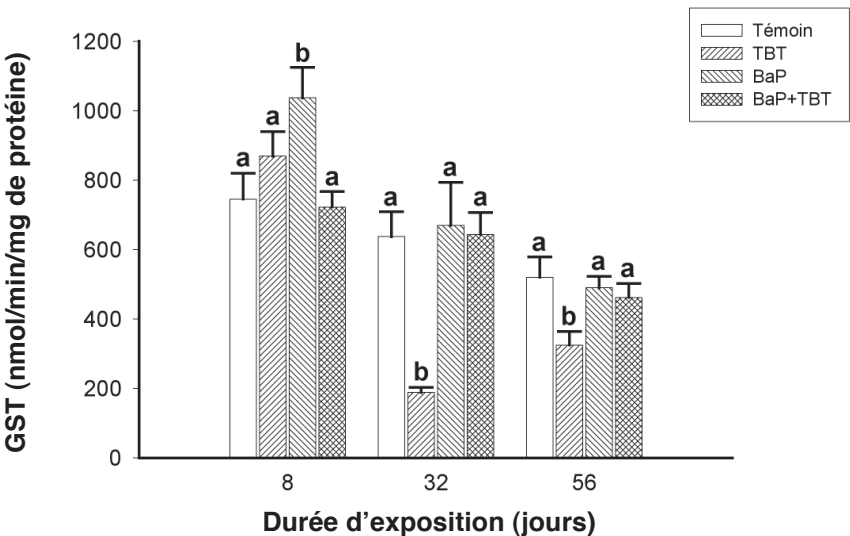
Source : Padrós (2001).

3.4. EFFETS INTERACTIFS DU BaP ET DU TBT SUR LES ACTIVITÉS DE LA GST ET DE LA GR HÉPATIQUES

Une modulation de l'activité de la GST hépatique peut affecter la détoxification des métabolites cancérogènes du type BaPDE via leur conjugaison avec le glutathion. C'est pourquoi nous avons également mesuré les effets du BaP et du TBT sur l'activité de la GST (figure 6.5). La présence de BaP seul induit l'activité de la GST à 39 % au jour 8. Bien que le TBT seul n'affecte pas l'activité de la GST, sa présence inhibe l'induction de la GST due au BaP. Aux jours 32 et 56, le TBT seul inhibe l'activité de la GST de 70 et 38 %, respectivement. Toutefois, la présence de BaP élimine ces effets inhibiteurs, même si le BaP seul n'affecte pas l'activité de la GST.

Figure 6.5

Effets interactifs du BaP et du TBT sur l'activité de la GST hépatique (nmol/min/mg de protéine) dans le foie



Source : Padrós (2001).

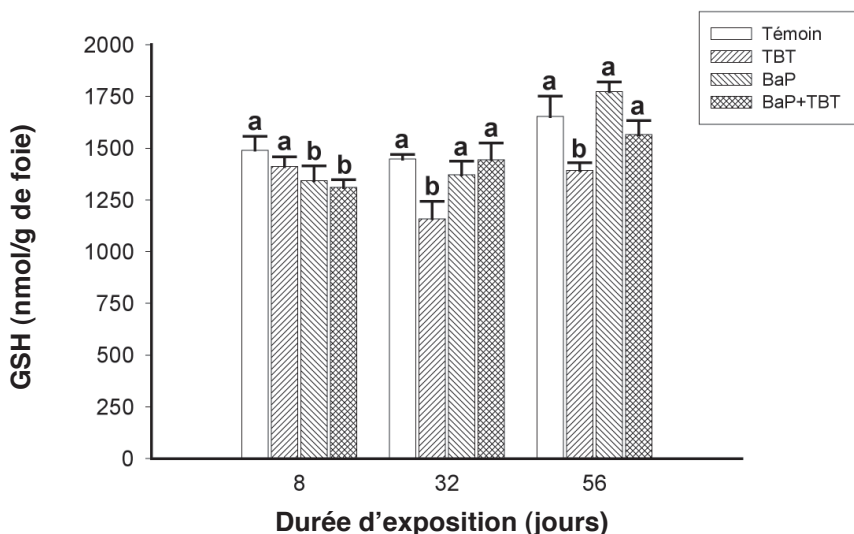
La GR est une autre enzyme à considérer, car elle contrôle les niveaux du glutathion réduit dans la cellule. À ce propos, aucun polluant (seul ou combiné) n'a affecté l'activité de cette enzyme par rapport à celle observée dans le groupe témoin (données non présentées) et ce, tout au long de l'expérience.

3.5. EFFETS INTERACTIFS DU BaP ET DU TBT SUR LE GLUTATHION

La figure 6.6 montre qu'au jour 8, le BaP seul abaisse de 10 % les niveaux du glutathion. Le TBT seul, par contre, n'affecte pas le glutathion. De plus, sa présence n'a aucun effet sur la diminution provoquée par le BaP. Aux jours 32 et 56, le BaP n'affecte plus le glutathion, mais le TBT réduit sa concentration de 24 et 16 %, respectivement. Cependant, la présence de BaP semble bien éliminer la diminution du glutathion provoquée par le TBT.

Figure 6.6

Effets interactifs du BaP et du TBT sur le contenu en GSH (nmol/g de tissu) dans le foie



Source : Padrós (2001).

3.6. EFFETS DU BaP SUR LE MÉTABOLISME DU TBT

Les analyses détaillées en GC/MS de la bile aux jours 8 et 32 montrent que la présence de BaP n'affecte ni la concentration, ni le profil métabolique du TBT (tableau 6.3). En effet, autant chez les poissons traités avec le TBT seul ou en combinaison avec le BaP, le MBT et le DBT sont présents en plus grande concentration que le TBT. Toutefois, au jour 56, la concentration de butylétains est presque doublée en présence de BaP. De plus, la proportion de butylétains semble aussi modifiée par la présence de BaP. Alors que le TBT représente seulement 4 % des butylétains lorsqu'il est administré seul, il compte pour 18 % lorsque le BaP est aussi présent.

Tableau 6.3

Effets du BaP sur la concentration biliaire des composés butylétains (ng Sn/g de bile)
La distribution relative des butylétains est donnée entre parenthèses.

Jour	Traitement	TBT	DBT	MBT	ΣBTs
8	TBT	10,2 (6,6-13,9) (13 %)	22,6 (21,6-23,7) (30 %)	43,5 (38,2-48,9) (57 %)	76,4 (73,7-79,1) (100 %)
	TBT+BaP	23,2 (19,2-27,1) (23 %)	26,6 (25,8-27,4) (26 %)	52,9 (49,1-56,7) (51 %)	102,7 (101,7-103,6) (100 %)
32	TBT	21,8 (15,9-27,6) (10 %)	84,9 (81,9-88,0) (39 %)	101,1 (99,1-121,2) (51 %)	216,9 (203,1-230,7) (100 %)
	TBT+BaP	8,0 (2,5-13,6) (5 %)	84,5 (61,4-107,7) (48 %)	83,1 (75,0-91,2) (47 %)	175,7 (138,9-212,4) (100 %)
56	TBT	9,7 (6,2-13,2) (4 %)	102,0 (74,2-129,9) (48 %)	102,2 (61,7-142,5) (48 %)	214,0 (142,1-285,8) (100 %)
	TBT+BaP	72,4 (29,8-115,1) (18 %)	166,8 (159,7-173,9) (42 %)	162,0 (148,4-175,7) (40 %)	

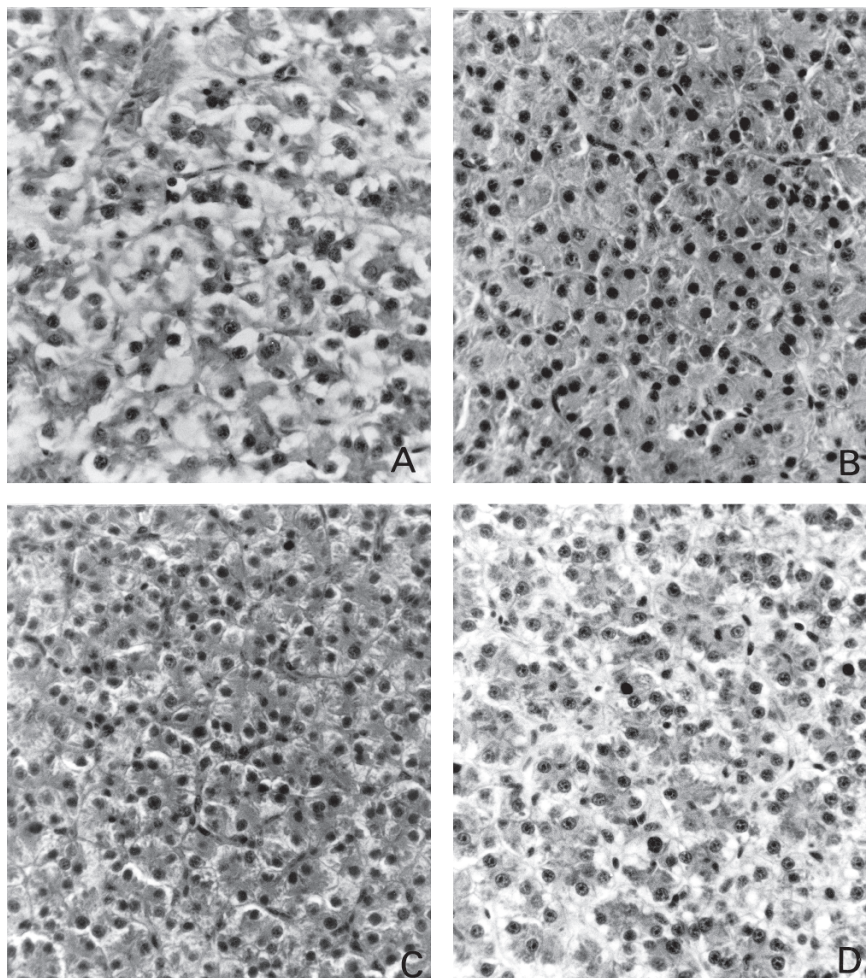
Source : Padrós (2001).

**3.7. EFFETS INTERACTIFS DU BaP ET DU TBT
SUR L’HISTOPATHOLOGIE DU TISSU HÉPATIQUE**

Dans les groupes exposés aux polluants, le foie montrait des lésions dès le jour 8. Quatre types de lésions ont été observés : nécroses, foyers de régénération, pléiomorphisme nucléaire et foyers d’altération cellulaire. Les lésions nécrotiques et dégénératives (nécroses hépatocellulaires) variaient en sévérité de pycnoses et foyers localisés d’hyalinisation cytoplasmique à des régions multifocales ou diffuses de nécrose de coagulation. Des foyers de régénération hépatocellulaire étaient présents parmi les régions nécrotiques. Un seul type de foyer d’altération cellulaire (FAC ; une lésion préneoplasique), le foyer éosinophile, a été détecté. Ces différents types de lésions hépatiques étaient présents dans tous les groupes exposés au polluants. Cependant, la fréquence de ces lésions était différente, les lésions étant nombreuses chez les poissons exposés au BaP seul, moyennement nombreuses chez ceux exposés au TBT seul et peu nombreuses chez les individus exposés simultanément au BaP et au TBT (tableau 6.4). De plus, l’observation des coupes microscopiques montrent des différences notables entre le foie des poissons exposés au TBT seul et au BaP seul par rapport au groupe témoin et au groupe exposé au TBT + BaP (figure 6.7). Les réserves lipidiques apparaissant comme des espaces libres en gris clair sont nettement plus élevées pour le groupe témoin et le

Figure 6.7

Coupes microscopiques (5 μ m) du foie de *Salvelinus alpinus* exposé à 6 doses successives, soit de TBT, soit de BaP, ou encore de TBT + BaP, colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (agrandissement 400 \times).



A) Groupe témoin. On observe de nombreux espaces libres en gris clair dans le cytoplasme. Cette observation est normale pour le foie des poissons téléostéens en santé dont les réserves lipidiques sont éliminées par les solvants organiques lors de la préparation des coupes. B) Groupe avec BaP seul. L'altération du tissu est mise en évidence par la réduction drastique des espaces libres et l'accroissement de la densité cytoplasmique. C) Groupe avec TBT seul. De façon similaire au groupe avec BaP seul, on y observe une croissance très marquée de la densité du cytoplasme et la réduction des espaces occupés par les lipides. D) Groupe avec TBT + BaP. On remarque que la condition générale du tissu est similaire à celle du groupe témoin, avec beaucoup d'espaces cytoplasmiques libres distribués sur l'ensemble de la coupe.

groupe TBT + BaP que pour les deux autres. Une quantification de ces zones par analyse d’images (Sigma Scan Pro5®) permet de mettre en lumière ces différences (figure 6.8). Les espaces libres sont plus de deux fois plus importants chez le groupe témoin et le groupe exposé au TBT + BaP et comparables entre eux.

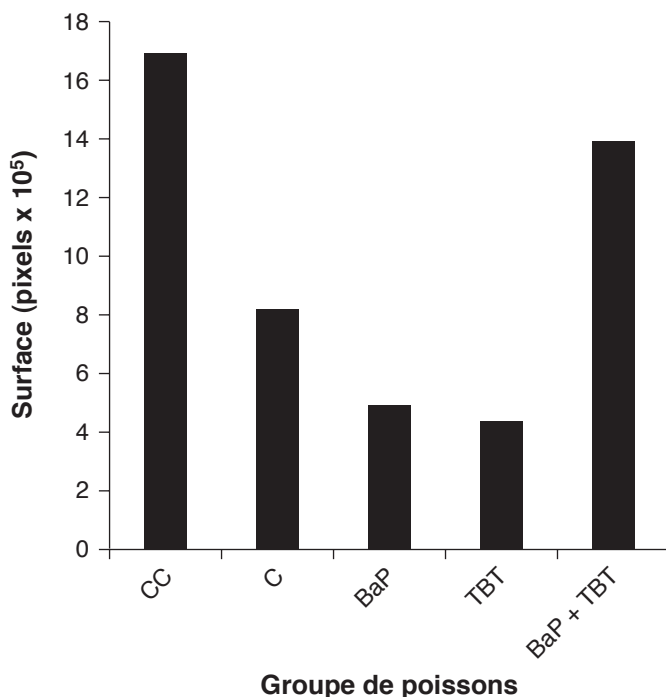
Tableau 6.4

Nature et incidence des effets morphologiques observés dans le foie de *Salvelinus alpinus* exposé à six doses de TBT, de BaP ou de TBT + BaP

	Groupe témoin	Groupe avec BaP	Groupe avec TBT	Groupe avec TBT + BaP
Nécrose	-	++++	+++	++
Pycnose	-	+++	++	+++
Hépatocytes tumescents	-	+++	++	++
Réponse inflammatoire	-	++++	+++	++
Forme irrégulière du noyau	-	+	++	+
Hyalinisation cytoplasmique	-	+++	++	++

4. DISCUSSION

L’objectif principal de ce travail était d’examiner *in vivo* les interactions métaboliques potentielles entre le BaP et le TBT chez des poissons exposés de façon répétée à de faibles doses de ces polluants, doses compatibles avec des environnements naturels contaminés mais encore tout à fait viables pour des espèces sensibles comme les salmonidés, même si le mode d’administration directe par injection n’était pas naturel. La pertinence des doses choisies ainsi que l’intervalle d’exposition se sont reflétés dans les concentrations de TBT et de métabolites de BaP mesurées dans la bile des poissons traités. En effet, ces concentrations sont en tout point comparables à celles mesurées dans des poissons exposés *in situ* au TBT (Senthilkumar *et al.*, 1999) ou au BaP (Lin *et al.*, 1996). De plus, il est important de noter que ces concentrations augmentent avec le temps d’exposition, démontrant ainsi que ni le TBT ni le BaP n’ont été éliminés de l’organisme entre des injections successives.

Figure 6.8**Distribution des aires non colorées du cytoplasme**

Cette distribution est déterminée sur des coupes histologiques du foie des poissons témoins (CC = témoin sans véhicule (huile de maïs) injecté et C = témoin avec véhicule injecté) et de ceux exposés pendant 32 jours, soit au TBT, soit au BaP, ou encore au BaP + TBT. Les aires non colorées par le traitement à l'hématoxyline et l'éosine sont associées à la présence de réserves lipidiques dans le cytoplasme.

Afin de mieux comprendre le ou les mécanismes et les effets des interactions BaP + TBT, nous avons mesuré plusieurs biomarqueurs à différents niveaux de complexité biologique. Les principaux résultats de cette étude peuvent se résumer en quelques points qui seront repris un à un dans la suite de cette discussion :

- la présence du TBT inhibe la bioactivation du BaP ;
- la présence du TBT module l'induction du P4501A et inhibe l'induction de la GST provoquées par le BaP ;
- le TBT seul induit temporairement le P4501A, mais il inhibe de façon persistante la GST et le glutathion ;

- la présence de BaP élimine les effets inhibiteurs du TBT envers la GST et le glutathion ;
- la présence de TBT + BaP a un effet protecteur mutuel envers leurs effets toxiques individuels au niveau du foie ;
- le BaP stimule à la fois ou séparément le métabolisme et l'excrétion du TBT.

4.1. INHIBITION DE LA BIOACTIVATION DU BaP PAR LE TBT

L'analyse des adduits formés spécifiquement par le (+)-anti-BaPDE démontre qu'une exposition répétée à de faibles doses de TBT peut inhiber la bioactivation *in vivo* du BaP. Bien qu'on ait observé un manque de concordance entre les différents types d'adduits mesurés, il faut noter que ces adduits ont des cinétiques de formation et d'élimination très différentes. Par conséquent, il n'existe fort probablement aucune relation linéaire entre leurs différentes concentrations, notamment à la suite d'expositions répétées à de faibles doses de BaP (Meyer et Bechtold, 1996). Ce point doit être considéré lors de l'interprétation des résultats de cette expérience.

L'antagonisme observé semble dû en partie à une altération par le TBT de la phase I du métabolisme du BaP via une modulation chronologique de l'activité du P4501A. En effet, après huit jours d'exposition le TBT inhibait l'induction du P4501A due au BaP, ce qui explique l'inhibition simultanée du métabolisme et de la bioactivation du BaP (adduits à l'Alb). Ces résultats sont tout à fait comparables à ceux observés lors de la première expérience *in vivo* utilisant une dose unique élevée (10 mg/kg) de TBT et de BaP (Padrós *et al.*, 2000) et une autre espèce de salmonidé (*Salvelinus fontinalis*). Donc, l'effet inhibiteur du TBT ne semble pas dépendre de la dose employée. Il est intéressant de noter qu'aucune interaction n'a été observée au niveau des adduits à la Gb (exposition systémique). Cette observation concorde avec l'idée que l'Alb est plus disponible que la Gb pour former des adduits avec le BaPDE, car elle est synthétisée dans le foie tout comme le BaPDE. Il faut également noter que l'inhibition de la bioactivation du BaP a été observée malgré l'inhibition simultanée par le TBT de l'induction de la GST due au BaP. Nous spéculons que cet effet n'a pas eu de conséquences en raison de la moindre formation de BaPDE.

À l'inverse, après 32 jours d'exposition la présence du TBT provoquait une augmentation de l'induction du P4501A due au BaP. Bien que cette potentiation était associée avec une augmentation simultanée du métabolisme du BaP, elle n'était pourtant pas associée à une augmentation de sa bioactivation (adduits aux protéines sanguines). De plus, la

formation d'adduits à l'ADN hépatique était inhibée par la présence du TBT. Ces résultats démontrent que la potentiation de l'induction du P4501A provoquée par la présence du TBT a favorisé une plus grande détoxification du BaP, même si la GST (phase II du métabolisme), la GR ou les niveaux du glutathion hépatique n'étaient pas simultanément induits. Une autre explication serait que les niveaux constitutifs de la GST chez l'omble chevalier sont suffisants pour conjuguer une plus grande formation de métabolites BaPDE. Enfin, puisque les adduits à l'ADN du foie semblent avoir chez certaines espèces de poisson une demi-vie longue (plusieurs semaines ; Varanasi *et al.*, 1989b), leurs niveaux au jour 32 pourraient refléter leur formation pendant les jours précédents et ainsi, pas nécessairement associés aux activités de l'EROD mesurées le jour 32.

En revanche, l'inhibition de la bioactivation du BaP (adduits aux protéines sanguines) observée après 56 jours d'exposition ne peut pas être expliquée par des effets modulateurs du TBT sur l'activité du P4501A, de la GST, la GR ou les niveaux du glutathion hépatique. Il est clair que d'autres processus doivent être examinés afin de mieux comprendre l'effet inhibiteur du TBT sur la bioactivation du BaP *in vivo*, comme par exemple :

- les effets inhibiteurs ou inducteurs du TBT sur d'autres voies enzymatiques reliées respectivement à la bioactivation (l'époxyde hydrolase) et la détoxification (les UDP-glucuronosyltransférases et les sulfotransférases) du BaP ;
- la capacité du TBT à diminuer l'absorption hépatique de BaP ;
- la capacité du TBT à induire l'activité des transporteurs membranaires P-glycoprotéines qui peuvent augmenter l'élimination du BaP des hépatocytes ;
- les effets du TBT sur la biodistribution du BaP via les protéines plasmatiques.

Nos résultats soulignent l'importance de tester des interactions *in vivo* entre des HAP précancérogènes comme le BaP et d'autres polluants au-delà de l'activité du P4501A, car une augmentation de l'induction du P4501A ne s'accompagne pas nécessairement d'une plus grande bioactivation du BaP. En fait, puisque le P4501A est simultanément responsable de la bioactivation et de la détoxification du BaP, il est impossible de prédire les conséquences toxicologiques d'une augmentation de l'induction du P4501A. Il faut toutefois noter que le TBT seul a inhibé l'activité de la GST hépatique ainsi que les niveaux du glutathion du foie. De plus, après huit jours d'exposition le TBT a également inhibé l'induction de la GST due au BaP. Puisque les activités enzymatiques constitutives des phases I et II du métabolisme varient fortement entre les différentes espèces de poissons, il serait important d'examiner les effets interactifs du TBT sur la bioactivation du BaP chez d'autres poissons,

notamment ceux qui semblent particulièrement sensibles aux effets cancérogènes des HAP comme la sole anglaise (*Parophrys vetulus*; Schiewe *et al.*, 1991).

4.2. POTENTIATION DU MÉTABOLISME ET/OU DE L'EXCRÉTION DU TBT PAR LE BaP

Tel qu'observé dans notre première étude *in vivo* à court terme de 48 h (Padrós *et al.*, 2000), la présence de BaP a stimulé le métabolisme du TBT. Cependant, cette interaction n'a été observée qu'après 56 jours d'exposition, ce qui semble dû à la plus faible concentration de BaP utilisée dans la présente étude. L'augmentation du métabolisme du TBT en présence du BaP pourrait être expliquée d'une part, par une interaction entre ces deux polluants au niveau de la phase II du métabolisme du TBT. En effet, nous avons observé que les poissons exposés simultanément au TBT et au BaP ne montraient ni inhibition de l'activité de la GST, ni diminution des niveaux du glutathion hépatique, comme c'était le cas pour les poissons exposés au TBT seul. Donc, la présence de BaP permettrait la détoxification du TBT par une conjugaison plus importante des métabolites DBT et MBT avec le glutathion.

D'autre part, puisque le P450 est responsable du métabolisme du TBT, il nous paraît raisonnable de spéculer que le BaP pourrait également altérer la phase I du métabolisme du TBT, en induisant une isoenzyme du P450 impliquée dans le métabolisme du TBT. Malheureusement, on ignore encore quelle ou quelles isoenzymes du P450 catalysent le métabolisme du TBT. Nos résultats démontrent toutefois que l'isoforme P4501A n'est pas impliquée de façon importante dans le métabolisme du TBT. En effet, la plus grande induction du P4501A provoquée par la présence simultanée du TBT au jour 32 ne s'est pas accompagnée d'une stimulation concomitante du métabolisme du TBT. De plus, dans notre expérience *in vivo* antérieure (Padrós *et al.*, 2000), le TBT a inhibé complètement l'induction du P4501A due au BaP, mais celui-ci a quand même stimulé le métabolisme du TBT. Ces deux observations laissent à penser que le BaP aurait induit une isoenzyme autre que le P4501A qui serait impliquée dans le métabolisme du TBT.

Un examen de la littérature nous porte à croire que le P4503A pourrait jouer un rôle majeur dans le métabolisme du TBT. En effet, des études chez des mammifères ont montré que le P4503A4 peut métaboliser le BaP et aussi être activé par le BaP (Shou *et al.*, 1994a). On a récemment démontré l'existence d'un gène P4503A chez le poisson (*Fundulus heteroclitus*) (Celander et Stegeman, 1997). De plus, la truite arc-en-ciel possède un P450 (P4503A27 ou LMC5) dont la structure et l'activité catalytique sont

étroitement reliées au P4503A4 des humains (Miranda *et al.*, 1991). Enfin, on sait que le P4503A possède un large site actif lui permettant de se lier à des composés globulaires (Lewis *et al.*, 1998), comme le TBT, et capable même d'accepter deux substrats simultanément (Shou *et al.*, 1994b). D'autres études *in vitro* et *in vivo* seront nécessaires afin de vérifier : a) si le P4503A chez le poisson est responsable de la métabolisation du TBT et b) si le P4503A peut être induit par le BaP, toujours chez le poisson.

Enfin, nous ne pouvons pas écarter complètement la possibilité que des processus autres que le métabolisme de phase I ou II, comme par exemple une modulation de l'excrétion biliaire (Donohoe *et al.*, 1998), soient en partie responsables de la plus grande concentration de butylétains dans la bile des poissons traités par l'injection simultanée de BaP et de TBT. Quels que soient le ou les mécanismes à la base de cette interaction antagoniste, il est probable que les conséquences toxicologiques soient bénéfiques, car le DBT et le MBT sont généralement considérés moins toxiques que le TBT. Comme nous l'avons vu à la section 4.5, les analyses histologiques semblent bien confirmer cette hypothèse.

4.3. EFFET MODULATEUR DU TBT SUR L'ACTIVITÉ DU P4501A

Tous les travaux antérieurs *in vitro* sur des microsomes hépatiques ou des lignées cellulaires bien spécifiques ont conduit leurs auteurs à considérer le TBT comme un inhibiteur de la teneur en P450 et de ses activités catalytiques associées. Or, pendant notre expérience *in vivo*, l'effet inhibiteur du TBT sur l'activité du P4501A n'a jamais été observé. Cette absence d'effets inhibiteurs du TBT envers plusieurs activités catalytiques dépendantes du P450 (EROD, AHH, ECOD) a toutefois déjà été rapportée dans toutes les études *in vivo* réalisées jusqu'à présent, autant chez des mammifères que chez des poissons (voir Padrós *et al.*, 2000 et travaux cités).

Au contraire d'une inhibition, nous avons observé que l'exposition répétée à de faibles doses de TBT peut induire l'activité du P4501A, confirmant ainsi des résultats obtenus récemment chez une autre espèce de poisson, *Ictalurus punctatus* (Rice et Roszell, 1998). Par ailleurs, des travaux chez le crabe *Callinectes sapidus* montrent qu'une exposition de 16 jours au TBT via la nourriture induit une protéine ayant une réactivité croisée avec l'anticorps P4503A du poisson *Stenotomus chrysops* (Oberdörster *et al.*, 1998). Cette induction est associée à une plus grande hydroxylation de la testostérone à la position 6 β , une activité enzymatique catalysée par le P4503A chez les vertébrés. Donc, l'ensemble de ces résultats démontre que le TBT à des doses réalistes d'un point de vue environnemental ne

doit plus être considéré comme un inhibiteur *in vivo* de l'activité catalytique du P450, mais plutôt comme un inducteur potentiel de l'activité du P4501A et d'autres isoenzymes du P450.

Le ou les mécanismes à la base de cette induction restent cependant obscurs. L'induction du P4501A est un mécanisme contrôlé par le récepteur Ah. Or, le TBT ne possède pas la structure plane typique des ligands du récepteur Ah mais une structure de type pyramidal (figure 6.1) qui devrait difficilement trouver sa place sur un récepteur planaire. Cependant, il a été récemment rapporté qu'une exposition chronique au 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphényle, un BPC de structure globulaire, peut induire le P4501A ARNm, la protéine et les activités associées de l'EROD et de l'AHH chez *Oncorhynchus mykiss* (Da Costa et Curtis, 1995 ; Foster *et al.*, 1998). Au niveau post-transcriptionnel, le TBT pourrait former un complexe avec la protéine P4501A qui pourrait stabiliser la dégradation de l'enzyme et ainsi prolonger sa durée de vie. Un tel mécanisme est à la base de l'induction du P4501A2 par l'isosafrrole chez le rat (Voorman et Aust, 1988).

Nous observons également que le TBT a la capacité de moduler l'induction du P4501A due à la présence du BaP. Cet effet semble dépendre du temps d'exposition au TBT. En effet, alors que, chez les poissons ayant reçu deux faibles doses de TBT, l'induction du P4501A était inhibée, après six injections le TBT a augmenté l'induction du P4501A. Des résultats *in vivo* similaires ont été notés chez la souris et chez une autre espèce de poisson (*Ictalurus punctatus*) exposée de façon répétée à de faibles doses de TBT et de BPC-126 (DeLong et Rice, 1997 ; Rice et Roszell, 1998). Une modulation de l'induction du P4501A a aussi été observée *in vitro*. Le TBT a augmenté l'induction de l'EROD due au BPC-126 chez des lignées de cellules hépatomes de rat (H4IIE ; Kannan *et al.*, 1998), mais inhibé l'induction de l'EROD due au 3-méthylcholanthrène chez des lignées de cellules hépatomes de poisson (PLHC-1 ; Brüscheiler *et al.*, 1996).

À l'heure actuelle, nous ne pouvons que soumettre quelques hypothèses pour expliquer les effets inhibiteurs ou stimulateurs du TBT envers l'induction du P4501A. D'une part, l'inhibition de l'induction du P4501A pourrait avoir pour cause : a) la compétition entre le BaP et le TBT pour le site actif du P4501A ; b) la dégradation directe de la protéine P4501A par le TBT ; ou encore c) la compétition entre le BaP et le TBT pour la liaison avec le récepteur Ah. D'autre part, l'augmentation (potentiation ou synergisme) de l'induction du P4501A pourrait s'expliquer par : a) l'induction du récepteur Ah ; b) la régulation post-transcriptionnelle du P4501A (p. ex., la stabilisation de l'enzyme) ; c) la sécrétion de glucocorticoïdes endogènes (p. ex., le cortisol) ; ou d) la modulation des protéines kinases. On ne dispose pas des données nécessaires pour départager ces diverses

hypothèses mécanistiques, mais les cultures primaires d'hépatocytes fraîchement isolés et les lignées de cellules hépatomes de poisson telles que la PLHC-1 seraient d'excellents modèles *in vitro* permettant de clarifier le mode d'action du TBT quant à l'induction du P4501A.

4.4. DIMINUTION DE L'ACTIVITÉ DE LA GST ET DU GLUTATHION ET EFFET PROTECTEUR DU BaP

À notre connaissance, les effets inhibiteurs du TBT sur l'activité hépatique basale et l'induction de la GST ainsi que sur la concentration du glutathion du foie n'ont été préalablement examinés dans une expérience *in vivo* sur aucune espèce animale. À la différence de l'effet inducteur transitoire du TBT sur l'activité du P4501A, ces effets inhibiteurs semblent persistants, car ils étaient toujours détectés après presque deux mois d'exposition au TBT. En ce qui concerne la GST, nos résultats corroborent des études *in vitro* montrant une puissante inhibition de l'activité GST hépatique par le TBT chez le rat (Henry et Byington, 1976) et le poisson (Al-Ghais et Ali, 1999). De plus, il a été montré que l'inhibition est du type compétitif lorsqu'on utilise le DCNB comme substrat pour la GST (Henry et Byington, 1976), ce qui indique que le TBT agit au niveau du site actif de l'enzyme. Ce résultat suggère que l'inhibition de l'induction de la GST due à la présence du BaP observée au jour 8 est provoquée par une compétition entre le BaP et le TBT pour le site actif de la GST.

L'inhibition des niveaux du glutathion hépatique par le TBT concorde avec l'observation que le TBT induit une diminution importante et rapide des thiols libres intracellulaires, notamment le glutathion, chez des hépatocytes isolés de truite arc-en-ciel (Reader *et al.*, 1993). Toutefois, la déplétion du glutathion par le TBT contraste clairement avec l'effet stimulateur provoqué par d'autres polluants aquatiques. En effet, les poissons exposés en laboratoire à des métaux lourds, des hydrocarbures, des pesticides, des effluents d'usines de pâte à papier ou des extraits organiques, provenant de sédiments contaminés ou exposés sur le terrain à des mélanges complexes de contaminants, montrent dans tous les cas une augmentation du taux de glutathion hépatique (voir Nishimoto *et al.*, 1995 et travaux cités).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer la diminution du taux de glutathion hépatique par le TBT. Premièrement, cet effet pourrait être dû à un taux plus élevé d'utilisation du glutathion via des réactions catalysées par la GST ou la glutathion peroxydase. Cependant, nos données montrent que l'activité de la GST était simultanément inhibée par le TBT, ce qui élimine cette possibilité. Bien que l'activité de la glutathion peroxydase n'ait pas été mesurée dans notre étude, on sait que d'autres

triorganoétains tels que le triéthylétain et le triphénylétain n'affectent pas cette enzyme chez le rat. Deuxièmement, le TBT aurait pu diminuer la synthèse ou la régénération du glutathion, des processus catalysés respectivement par la γ -glutamylcystéine et la glutathion réductase. Bien que la synthèse du glutathion n'ait pas été examinée, la glutathion réductase n'a jamais été inhibée par le TBT au cours de cette expérience. Enfin, la diminution du taux de glutathion pourrait être due à une oxydation directe par les ions TBT. Toutefois, l'interaction du TBT avec certains thiols cellulaires reste mal comprise, certaines études indiquant une faible affinité pour les thiols alors que d'autres rapportent une affinité importante. Par conséquent, d'autres études sont nécessaires afin de déterminer a) si le TBT peut former des complexes avec le glutathion ; et b) si le TBT peut inhiber la γ -glutamylcystéine et/ou induire la glutathion peroxydase.

Un autre résultat inédit de ce travail est la découverte de l'antagonisme du BaP sur les effets inhibiteurs du TBT sur l'activité de la GST et le glutathion hépatique. Puisque le BaP se conjugue au glutathion via la GST, nous proposons l'hypothèse d'une compétition entre le BaP et le TBT pour le site actif de la GST et pour le groupe thiol du glutathion. Quel que soit le mécanisme de ces interactions antagonistes, ces résultats pourraient avoir des conséquences toxicologiques importantes. En effet, il est connu qu'une diminution du taux de glutathion dans la cellule est typiquement associée à une augmentation subséquente de la toxicité (Castell *et al.*, 1997). Le BaP pourrait donc protéger le foie des effets toxiques du TBT. Les analyses histologiques vont dans le sens de cette hypothèse (voir la section 4.5).

Enfin, il est important de préciser qu'on ne peut pas écarter la possibilité que le DBT soit aussi en partie responsable des différents effets biochimiques observés, puisqu'il était présent tout au long de cette expérience et qu'il est généralement présent dans les milieux contaminés par le TBT. En effet, le DBT peut inhiber dans des conditions *in vitro* le P4501A au niveau de la protéine et de l'activité de l'EROD qui y est associée, quoique à des concentrations beaucoup plus élevées que pour le TBT (Brüschweiler *et al.*, 1996). Ceci serait dû à la lipophilicité moindre du DBT par rapport au TBT. À notre connaissance, les effets du DBT sur d'autres enzymes et cofacteurs métaboliques n'ont pas été étudiés jusqu'à présent. Étant donné que le DBT est généralement présent en plus grande proportion que le TBT dans le foie, il serait important de réaliser d'autres expériences *in vivo* afin de tester les effets inhibiteurs potentiels du DBT sur les enzymes de phase I et de phase II.

4.5. PROTECTION MUTUELLE ENTRE LE BaP ET LE TBT AU NIVEAU TISSULAIRE HÉPATIQUE

Les lésions hépatiques observées chez les poissons exposés séparément au BaP ou au TBT concordent avec celles décrites dans la littérature (voir p. ex. Schiewe *et al.*, 1991; Schwaiger *et al.*, 1992). Cependant, lorsque les polluants ont été administrés simultanément, les lésions étaient moins nombreuses par rapport à celles observées chez les individus exposés séparément à chaque polluant. D'après les analyses biochimiques, l'effet protecteur du TBT envers le BaP semble dû en partie à l'inhibition de la bioactivation du BaP par le TBT, conduisant à une moindre formation de métabolites toxiques. D'autre part, l'effet protecteur du BaP envers le TBT pourrait être lié à la plus grande concentration du glutathion dans le foie des poissons co-injectés avec le BaP, qui posséderait ainsi un caractère cytoprotecteur. Ces résultats sont très intéressants, car ils indiquent que les interactions au niveau biochimique semblent avoir également des conséquences à des niveaux de complexité biologique plus élevés, c'est-à-dire au niveau tissulaire.

En appui à cette idée, on constate une forte utilisation des réserves lipidiques chez les poissons exposés seulement au BaP ou au TBT alors que l'exposition simultanée au BaP et au TBT montre une situation très comparable à celle du groupe témoin. L'hypothèse est ici d'un véritable antagonisme des deux xénobiotiques l'un par rapport à l'autre aux niveaux tissulaire et cellulaire. Un métabolisme élevé de la cellule semble nécessaire pour sa défense contre l'agression de l'un et l'autre des toxiques mais leur présence simultanée montre une préservation des réserves lipidiques laissant supposer que leur utilisation n'a pas été requise. Il est à noter que cet antagonisme ne devient évident qu'après 32 jours d'exposition (six doses), ce qui nous semble compatible avec de nombreuses observations de terrain où la présence simultanée et à long terme de plusieurs toxiques ne semblent pas incommoder les habitats d'un écosystème contaminé. D'autres résultats morphologiques obtenus sur les reins et les pseudo-branchies ainsi qu'une discussion plus approfondie des données de microscopie optique et électronique sont proposés dans Oliveira Ribeiro *et al.* (2004).

5. CONCLUSIONS

Les résultats de cette expérience *in vivo* ont démontré l'existence d'interactions métaboliques mutuelles entre le BaP et le TBT, deux polluants aquatiques d'une importance environnementale majeure. D'une part, les données confirment notre hypothèse selon laquelle le TBT peut inhiber la bioactivation *in vivo* du BaP. En utilisant une approche mécanistique basée

sur l'utilisation d'une série de biomarqueurs biochimiques, nous avons montré que cette interaction est due, au moins en partie, à une altération par le TBT du métabolisme de phase I du BaP via une modulation temporelle de l'induction du P4501A. D'autre part, le BaP semble stimuler le métabolisme du TBT. Cet effet pourrait être dû à l'effet protecteur du BaP vis-à-vis la diminution de l'activité de la GST et du taux de glutathion hépatique par le TBT et/ou à l'induction par le BaP d'une ou des isoenzymes du P450 autres que le P4501A (p. ex., le P4503A) impliquées dans le métabolisme du TBT. Globalement, ces résultats soulignent l'importance des études sur les interactions chimiques entre polluants aquatiques et des études *in vivo* à long terme utilisant de faibles doses de polluants, plus pertinentes sur le plan environnemental que les travaux *in vitro* à fortes doses.

Ces résultats ont une importance particulière dans le contexte de l'étude des interactions entre polluants aquatiques. De façon générale, l'approche utilisée pour tester les interactions potentielles entre deux ou plusieurs polluants aquatiques reste encore essentiellement empirique, basée sur des évaluations rétrospectives de leurs interactions. Nos résultats suggèrent qu'il est toutefois possible de conceptualiser et de prédire les interactions métaboliques *in vivo* entre certains polluants aquatiques si l'on connaît les voies métaboliques ainsi que la capacité des polluants sélectionnés à moduler, soit *in vitro*, soit *in vivo*, des enzymes métaboliques clés telles que le P450. L'utilisation combinée de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS/MS), de lecteurs de microplaques à multi-puits (96 et 384 puits) ainsi que de plusieurs essais biochimiques utilisant des hépatocytes en culture permettrait, par exemple, le passage au crible rapide d'interactions métaboliques entre plusieurs combinaisons de polluants aquatiques (Janiszewski *et al.*, 2001 ; Vakharia *et al.*, 2001). Cette approche permettrait d'aborder la problématique des interactions entre polluants aquatiques d'une façon proactive plutôt que rétroactive d'une part en fournissant des hypothèses mécanistiques qui devraient ensuite être testées *in vivo* et, d'autre part, en facilitant la sélection de polluants prioritaires pour des études additionnelles. En revanche, le TBT illustre un autre cas de figure : puisque nous ignorons présentement quelle ou quelles isoenzymes sont responsables du métabolisme du TBT, il n'est possible ni d'expliquer ni de prédire les effets potentiels d'autres polluants sur le métabolisme du TBT.

Nos résultats illustrent également l'utilité de l'approche des biomarqueurs biochimiques pour l'étude d'interactions métaboliques potentielles entre un HAP modèle comme le BaP et d'autres polluants aquatiques. À ce propos, il faut noter que les interactions entre polluants aquatiques sont généralement examinées en mesurant un seul paramètre biologique

sous-létal à la fois, le plus souvent l'activité du P4501A dans le cas du BaP ou des BPC, ou même des effets létaux dans le cas d'autres polluants (p. ex., les métaux). De ce fait, ce type d'études ne fournit guère d'information sur le ou les mécanismes à la base des effets interactifs. Par contre, l'approche des biomarqueurs biochimiques utilisée dans ce travail permet non seulement d'identifier certaines étapes du processus métabolique qui sont modifiées par la présence des xénobiotiques, mais aussi de mieux cerner le ou les mécanismes biochimiques impliqués dans l'interaction. Cette approche est couramment utilisée dans les études biomédicales sur la chimioprévention du cancer par le BaP chez les mammifères, mais à notre connaissance elle n'a jamais été utilisée auparavant pour tester des interactions métaboliques entre polluants aquatiques chez le poisson. Contrairement aux biomarqueurs biochimiques, les biomarqueurs physiologiques tels que les indices organosomatiques ne semblent pas convenir à l'étude des interactions chimiques, car ils sont insensibles à de faibles doses de polluants. La croissance pourrait être plus sensible, mais elle est soumise à tellement de facteurs environnementaux qu'elle devient inutilisable en milieu naturel.

Les implications toxicologiques et environnementales des interactions métaboliques observées dans ce travail pourraient être importantes, notamment en raison de la présence simultanée de ces polluants dans plusieurs milieux aquatiques. L'inhibition de la bioactivation du BaP par le TBT suggère que le TBT pourrait paradoxalement réduire le risque hépatocarcinogène chez le poisson des composés précancérogènes comme les HAP. L'inhibition de la formation de BaPDE en présence de TBT pourrait aussi diminuer la toxicité du BaP, tel que le laissent supposer les données histopathologiques. D'autre part, la stimulation du métabolisme du TBT par le BaP, ainsi que l'effet protecteur du BaP vis-à-vis l'inhibition de la GST et du glutathion par le TBT, pourraient diminuer les effets toxiques du TBT. Les résultats histopathologiques semblent également appuyer cette hypothèse. D'un point de vue environnemental, les interactions métaboliques observées dans ce travail pourraient être également importantes pour l'utilisation de biomarqueurs biochimiques dans les études de biosurveillance. En effet, plusieurs des réponses biochimiques mesurées dans nos expériences sont largement utilisées comme biomarqueurs d'exposition aux HAP présents dans les sédiments de zones polluées, notamment l'activité de l'EROD et les métabolites de BaP dans la bile (Stein *et al.*, 1992, 1995). L'inhibition ou l'induction de ces biomarqueurs par le TBT pourrait respectivement mener à une sous-estimation ou à une surestimation du niveau d'exposition réel des poissons aux HAP. Par conséquent, l'utilisation et l'interprétation de ces biomarqueurs dans les études de terrain devraient être marquées de prudence dans les milieux aquatiques où on soupçonne une contamination par le TBT.

En somme, nos résultats nous permettent de proposer une nouvelle approche scientifique pour l'étude des interactions chimiques en toxicologie aquatique, soit la conceptualisation et la prédiction logique d'interactions en se basant sur les voies métaboliques des polluants à l'étude et sur leur capacité à moduler l'activité du P450, le système enzymatique clé impliqué à la fois dans la bioactivation et la détoxification des polluants organiques. Cette approche mécanistique repose sur l'utilisation de biomarqueurs biochimiques permettant d'identifier les bases biochimiques des interactions et peut être couplée à des marqueurs cellulaires et tissulaires qui élargissent le champ de vision du chercheur et permettent de confirmer les effets visibles des interactions métaboliques.

6. PERSPECTIVES SUR LES INTERACTIONS MULTIPLES EN ÉCOTOXICOLOGIE

Quelles orientations prendront les travaux sur les interactions multiples en écotoxicologie au cours des prochaines années ? S'il s'agit d'interactions chimiques ou biochimiques simples comme celle du mercure et du sélénium, les outils modernes de la chimie analytique comme la résonance magnétique nucléaire (RMN) de haute résolution, la diffraction des rayons X et la spectrométrie de masse, maintenant appliquée aux protéines et aux complexes organométalliques de grande taille, permettront d'identifier formellement les molécules résultant de ces interactions ainsi que leurs intermédiaires de réaction. Au plan toxicologique, les interactions chimiques vraies peuvent être abordées par des expériences de co-exposition *in vitro* sur des cellules ou des composantes cellulaires afin de déterminer les effets antagonistes ou synergiques résultant de l'action d'un composé sur l'autre. Pour ce type d'interactions, les réactifs et les produits de la réaction ne sont pas modifiés significativement par le réceptacle biologique dans lequel la réaction se produit. Il est possible de prédire certaines interactions chimiques à partir des données physicochimiques et cinétiques disponibles. La difficulté restera certainement de reconnaître la présence d'une interaction chimique parce que le milieu physiologique peut fournir certains réactifs ou stabiliser certains intermédiaires réactionnels qui sont inconnus de l'investigateur. Le milieu physiologique pourrait aussi modifier les produits de la réaction pour faciliter leur élimination, par exemple la conjugaison post-réactionnelle d'un complexe pour faciliter une élimination par l'urine, la bile ou les exsudats.

S'il s'agit d'interactions métaboliques du type de celle décrite dans ce chapitre entre le TBT et le BaP, la voie principale de développement nous semble indiquée à la fois par les travaux classiques en toxicocinétique et en métabolisme enzymatique et par les développements les plus récents

en analyse chimique des matrices organiques complexes. Les approches et les techniques nous viennent du monde biomédical et particulièrement de la pharmaceutique, où l'étude du métabolisme des médicaments et des xénobiotiques, au sens plus large, est devenue un élément clé dans la mise au point de nouvelles molécules ayant des effets thérapeutiques (Ekins *et al.*, 2000). En effet, l'utilisation simultanée de plusieurs médicaments pour combattre une même maladie est devenue une approche courante et nécessaire. Les outils développés ou en développement pour les études des interactions médicamenteuses (Li, 1997) pourront être adaptés et appliqués aux interactions métaboliques en écotoxicologie. Par exemple, le rôle des cytochromes P450 dans les interactions métaboliques a été à peine effleuré dans notre étude ; or, cette super famille d'enzymes est présente chez la majorité des espèces aquatiques et semble au centre d'une multitude d'interactions que l'on comprend assez bien chez les mammifères et les humains, mais qui demeurent inconnues chez les poissons, les crustacés ou les mollusques. Une stratégie de criblage des interactions métaboliques potentielles entre différentes paires de composés utilisant des tests *in vitro* sur des microsomes hépatiques serait facile à importer des laboratoires pharmaceutiques et à appliquer à l'écotoxicologie (White, 2000 ; Rodrigues et Lin, 2001).

Comme nous l'avons montré dans ce chapitre, non seulement faut-il maîtriser et améliorer les techniques biochimiques et analytiques déjà connues, mais il faut aussi faire une place importante à la toxicocinétique, c'est-à-dire prendre en compte les facteurs « temps » et « vitesse de réaction ». La cinétique est au cœur des réactions enzymatiques les plus simples et seul une approche *in vivo* à moyen ou long terme peut valider ou infirmer des observations obtenues sur des microsomes ou des cellules en culture. L'évolution la plus souhaitée sera sans doute la mise au point de techniques non invasives permettant d'exposer des organismes à des doses réalistes de xénobiotiques n'ayant pas d'effets toxiques aigus et d'en examiner les interactions métaboliques sans devoir sacrifier les animaux et en se rapprochant au mieux des conditions naturelles.

Une autre approche déjà bien développée dans le secteur pharmaceutique est l'analyse détaillée des métabolites réactionnels qui renseignent sur les voies métaboliques empruntées et, indirectement, sur les inhibitions et stimulations provoquées par l'interaction métabolique étudiée. En ce sens, les développements récents de la chromatographie liquide avec détection en spectrométrie de masse (LC/MS) ouvre des horizons insoupçonnés jusqu'à récemment (Snyder, 2000). Ainsi, il est devenu possible de séparer et d'identifier les métabolites d'une réaction très spécifique induite par l'exposition de quelques nanogrammes d'une molécule donnée à un ou deux milligrammes d'une fraction microsomale

extraite d'un foie humain ou de l'hépatopancréas d'un escargot si on y travaille en écotoxicologie. L'application des techniques MS^n permet de bombarder à l'intérieur de plusieurs cycles successifs des fragments de métabolites et d'obtenir de précieuses informations sur leur poids moléculaire et leur conformation structurale (voir par exemple Blount *et al.*, 2000). Une analyse encore plus fine par RMN, si nécessaire, pourrait conduire à l'identification complète des métabolites recherchés et surtout à une compréhension des mécanismes interactifs étudiés.

RÉFÉRENCES

- AL-GHAIS, S.M. et B. ALI (1999). « Inhibition of glutathione *S*-transferase catalyzed xenobiotic detoxication by organotin compounds in tropical marine fish tissues », *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 62, p. 207-213.
- ALZIEU, C. (1996). « Biological effects of tributyltin on marine organisms », dans S.J. de Mora (dir.), *Tributyltin: Case Study of an Environmental Contaminant*, Cambridge, UK, Cambridge University Press, p. 167-211.
- ASCOLI, F., M.R. ROSSI FANELLI et E. ANTONINI (1981). « Preparation and properties of apohemoglobin and reconstituted hemoglobins », *Methods in Enzymology*, vol. 76, p. 72-87.
- BLOUNT, B.C. *et al.* (2000). « Quantitative detection of eight phthalate metabolites in human urine using HPLC-APCI-MS/MS », *Analytical Chemistry*, vol. 72, p. 4127-4134.
- BRADFORD, M.M. (1976). « A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding », *Analytical Biochemistry*, vol. 72, p. 248-254.
- BRÜSCHWEILER, B.T., F.E. WÜRGLER et K. FENT (1996). « Inhibition of cytochrome P4501A by organotins in fish hepatoma cells PLHC-1 », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 15, p. 728-735.
- BURK, R.F. *et al.* (1974). « Binding of simultaneously administered inorganic selenium and mercury to a rat plasma protein », *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, vol. 145, p. 782-785.
- BURKE, M.D. et R.T. MAYER (1974). « Ethoxyresorufin: Direct fluorimetric assay of a microsomal *O*-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene », *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 2, p. 583-588.
- CALABRESE, E.J. (1991). *Multiple Chemical Interactions*, Chelsea, MI, Lewis Press.
- CARLBERG, I. et B. MANNERVIK (1985). « Glutathione reductase », *Methods in Enzymology*, vol. 113, p. 484-490.
- CASSEE, F.R. *et al.* (1998). « Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures », *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 28, p. 73-101.
- CASTELL, J.V. *et al.* (1997). « *In vitro* investigation of the molecular mechanisms of hepatotoxicity », dans J.V. Castell et M.J. Gómez-Lechón (dir.), *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Londres, Academic Press, p. 375-410.
- CELANDER, M. et J.J. STEGEMAN (1997). « Isolation of a cytochrome P450 3A cDNA sequence (CYP3A30) from the marine teleost and phylogenetic analysis of CYP3A genes », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 236, p. 306-312.
- COLLIER, T.K. et U. VARANASI (1991). « Hepatic activities of xenobiotic metabolizing enzymes and biliary levels of xenobiotics in English sole (*Parophrys vetulus*) exposed to environmental contaminants », *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 20, p. 462-473.
- CONNEY, A.H. et J.J. BURNS (1972). « Metabolic interactions among environmental chemicals and drugs », *Science*, vol. 178, p. 576-586.
- DA COSTA, E.G. et L.R. CURTIS (1995). « Bioaccumulation of dietary 2,2',4,4',5,5'-hexachlorophenyl and induction of hepatic arylhydrocarbon hydroxylase in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 14, p. 1711-1717.
- DELONG, G.T. et C.D. RICE (1997). « Tributyltin potentiates 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced cytochrome P-4501A-related activity », *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 51, p. 131-148.
- DONOHUE, R.M. *et al.* (1998). « Modulation of 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene disposition and hepatocarcinogenesis by dieldrin and chlordecone in rainbow trout », *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 54, p. 227-242.

- DOWSON, P.H., J.M. BUBB et J.N. LESTER (1996). « Persistence and degradation pathways of tributyltin in freshwater and estuarine sediments », *Estuarine Coastal and Shelf Science*, vol. 42, p. 551-562.
- EKINS, S. *et al.* (2000). « Present and future *in vitro* approaches for drug metabolism », *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 44, p. 313-324.
- EL-MASRI, H.A., K.F. REARDON et R.S.H. YANG (1997). « Integrated approaches for the analysis of toxicological interactions of chemical mixtures », *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 27, p. 175-197.
- FENT, K. et J.J. STEGEMAN (1991). « Effects of tributyltin chloride *in vitro* on the hepatic microsomal monooxygenase system in the fish *Stenotomus chrysops* », *Aquatic Toxicology*, vol. 24, p. 219-240.
- FENT, K. et J.J. STEGEMAN (1993). « Effects of tributyltin *in vivo* on hepatic cytochrome P450 forms in marine fish », *Aquatic Toxicology*, vol. 24, p. 219-240.
- FOLT, C.L. *et al.* (1999). « Synergism and antagonism among multiple stressors », *Limnology and Oceanography*, vol. 44, p. 864-877.
- FOSTER, E.P. *et al.* (1998). « Interaction of 2,2',4,4',5,5' hexachlorobiphenyl with the hepatic cytochrome P4501A system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) », *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 53, p. 101-113.
- GAILER, J. *et al.* (2000). « Structural basis of the antagonism between inorganic mercury and selenium in mammals », *Chemical Research in Toxicology*, vol. 13, p. 1135-1142.
- GLICKSTEIN, N. (1978). « Acute toxicity of mercury and selenium to *Crassostrea gigas* embryos and *Cancer magister* larvae », *Marine Biology*, vol. 49, p. 113-117.
- GOTSIS, O. (1982). « Combined effects of selenium/mercury and selenium/copper on the cell population of the alga *Dunaliella minuta* », *Marine Biology*, vol. 71, p. 217-222.
- GUPTA, R.C. (1984). « Non random binding of the carcinogen *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA *in vivo* », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 81, p. 6943-6947.
- HABIG, W.H., M.J. PABST et W.B. JAKOBY (1974). « Glutathione *S*-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 249, p. 7130-7139.
- HAHN, M.E. (1998). « The aryl hydrocarbon receptor: A comparative perspective », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 121C, p. 23-53.
- HALL, M. et P.L. GROVER (1990). « Polycyclic aromatic hydrocarbons: Metabolism, activation and tumour initiation », dans C.S. Cooper et P.L. Grover (dir.), *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I, Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 94/1, Berlin, Springer-Verlag, p. 327-372.
- HARRIS, C.C. (1992). « Tumour suppressor genes, multistage carcinogenesis and molecular epidemiology », dans H. Vainio *et al.* (dir.), *Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification*, Lyon, International Agency for Research on Cancer, p. 67-85.
- HENRY, R.A. et K.H. BYINGTON (1976). « Inhibition of glutathione-*S*-aryltransferase from rat liver by organogermanium, lead and tin compounds », *Biochemical Pharmacology*, vol. 25, p. 2291-2295.
- HISSIN, P.J. et R. HILF (1976). « A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues », *Analytical Biochemistry*, vol. 74, p. 214-226.
- HOAGLAND, K.D. *et al.* (1993). « Freshwater community responses to mixtures of agricultural pesticides: Effects of atrazine and bifenthrin », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 12, p. 627-637.
- JANISZEWSKI, J.S. *et al.* (2001). « A high-capacity LC/MS system for the bioanalysis of samples generated from plate-based metabolic screening », *Analytical Chemistry*, vol. 73, p. 1495-1501.
- KANNAN, K. *et al.* (1998). « Interaction of tributyltin with 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced ethoxyresorufin *O*-deethylase activity in rat hepatoma cells », *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 55, p. 373-384.

- KAWANO, A. *et al.* (1996). « Acute effect of organotin compounds to red sea bream and red carp using biological parameters », *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 56, p. 774-781.
- KEDDERIS, G.L. (1997). « Pharmacokinetics of drug interactions », dans A.P. Li (dir.), *Drug-drug Interactions : Scientific and Regulatory Perspectives*, Advances in Pharmacology, vol. 43, San Diego, Academic Press, p. 189-203.
- KIM, G.B., H. NAKATA et S. TANABE (1998). « *In vitro* inhibition of hepatic cytochrome P450 and enzyme activity by butyltin compounds in marine mammals », *Environmental Pollution*, vol. 99, p. 225-261.
- KOEMAN, J.H. *et al.* (1975). « Mercury and selenium in marine mammals and birds », *Sciences of Total Environment*, vol. 3, p. 279-287.
- KOREEDA, M. *et al.* (1978). « Binding of benzo[*a*]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides to DNA, RNA, and protein of mouse skin occurs with high stereoselectivity », *Science*, vol. 199, p. 778-781.
- LANDIS, W.G. et M.H. YU (1995). « Introduction to environmental toxicology. Impacts of chemicals upon ecological systems », 2^e éd., Boca Raton, FL, Lewis Publishers.
- LEVINE, S.L., J.T. ORIS et T.E. WISSING (1994). « Comparison of P-4501A1 monooxygenase induction in gizzard shad (*Dorosoma cepedianum*) following intraperitoneal injection or continuous waterborne-exposure with benzo[*a*]pyrene : Temporal and dose-dependent studies », *Aquatic Toxicology*, vol. 30, p. 61-75.
- LEVY, R.H. *et al.* (2000). *Metabolic Drug Interactions*, New York, Lippencott Williams and Wilkins.
- LEWIS, D.F.V. *et al.* (1998). « Structural determinants of cytochrome P450 substrate specificity, binding affinity and catalytic rate », *Chemico-biological Interactions*, vol. 115, p. 175-199.
- LI, A.P. (1997). *Drug-drug Interactions : Scientific and Regulatory Perspectives*, Advances in Pharmacology, vol. 43, San Diego, Academic Press.
- LIN, E.L.C., S.M. CORMIER et J.A. TORSSELLA (1996). « Fish biliary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites estimated by fixed-wavelength fluorescence : Comparison with HPLC-fluorescent detection », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 35, p. 16-23.
- MACKAY, D. (1991). « Multimedia environmental models - The fugacity approach », Chelsea, MI, Lewis Publishers.
- MACKAY, N.J. *et al.* (1975). « Selenium and heavy metals in black marlin », *Marine Pollution Bulletin*, vol. 6, p. 57-61.
- MAGOS, L. et M. WEBB (1980). « The interactions of selenium with cadmium and mercury », *Critical Review in Toxicology*, vol. 8, p. 1-42.
- MARTOJA, R. et D. VIALE (1977). « Accumulation des granules de sélénium mercurique dans le foie des Odontocètes (Mammifères, cétacés) : un mécanisme possible de détoxification du méthylmercure par le sélénium », *Compte rendu de l'Académie des sciences de Paris*, 285 (série D), p. 109-112.
- MEYER, M.J. et W.E. BECHTOLD (1996). « Protein adduct biomarkers : State of the art », *Environmental Health Perspectives*, vol. 104, p. 879-882.
- MIRANDA, C.L. *et al.* (1991). « Comparison of rainbow trout and mammalian cytochrome P450 enzymes : Evidence for structural similarity between trout P450 LMC5 and human P450 IIIA4 », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 176, p. 558-563.
- MORCILLO, Y. et C. PORTE (1997). « Interaction of tributyltin and triphenyltin with the microsomal monooxygenase system of molluscs and fish from the Western Mediterranean », *Aquatic Toxicology*, vol. 38, p. 35-46.
- NISHIMOTO, M. *et al.* (1995). « Effects of a complex mixture of chemical contaminants on hepatic glutathione, L-cysteine and g-glutamylcysteine synthetase in English sole », (*Pleuronectes vetulus*), *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 4, p. 461-469.

- OBERDÖRSTER, E., D. RITTSCHOF, et P. MCCLELLAN-GREEN (1998). « Induction of cytochrome P450 3A and heat shock protein by tributyltin in blue crab, *Callinectes sapidus* », *Aquatic Toxicology*, vol. 41, p. 83-100.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. *et al.* (2004). « Morphological findings of subchronic and combined exposition to tributyltin (TBT) and benzo(a)pyrene (BaP) in the Arctic Char (*Salvelinus alpinus*) », *Ecotoxicology and Environmental Safety* (soumis).
- OSHIMA, Y. *et al.* (1997). « High accumulation of tributyltin in blood among the tissues of fish and applicability to environmental monitoring », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 16, p. 1515-1517.
- PADRÓS, J. *et al.* (2000). « Mutual *in vivo* interactions between benzo[a]pyrene and tributyltin in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 19, p. 1019-1027.
- PADRÓS, J. et E. PELLETIER (2000). « *In vivo* formation of (+)-anti-benzo[a]pyrene diol-epoxide-plasma albumin adducts in fish », *Marine Environmental Research*, vol. 50, p. 347-351.
- PADRÓS, J. et E. PELLETIER (2001). « Subpicogram determination of (+)-anti-benzo[a]pyrene diol-epoxide adducts in fish albumin and globin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection », *Analytica Chimica Acta*, vol. 426, p. 71-77.
- PADRÓS, J., E. PELLETIER et C.A. OLIVEIRA RIBEIRO (2003). « Metabolic interactions between low doses of benzo[a]pyrene and tributyltin in Arctic char (*Salvelinus alpinus*): A long-term *in vivo* study », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 192, p. 45-55.
- PADRÓS, J. (2001). *Interactions métaboliques entre le benzo(a)pyrène et le tributylétain chez le poisson*, thèse de doctorat, Rimouski, Université du Québec à Rimouski.
- PARÍSEK, J. et I. OSTÁDALOVÁ (1967). « The protective effect of small amounts of selenite in sublimate intoxication », *Experientia*, vol. 23, p. 142-143.
- PARKINSON, A. (2001). « Biotransformation of xenobiotics », dans C.D. Klaassen (dir.), *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, New York, McGraw-Hill, 1275 pages.
- PELLETIER, E. (1985). « Mercury-selenium interactions in aquatic organisms: A review », *Marine Environmental Research*, vol. 18, p. 111-132.
- PENNINGS, S.C. (1996). « Testing for synergisms between chemical and mineral defences - A comment », *Ecology*, vol. 77, p. 1948-1950.
- READER, S. *et al.* (1996). « Accumulation and biotransformation of tri-*n*-butyltin by isolated rainbow trout hepatocytes », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 15, p. 2049-2052.
- READER, S., M. MARION et F. DENIZEAU (1993). « Flow cytometric analysis of the effects of tri-*n*-butyltin chloride on cytosolic free calcium and thiol levels in isolated rainbow trout hepatocytes », *Toxicology*, vol. 80, p. 117-129.
- RICE, C.D. et L.E. ROSZELL (1998). « Tributyltin modulates 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB-126)-induced hepatic CYP1A activity in channel catfish, *Ictalurus punctatus* », *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 55, p. 197-212.
- RIGGS, A. (1981). « Preparation of blood hemoglobins of vertebrates », *Methods in Enzymology*, vol. 76, p. 5-29.
- RODRIGUES, A.D. et J.H. LIN (2001). « Screening of drug candidates for their drug-drug interaction potential », *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 5, p. 396-401.
- ROSENBERG, D.W. et G.S. DRUMMOND (1983). « Direct *in vitro* effects of bis(tri-*n*-butyltin)oxide on hepatic cytochrome P-450 », *Biochemical Pharmacology*, vol. 32, p. 3823-3829.
- SADAR, M.D. *et al.* (1996). « Phenobarbital induction of CYP1A1 gene expression in a primary culture of rainbow trout hepatocytes », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, p. 17635-17643.
- SASAKURA, C. et K.T. SUZUKI (1998). « Biological interaction between transition metals (Ag, Cd and Hg), selide/sulfide and selenoprotein P », *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 71, p. 159-162.

- SCHIEWE, M.H. *et al.* (1991). « Induction of foci of cellular alteration and other hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) exposed to an extract of an urban marine sediment », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 48, p. 1750-1760.
- SCHWAIGER, J. *et al.* (1992). « A prolonged toxicity study on the effects of sublethal concentrations of bis(tri-*n*-butyltin)oxide (TBTO) : Histopathological and histochemical findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) », *Aquatic Toxicology*, vol. 23, p. 31-48.
- SENTHILKUMAR, K. *et al.* (1999). « Butyltin compounds in sediment and fish from the Polish coast of the Baltic Sea », *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 6, p. 1-7.
- SHAW, G.R. et D.W. CONNELL (1994). « Prediction and monitoring of the carcinogenicity of polycyclic aromatic compounds (PACs) », *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 135, p. 1-62.
- SHIOBARA, Y. et K.T. SUZUKI (1998). « Binding of selenium (administrated as selenite) to albumin after efflux from red blood cells », *Journal of Chromatography*, vol. B710, p. 49-56.
- SHOU, M. *et al.* (1994a). « The role of 12 cDNA-expressed human, rodent, and rabbit cytochrome P450 in the metabolism of benzo[*a*]pyrene and benzo[*a*]pyrene trans-7,8-dihydrodiol », *Molecular Carcinogenesis*, vol. 10, p. 159-168.
- SHOU, M. *et al.* (1994b). « Activation of CYP3A4 : Evidence for the simultaneous binding of two substrates in a cytochrome P450 active site », *Biochemistry*, vol. 33, p. 6450-6455.
- SNYDER, L.R. (2000). « HPLC : Past and present », *Analytical Chemistry*, vol. 72, p. 412A-420A.
- STEGEMAN, J.J. et M.E. HAHN (1994). « Biochemistry and molecular biology of monooxygenases : Current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species », dans D.C. Malins et G.K. Ostrander (dir.), *Aquatic Toxicology : Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*, Boca Raton, FL, Lewis Publishers, p. 87-206.
- STEIN, J.E. *et al.* (1992). « Bioindicators of contaminant exposure and sublethal effects : Studies with benthic fish in Puget Sound, Washington », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 11, p. 701-714.
- STEIN, J.E. *et al.* (1995). « Contaminant exposure and biochemical effects in out migrant juvenile chinook salmon from urban and nonurban estuaries of Puget Sound, Washington », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 14, p. 1019-1029.
- SUZUKI, K.T., C. SASAKURA et S. YONEDA (1998). « Binding sites for the (Hg-Se) complex on selenoprotein P », *Biochimica Biophysica Acta*, vol. 1429, p. 102-112.
- TESTA, B. et P. JENNER (1981). « Inhibitors of cytochrome P-450s and their mechanism of action », *Drug Metabolism Reviews*, vol. 12, p. 1-117.
- VAKHARIA, D.D. *et al.* (2001). « Effect of metals on polycyclic aromatic hydrocarbon induction of CYP1A1 and CYP1A2 in human hepatocyte cultures », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 170, p. 93-103.
- VARANASI, U., J.E. STEIN et M. NISHIMOTO (1989a). « Biotransformation and disposition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in fish », dans U. Varanasi (dir.), *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*, Boca Raton, FL, CRC Press, p. 94-149.
- VARANASI, U. *et al.* (1989b). « Formation and persistence of benzo[*a*]pyrene-diolepoxide-DNA adducts in liver of English sole (*Parophrys vetulus*) », *Chemico-biological Interactions*, vol. 69, p. 203-216.
- VIAU, C., M. MERCIER et O. BLONDIN (1993). « Measurement of hemoglobin and albumin adducts of benzo[*a*]pyrenediolepoxide and their rate of elimination in the female Sprague-Dawley rat », *Archives of Toxicology*, vol. 67, p. 468-472.
- VOORMAN, R. et S.D. AUST (1988). « Inducers of cytochrome P-450d : Influence on microsomal catalytic activities and differential regulation by enzyme stabilization », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 262, p. 76-84.
- WEAVER, R.J. (2001). « Assessment of drug-drug interactions : Concepts and approaches », *Xenobiotica*, vol. 31, p. 499-538.

- WHITE, R.E. (2000). « High-throughput screening in drug metabolism and pharmacokinetic support of drug discovery », *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 40, p. 133-157.
- WHITLOCK, J.P. et M.S. DENISON (1995). « Induction of cytochrome P450 enzymes that metabolize xenobiotics », dans P.R. Ortiz de Montellano (dir.), *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, New York, Plenum Press, p. 367-390.
- WILLET, K. *et al.* (1995). « Exposure of killifish to benzo[a]pyrene : Comparative metabolism, DNA adduct formation and aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonist », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 112B, p. 93-103.
- YANG, R.S.H. (1994). *Toxicology of Chemical Mixtures – Case Studies, Mechanisms, and Novel Approaches*, San Diego, Academic Press.
- YANG, R.S.H., H.L. LONG et G.A. BOORMAN (1989). « Toxicology of chemical mixtures : Experimental approaches, underlying concepts, and some results », *Toxicology Letters*, vol. 49, p. 183-197.

CHAPITRE



INTERACTIONS CELLULE-CELLULE

Cible des xénobiotiques

DANIEL G. CYR*

Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier

STÉPHANE PILLET*

Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier

JEAN-MARC NICOLAS*

Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier

* Les auteurs tiennent à remercier de son aide Madame Francine Leclerc.

RÉSUMÉ

Les interactions entre les cellules représentent un élément clé au sein de tous les organismes pluricellulaires. Ces interactions sont médiées par des molécules exprimées à la surface des cellules. Les intégrines et les sélectines sont des molécules d'adhérence exprimées à la surface des cellules du système immunitaire. Elles exercent un rôle essentiel dans l'élaboration d'une réponse immunitaire optimale, tant au niveau de la différenciation des cellules immunitaires qu'en ce qui concerne la réponse aux pathogènes au sens large. Plusieurs études tendent à mettre en évidence certains effets spécifiques des contaminants de l'environnement sur l'expression des intégrines et des sélectines et les conséquences physiologiques potentielles au sein de processus tels que l'inflammation, les allergies, la résistance aux pathogènes et le développement de cancers. D'autre part, certaines pathologies, dont l'origine ne semble pas liée à l'exposition aux contaminants, s'accompagnent de modifications de l'expression de ces molécules d'adhésion cellulaire. Dans ce cas, ces modifications peuvent servir tant à mettre en évidence la maladie qu'à en évaluer la gravité. L'expression des intégrines et des sélectines peut donc être considérée comme un biomarqueur potentiel de l'altération de certaines fonctions immunitaires susceptibles d'occasionner des perturbations de l'état de santé des organismes.

Les jonctions lacunaires permettent la communication intercellulaire directe dans les cellules épithéliales. Elles sont formées de protéines transmembranaires appelées connexines (Cx). La perte de communication entre cellules voisines, qui semble importante suite à des stress toxiques, est associée à une diversité de pathologies. Les jonctions lacunaires ont plusieurs fonctions. Elles permettent le passage de médiateurs, la conduction d'un influx électrique, le transport de nutriments, la propagation d'une réponse à un stimulus hormonal, la régulation du développement embryonnaire et l'élimination de certains métabolites. La toxicité de certains contaminants environnementaux et en particulier l'induction de tumeurs s'explique au moins partiellement par un dérèglement de la communication intercellulaire via les jonctions lacunaires. Des contaminants tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques, le phénobarbital, certains organochlorés et certains métaux sont capables de diminuer ou d'inhiber la communication intercellulaire. Dans certains cas, cette inhibition est irréversible. L'inhibition de la communication intercellulaire dépend de la dose et de la durée de l'exposition.

Les jonctions d'adhésion cellulaire sont essentielles à l'adhésion des cellules et sont également impliquées dans la signalisation intracellulaire qui permet la différenciation et l'établissement de la polarité cellulaire. Les protéines constitutives des jonctions d'adhésion (cadhérines) sont également vitales dans la mise en place des jonctions serrées et lacunaires. Les travaux effectués sur la voie de signalisation des cadhérines et la régulation des jonctions adhérentes ont ouvert de nouvelles voies de recherche pour le traitement de certains cancers. Très peu d'études portent sur les effets des contaminants environnementaux sur les jonctions d'adhésion cellulaire. Le cadmium provoque une baisse importante de certaines cadhérines, ce qui contribue à la diminution de la cohésion cellulaire au sein d'un tissu.

1. INTRODUCTION

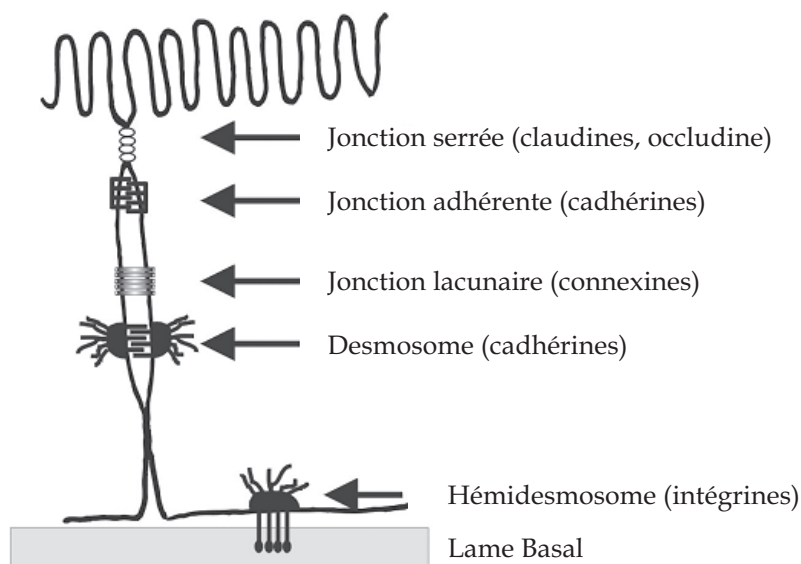
Les interactions cellulaires sont essentielles pour réguler la prolifération, la différenciation et la polarité des cellules, la reconnaissance cellule-cellule et la communication intercellulaire. Elles permettent également la formation de barrières cellulaires qui empêchent la pénétration des cellules immunitaires au sein de certains tissus en formant un environnement propice au fonctionnement ou à la maturation des cellules (figure 7.1). Une perturbation des interactions cellule-cellule peut donc avoir des conséquences importantes sur le développement et le fonctionnement de tous les systèmes physiologiques. Au cours des dernières années, différentes études ont mis en évidence que les interactions intercellulaires représentent une cible importante des xénobiotiques. Il est donc essentiel de regarder les effets des contaminants environnementaux sur les interactions cellulaires afin de mieux comprendre les mécanismes de toxicité au niveau cellulaire. Les protéines d'adhésion cellulaire et les protéines jonctionnelles sont présentes dans tous les épithélia ainsi que sur les cellules immunitaires. L'objectif de ce chapitre est de mettre en évidence les différentes interactions cellule-cellule et les effets toxiques résultant d'une exposition aux contaminants environnementaux. Puisque ces interactions sont essentielles au fonctionnement de divers systèmes physiologiques, tout en étant impliquées dans différentes pathologies, chacune des sections traitera principalement du système immunitaire, du foie et du système reproducteur masculin.

2. INTÉGRINES ET SÉLECTINES

La réponse immunitaire implique de nombreuses interactions entre les cellules immunitaires ainsi que des interactions entre ces cellules et d'autres types cellulaires, tels les cellules endothéliales. Dans cette section, nous envisagerons les interactions entre les cellules du système immunitaire et les cellules endothéliales faisant intervenir essentiellement deux des principales familles de molécules d'adhérence intercellulaire et de signalisation du système immunitaire : les sélectines et les intégrines.

2.1. LES SÉLECTINES

Les sélectines sont des lectines spécifiques de certains glycoconjugués. Il existe trois types de sélectines : **la sélectine-E**, **la sélectine-L** et **la sélectine-P**, présentes sur différents types de cellules, mais également sous forme soluble dans le sérum.

Figure 7.1**Représentation schématique des interactions intercellulaires**

Les différents types de jonctions sont mentionnés et les protéines transmembranaires pour chacune des jonctions sont indiquées entre parenthèses.

La sélectine-E (également nommée CD62E, ELAM-1 ou LECAM-2) est exprimée sur les cellules endothéliales dans les sites d'inflammation après activation par l'interleukine-1 β (IL-1 β), le *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF α), l'interféron γ ou le lipopolysaccharide (LPS). Elle se lie à certaines glycoprotéines des neutrophiles, des monocytes et de quelques lymphocytes T CD4+ mémoire.

La sélectine-L (également nommée CD62L, MEL-14, LAM-1, LECAM-1 ou leu-8) est une lectine dépendante du calcium qui est exprimée sur tous les leucocytes. C'est la seule sélectine exprimée à la surface des lymphocytes. Elle intervient dans l'adhérence des leucocytes à l'endothélium et plus particulièrement dans celle des lymphocytes à l'endothélium des veinules post-capillaires. La sélectine-L est essentielle à la translocation des lymphocytes.

La sélectine-P (également nommée CD62P, LECAM-3 ou GMP140) est exprimée sur les plaquettes, les cellules endothéliales et les mégacaryocytes. Elle est transloquée à la membrane après stimulation par la

thrombine, l'histamine, les peroxydes ou les esters de phorbol. Elle interagit avec plusieurs molécules à la surface des leucocytes et notamment avec le CD25 des monocytes, des neutrophiles et des lymphocytes CD4+ épidermotropes.

2.2. INTÉGRINES

Les intégrines sont des glycoprotéines membranaires hétérodimériques (α et β). La partie N-terminal de la chaîne α contient 3 à 4 sites de fixation des cations bivalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}). Les intégrines ont la particularité de se lier aux membres de la superfamille des immunoglobulines tels que Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), -2 et -3 ainsi que Vascular Adhesion Molecule-1 (VCAM-1), mais elles se lient également à un grand nombre de protéines de la matrice extracellulaire. La plupart des intégrines ont la capacité de se fixer à plusieurs ligands. La liaison est dépendante des cations et nécessite les deux sous-unités α et β . Elle entraîne la phosphorylation de la région intracytoplasmique de la sous-unité β . Il existe 3 classes d'intégrines selon le type β .

Les intégrines $\beta 1$ ou Very Late Antigen (VLA) se caractérisent par leur chaîne commune CD29. Ces intégrines participent à l'adhérence des lymphocytes activés aux protéines de la matrice extracellulaire.

Les intégrines $\beta 2$, caractérisées par une chaîne CD18 associée à l'une des 3 chaînes α CD11a, CD11b ou CD11c, sont essentielles à l'adhérence des cellules immunitaires entre elles et avec les cellules endothéliales.

Les intégrines $\beta 3$, caractérisées par leur chaîne CD61, sont plus particulièrement impliquées dans les interactions des plaquettes et des neutrophiles dans les foyers inflammatoires ou les sites de lésions vasculaires.

Notre connaissance du rôle et de l'importance des molécules d'adhérence intercellulaire provient pour beaucoup de l'étude des syndromes de déficience d'adhérence des leucocytes (DAL) dans lesquels une ou plusieurs molécules d'adhésion sont déficientes. La génération de souris transgéniques dont un gène spécifique a été altéré afin d'en supprimer l'expression s'inspire directement de cette ligne de pensée. L'étude des syndromes DAL ainsi que des souris transgéniques déficientes pour différentes molécules d'adhérence intercellulaire ont démontré les rôles de ces molécules dans : (1) la translocalisation des cellules en un site particulier, qu'il s'agisse d'un site d'inflammation ou de maturation tels que les ganglions lymphatiques, (2) la transmission de signaux de l'environnement extracellulaire vers le cytoplasme via l'activation de cascades signalétiques menant aux réponses fonctionnelles spécifiques, (3) la maturation des lymphocytes B et T, (4) l'agrégation des plaquettes et la cicatrisation, (5) le

développement de métastases cancéreuses, (6) la résistance aux infections bactériennes et (7) le phénomène de rejet de greffe (pour un examen de la question, voir notamment Crockett-Torabi, 1998 ; Cines *et al.*, 1998 ; Etzioni *et al.*, 1999).

Les molécules d'adhérence intercellulaire ont donc un rôle essentiel dans l'élaboration de la réponse immunitaire, dépassant largement le cadre des processus d'inflammation. Dans le cadre de cet ouvrage, nous n'aborderons que certaines de leurs fonctions envisagées en l'occurrence pour leur potentiel de biomarqueur.

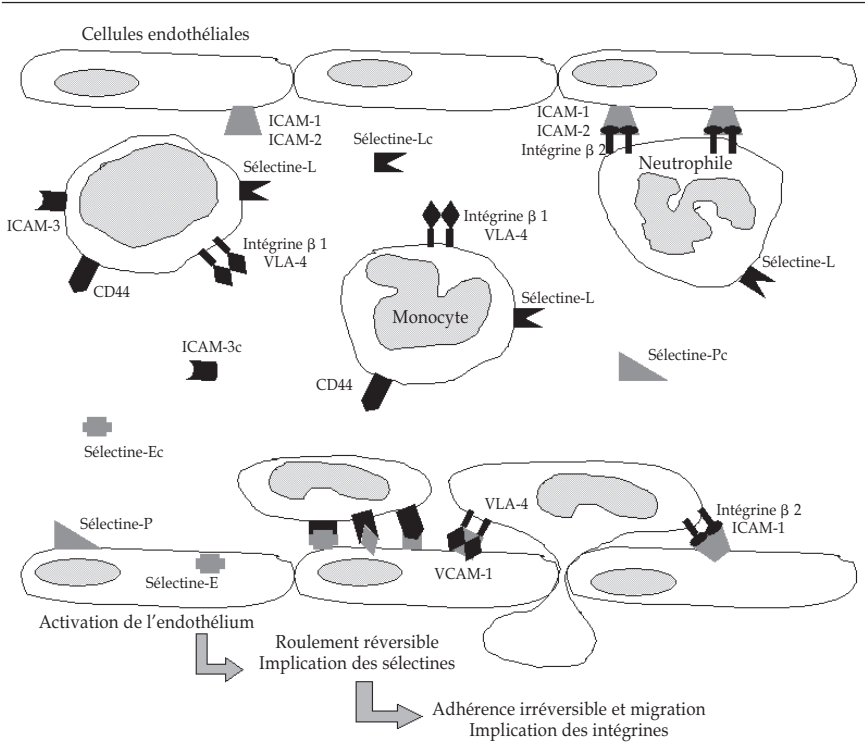
Chez les mammifères, la translocalisation des cellules immunitaires de leur site de production (organes lymphoïdes primaires) vers leur site de maturation (organes lymphoïdes secondaires) constitue une étape essentielle du fonctionnement de la réponse immunitaire. Plusieurs études tendent à démontrer le rôle déterminant de l'expression différentielle des molécules d'adhérence dans la migration spécifique des lymphocytes « naïfs » et des cellules « mémoires » (Picker, 1994 ; Mackay *et al.*, 1992 ; Gerberick *et al.*, 1997). Il a été démontré que les lymphocytes T inactivés contiennent un pourcentage important de cellules exprimant beaucoup de sélectine-L et peu de CD44, une autre famille de molécules d'adhésion intercellulaire. Par contre, les lymphocytes T activés comprennent un important pourcentage de cellules exprimant peu de sélectine-L et beaucoup de CD44 (McHeyzer-Williams et Davis, 1995).

L'activation des granulocytes (neutrophiles – éosinophiles – basophiles) s'accompagne d'une augmentation de l'expression de CD11b, l'une des chaînes α des intégrines de la classe β_2 , ainsi que d'une diminution de la sélectine-L (Spoelstra *et al.*, 1998b ; Taylor *et al.*, 2000). Par conséquent, les niveaux relatifs d'expression des différentes molécules d'adhérence intercellulaire peuvent être considérés comme un biomarqueur de l'état d'activation ou du niveau de maturation des leucocytes. De cet état dépend la fonction des leucocytes et l'efficacité de la réponse immunitaire.

À l'exception de leur migration au sein de différents organes lymphoïdes au cours de leur maturation, la réponse inflammatoire constitue le processus le plus important nécessitant la migration des cellules immunitaires en un site donné. Le processus d'inflammation implique la migration des leucocytes vers le site d'inflammation, leur adhérence au niveau de ce site et leur migration au sein du tissu. Lors d'une réponse inflammatoire, l'expression différentielle des différentes molécules d'adhérence intercellulaire contribue au recrutement sélectif des différentes sous-populations de leucocytes sur le site d'inflammation. Les souris déficientes en sélectine-L présentent une altération du recrutement des leucocytes sur le site inflammatoire (Tedder *et al.*, 1995). La sélectine-E est

responsable de l'adhésion des neutrophiles, des éosinophiles, des cellules T ainsi que des monocytes alors que l'ICAM-1, exprimée à la surface des cellules endothéliales, est le ligand pour CD11a/CD18 (intégrine la classe $\beta 2$) exprimé sur les neutrophiles, les lymphocytes et les monocytes. La VCAM-1, également exprimée à la surface des cellules endothéliales, est le ligand des intégrines $\beta 1$ exprimées sur les lymphocytes, monocytes et éosinophiles. Il s'agit d'un processus dynamique et séquentiel. Les sélectines sont responsables du « premier contact » éventuellement transitoire entre les leucocytes et les cellules endothéliales. Ensuite, un contact plus « serré » est assuré par les intégrines (Roitt *et al.*, 1994). La figure 7.2 illustre brièvement ce processus ainsi que l'expression des principales molécules d'adhérence intercellulaire à la surface des cellules immunitaires et endothéliales.

Figure 7.2
Principales molécules d'adhérence intercellulaire et leur implication dans le processus séquentiel de migration cellulaire



Les fractions circulantes solubles dans le plasma sont identifiées par leur nom directement suivi de « c ».

Il existe différents types de réaction inflammatoire, contrôlée par plusieurs groupes de médiateurs, dont les cytokines. Le contrôle de ces médiateurs sur la cascade inflammatoire s'exerce en premier lieu sur le stade initial du processus : l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales via les molécules d'adhérence intercellulaire. D'une manière générale, les cytokines proinflammatoires tels le TNF- α et l'IL-1 vont augmenter l'expression de ces molécules sur les leucocytes et les cellules endothéliales.

De l'importance démontrée des sélectines et des intégrines, nous pouvons déduire que toute modulation de leur synthèse ou de leur localisation pourrait entraîner d'importantes conséquences au niveau du système immunitaire, qu'il s'agisse de la maturation des leucocytes ou des réactions inflammatoires. À l'heure actuelle, il existe peu d'études concernant les effets directs des xénobiotiques sur les sélectines et intégrines. Cependant, de nombreux xénobiotiques ont un potentiel proinflammatoire démontré (Schook et Laskin, 1994).

Les molécules d'adhésion interviennent lors de réactions inflammatoires provoquées par une hypersensibilité de type I ou allergie qui peut, en outre, se manifester par l'asthme ou l'allergie respiratoire. Par exemple, l'expression de l'ICAM-1 et de la sélectine-E est plus importante chez les patients atteints d'asthme (Bentley *et al.*, 1994 ; Holgate *et al.*, 1995). Le processus inflammatoire lié à l'asthme induit une migration des granulocytes éosinophiles vers les voies respiratoires où ils deviennent activés. Cette activation des granulocytes éosinophiles s'accompagne d'une augmentation de l'expression de CD11b ainsi qu'une réduction de sélectine-L (Spoelstra *et al.*, 1998a).

Plusieurs études ont démontré l'influence de facteurs environnementaux lors du développement de l'asthme (Steerenberg *et al.*, 1999). L'exemple de la pollution de l'air illustre parfaitement la complexité des situations auxquelles nous devons faire face en toxicologie de l'environnement.

L'inflammation des poumons causée par les polluants de l'air atmosphérique constitue un des problèmes majeurs des grands centres urbains. Comme c'est souvent le cas en toxicologie environnementale, bien que plusieurs études épidémiologiques tendent à démontrer le lien entre le niveau de pollution de l'air et l'occurrence de certaines pathologies pulmonaires et cardiovasculaires, il est difficile d'établir un lien direct découlant de l'identification d'un mécanisme d'action précis. Plusieurs études ont cependant démontré les effets de certains polluants de l'air sur les sélectines ainsi que sur les intégrines.

Les enfants vivant dans la partie sud-ouest de la ville de Mexico se plaignent de divers symptômes : sécrétion importante de mucus nasal, obstruction nasale intermittente, quinte de toux durant la journée, saignement de nez et douleurs au niveau de la poitrine. Trente-sept des 38 enfants examinés présentaient une atrophie de la muqueuse nasale et tous les enfants présentaient une cytologie anormale de la cavité nasale (Calderon-Garciduenas *et al.*, 1995). Le nombre de cellules polymorphonuclées (PMN) dans la cavité nasale de ces enfants était plus élevé que chez les enfants vivant dans un port de la côte du Pacifique. Les PMN de la cavité nasale des enfants de la ville de Mexico présentaient également une plus grande expression de CD11b. On soupçonne l'ozone, le polluant de cette partie de la ville de Mexico, d'être le principal responsable de ces effets (Calderon-Garciduenas *et al.*, 1995).

On sait qu'une exposition à l'ozone produit une augmentation des cellules polymorphonuclées PMN dans les voies respiratoires. Cette augmentation s'accompagne de modulations de l'expression des molécules d'adhésion cellulaire à la surface des leucocytes et des cellules endothéliales des voies respiratoires (Krishna *et al.*, 1997 ; Hoffer *et al.*, 1999 ; Bhalla et Gupta, 2000).

Toutefois, on ne peut exclure les effets d'autres polluants tels que, par exemple, les gaz d'échappement. Une exposition à court terme au gaz d'échappement des moteurs diesel provoque une augmentation des neutrophiles, des mastocytes ainsi que des cellules T CD4+ et CD8+ parallèlement à une augmentation de l'ICAM-1 et de la VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales au niveau des bronches chez l'humain (Salvi *et al.*, 1999). Ce gaz d'échappement contient notamment de très petites particules. Or, l'exposition *in vitro* aux particules d'air urbain provoque une diminution de l'expression de CD11b et de CD29 des macrophages alvéolaires et des monocytes du sang périphérique chez l'humain. L'expression de CD11c est également réduite chez les macrophages, mais elle n'est pas modulée chez les monocytes. Parallèlement, la capacité de phagocytose de ces cellules a été altérée suite à l'exposition aux particules urbaines ce qui indique que ces particules pourraient être responsables d'une diminution de la capacité du système immunitaire à éliminer les pathogènes aux sites d'entrée privilégiés que constituent les poumons (Becker et Soukup, 1998).

La fumée de cigarette, un autre polluant majeur de l'air ambiant, produit une inflammation des voies respiratoires chez tous les fumeurs, ce qui se traduit par une modulation des sélectines et des intégrines aux sites inflammatoires (Gonzalez *et al.*, 1996).

Les phénomènes d'allergie ne se limitent pas aux allergies respiratoires. L'épiderme peut également être le site d'une réaction inflammatoire résultant d'un phénomène allergique. L'eczéma atopique est une manifestation allergique extrêmement répandue chez les enfants en bas âge. Plusieurs études ont démontré que le niveau de sélectine-E circulante (sélectine-Ec) présente dans le plasma constitue un indicateur de l'inflammation épidermique pouvant être corrélé à la gravité de l'inflammation (Laan *et al.*, 1998 ; Wolkerstorfer *et al.*, 1998).

Gerberick *et al.* (1997, 1999) ont démontré que le pourcentage de lymphocytes T présentant un phénotype « activé » (exprimant peu de sélectine-L et beaucoup de CD44, voir plus haut) augmentait dans les ganglions lymphatiques de souris lors d'une exposition dermique à différents allergènes. Cependant, une exposition de même type à un irritant n'affecte pas le nombre relatif de ces cellules. Ces résultats pourraient conduire à l'utilisation de ces deux molécules d'adhésion cellulaire en tant que biomarqueurs dans le but d'identifier le type de réponse induite suite à l'exposition à un xénobiotique.

La fumée de cigarette, dont nous avons brièvement parlé précédemment dans le contexte de la pollution atmosphérique, est également classée parmi les premiers facteurs de risque d'artériosclérose. L'adhérence des monocytes du sang à l'endothélium, suivi de leur migration à l'intérieur du tissu endothélial et de la formation de macrophages riches en lipides, sont les étapes initiales du développement de l'artériosclérose. Il a été démontré que la fraction particulaire de la fumée de cigarette augmente fortement l'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales. Parallèlement, les auteurs ont constaté une augmentation de l'expression du ligand à CD11b à la surface des monocytes ainsi que de l'expression de l'ICAM-1 et de l'ELAM-1 à la surface des cellules épithéliales. L'augmentation de l'adhésion des monocytes est inhibée par la présence d'anticorps monoclonaux contre CD11b ou ICAM-1 et ELAM-1, illustrant par le fait même le rôle de ces molécules. La nicotine et le sulfate de cadmium, pourtant deux constituants importants de la fraction particulaire de la fumée de cigarette, n'ont d'effet ni sur l'expression de CD11b ni sur l'adhérence des monocytes sur les cellules endothéliales, qu'ils soient présents séparément ou de manière combinée. Il est intéressant de noter que bien que la fraction particulaire de la fumée de cigarette augmente l'adhérence des monocytes du sang périphérique, aucun effet n'a pu être observé avec les lignées cellulaires de monocytes que sont THP-1, HL-60 et U937 (Kalra *et al.*, 1994). Les résultats obtenus par Shen *et al.* (1996) démontrent qu'une exposition *in vitro* à un condensé de fumée de cigarette induit l'expression de plusieurs molécules d'adhésion cellulaire telles l'ICAM-1, la VCAM-1 et la sélectine-E sur les cellules endothéliales de la

veine ombilicale humaine. L'augmentation de l'expression de ces molécules est associée à une augmentation de la liaison du facteur de transcription NF- κ B à la séquence consensus aux molécules d'adhésion cellulaire.

Le cadmium (Cd) est un contaminant environnemental largement répandu et extrêmement toxique. La fumée de cigarette constitue l'une des principales voies d'exposition. La contamination par la chaîne alimentaire représente l'autre voie majeure d'exposition. Il a été démontré qu'une exposition aiguë provoque des œdèmes pulmonaires ainsi que de graves lésions du foie (Dudley *et al.*, 1982 ; Friberg *et al.*, 1986). Les effets du Cd au niveau du foie peuvent être mis en relation avec une inflammation du tissu. En effet, le tissu endommagé est souvent infiltré de cellules inflammatoires, essentiellement les neutrophiles (Hoffmann *et al.*, 1975 ; Dudley *et al.*, 1982 ; Theocharis *et al.*, 1991). L'expression de plusieurs gènes d'*acute-phase proteins* ou des cytokines proinflammatoires telles que le TNF- α a également été démontrée (Yiangou *et al.*, 1991 ; Kayama *et al.*, 1995). Cependant, la relation entre Cd, hépatotoxicité et inflammation est quelque peu ambiguë. Dans une récente étude, des souris transgéniques qui surexpriment l'IL-8 humaine ont été soumises à une exposition aiguë au Cd. La surexpression de l'IL-8 entraîne une absence de gradient de cette cytokine qui conduit le neutrophile sur le site d'inflammation ainsi qu'une sous-expression de la sélectine-L. Il en résulte une altération importante de la capacité des neutrophiles à migrer vers le site d'inflammation et à s'y fixer. Les résultats de cette étude démontrent que la toxicité du Cd est plus importante chez les souris transgéniques bien qu'une hépatotoxicité marquée soit présente chez les deux types de souris. Il apparaît donc que dans ce cas, l'établissement d'une réaction inflammatoire ou tout au moins une migration des neutrophiles dans le foie soit profitable à l'animal et limite la toxicité du métal. Les auteurs avancent l'hypothèse selon laquelle les neutrophiles présents sur le site d'inflammation pourraient phagocyter les hépatocytes nécrosés ou les enzymes libérées suite à la mort des cellules résultant d'un effet direct du Cd (Horiguchi *et al.*, 2000). Il faut cependant mentionner que les souris transgéniques présentaient un profil de synthèse des métallothionéines dans le foie très différent des souris témoins. Les métallothionéines sont reconnues pour jouer un rôle essentiel dans la modulation des effets toxiques des métaux et tout spécialement du Cd. Un rôle important de cette différence de la cinétique d'induction des métallothionéines sur le meilleur taux de survie des souris témoins n'est pas à exclure.

Le Cd ainsi que le nickel (Ni) se sont également avérés susceptibles de stimuler l'adhérence des PMN du sang périphérique humain via une modulation des intégrines β 2. Contrairement au phénomène d'adhérence

spontanée qui dépend fortement du calcium intracellulaire, la stimulation de l'adhérence des PMN par le Ni ou le Cd dépend fortement du calcium extracellulaire (Hernandez et Macia, 1996).

Signalons également le cas d'une pathologie liée à l'inflammation des vaisseaux sanguins et dont la cause, ou tout au moins l'une des causes probables, pourrait être en relation avec une contamination de l'environnement. La maladie du « pied noir » est une maladie chronique des vaisseaux sanguins périphériques. Elle est endémique à certaines régions de l'île de Taiwan. Un lien a pu être établi entre la contamination de l'eau de boisson par les acides humiques et l'occurrence de la maladie. Récemment, il a été démontré que les acides humiques inhibent la synthèse de l'ICAM-1, de la VCAM-1 ainsi que de la sélectine-E dans des cellules endothéliales humaines stimulées par le lipopolysaccharide (LPS). Cette inhibition semble être le résultat d'une réduction de l'activation de NF- κ B, un facteur de transcription extrêmement important lors de l'initiation du processus inflammatoire (Gau *et al.*, 2000).

La migration des leucocytes sur le site inflammatoire est un phénomène physiologique qui fait partie intégrante de la réponse immunitaire. Toutefois, certaines pathologies sont liées à la migration inappropriée de leucocytes au sein de certains tissus. Par exemple, l'infiltration des leucocytes au sein du système nerveux central (SNC) est associée à plusieurs pathologies cérébrales. Dans le cas de la sclérose en plaques, le passage des lymphocytes T activés dans le SNC constitue une étape-clé dans le déclenchement de la réponse auto-immune responsable des lésions démyélinisantes (Hartung *et al.*, 1995). Un taux élevé d'IL-1 accompagne généralement ces pathologies. Il a été démontré que l'IL-1 pouvait induire l'expression de la VCAM-1 et de l'ICAM-1 à la surface d'une lignée cellulaire d'astrocytes humains (Moynagh *et al.*, 1994). La surexpression de ces molécules d'adhérence intercellulaire pourrait favoriser la migration inopportune des lymphocytes.

Le monoxyde de carbone (CO) est un autre polluant environnemental d'importance, mais également un produit métabolique ayant des effets physiologiques (Cobb et Etzel, 1991 ; Verma *et al.*, 1993). L'hypoxie et la formation de carboxyhémoglobine constituent l'une des causes de toxicité les plus reconnues du CO. Cependant, ce mécanisme de toxicité n'explique pas les effets neurotoxiques. Les études menées sur le rat ont permis de démontrer que l'augmentation du nombre de leucocytes dans les capillaires cérébraux était liée au stress oxydatif cérébral à l'origine des effets neurotoxiques de l'exposition au CO. L'inhibition de l'adhérence des leucocytes suite à un traitement avec un anticorps monoclonal dirigé contre le monomère CD18 des intégrines β 2 supprime le stress oxydatif et les effets toxiques du CO sur les neurones (Thom, 1993 ; Thom *et al.*, 1994).

Le potentiel carcinogénique de nombreux xénobiotiques a été démontré; il fait encore actuellement l'objet de nombreuses recherches visant à déterminer l'importance relative des causes environnementales liées au développement de cancer. De nombreux cas de cancers chez l'humain ont une origine épithéliale et la mort résulte souvent de la dissémination des cellules tumorales vers d'autres organes sains via le système sanguin ou lymphatique. Ces cellules tumorales vont envahir l'épithélium sain et y développer une tumeur maligne secondaire ou métastase. Plusieurs études démontrent l'implication des molécules d'adhérence intercellulaire quant à l'adhérence des cellules tumorales aux cellules épithéliales ainsi qu'au développement de métastases (Araki *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998). Plusieurs molécules d'adhérence intercellulaire ont également un rôle essentiel dans le processus d'angiogénèse. Or, l'angiogénèse constitue un processus crucial pour le développement d'une tumeur qui édifie ainsi son propre réseau d'irrigation sanguin. La découverte de fraction soluble de certaines des molécules d'adhésion intercellulaire circulantes dans le sérum a ouvert la porte à leur utilisation en tant que biomarqueurs. Plusieurs études ont démontré une altération des niveaux de sélectine-Ec chez les patients atteints de cancer. Des concentrations élevées en sélectine-Ec ont été mesurées chez les patientes atteintes de cancer du sein ou des ovaires (Banks *et al.*, 1993; Hebbar *et al.*, 1998). Par contre, les patients atteints de myélome ou de néphrocarcinome ont des niveaux réduits de sélectine-Ec (Banks *et al.*, 1993; Dosquet *et al.*, 1997), alors que les niveaux mesurés chez les malades souffrant d'un cancer de l'estomac ou du rectum ne diffèrent pas des valeurs normales (Velikova *et al.*, 1998; Benekli *et al.*, 1998).

Des niveaux élevés d'ICAM-1, de VCAM-1 et de sélectine-Ec ont également été mesurés chez les personnes atteintes de diverses pathologies hépatiques. L'augmentation de l'expression de ces molécules peut être corrélée avec le développement de la maladie et l'activation de processus immunologiques (Volpes *et al.*, 1990; Volpes *et al.*, 1992; Lim *et al.*, 1995; Adams *et al.*, 1992; Soresi *et al.*, 1997). Les concentrations de sélectine-Ec sont significativement supérieures chez les personnes atteintes d'hépatite chronique ainsi que de cirrhose du foie de type A. Toutefois les niveaux diminuent lorsque la cirrhose évolue vers un type C (classification de Child). La corrélation entre les niveaux de sélectine-Ec et plusieurs paramètres de cytolysse et de fibrose ainsi qu'avec les niveaux de TNF α tendent à démontrer que des niveaux élevés de sélectine-Ec sont reliés au degré de nécrose, de fibrose et d'inflammation du foie (Cervello *et al.*, 2000).

Mentionnons également que des niveaux élevés de sélectine-Ec ont été associés à certaines pathologies inflammatoires tels que, par exemple, le diabète sucré de type I, le lupus érythémateux systémique et la sclérodermie (Gearing *et al.*, 1992; Newman *et al.*, 1993; Gearing et Newman, 1993).

La thalidomide, tristement célèbre, a suscité l'intérêt des chercheurs issus de nombreuses disciplines depuis sa mise en cause dans les malformations des membres suite à la prise de médicaments dont elle était l'agent actif. Bien que de nombreuses études aient été publiées à son sujet, le mécanisme d'action de la thalidomide est encore loin d'être complètement élucidé. Toutefois, plusieurs de ces études ont démontré un effet important de cette molécule sur l'expression des molécules d'adhérence intercellulaire et tout spécialement sur les intégrines (Neubert *et al.*, 1993; Nogueira *et al.*, 1994; Neubert *et al.*, 1992). Un des mécanismes d'action proposé implique une modulation de la transcription des gènes des sous-unités αV et $\beta 3$ des intégrines via une inhibition de la production du facteur de croissance semblable à l'insuline (*insulin-like growth factor 1* ou IGF-1) et du facteur de croissance fibroblastique (*fibroblast growth factor 2* ou FGF-2) qui stimulent la transcription des gènes de αV et $\beta 3$. L'intégrine résultant de l'assemblage de ces deux sous-unités stimule à son tour l'angiogénèse nécessaire à la croissance et au développement des membres (Stephens, 1997; Stephens *et al.*, 2000).

Il apparaît donc clairement que les sélectines et les intégrines exercent des rôles essentiels au sein du système immunitaire et en ce qui concerne le développement de cancers et la croissance normale de l'individu. Une modification de l'expression de ces protéines à la surface des cellules endothéliales et immunitaires engendre des conséquences qui dépassent largement le cadre de la réponse immunitaire. L'effet de plusieurs polluants environnementaux sur l'expression des molécules d'adhérence intercellulaire a été démontré et le rôle de ces protéines lors des premières étapes du processus inflammatoire les place parmi les biomarqueurs potentiels des réactions inflammatoires suscitées par l'exposition à un xénobiotique. Cependant, vont-elles être le vecteur par lequel le xénobiotique exercera son effet ou seront-elles la conséquence de la cascade inflammatoire engendrée (en amont) par le ou les xénobiotiques ?

Cette question, qui peut s'appliquer à plusieurs biomarqueurs, reste encore à élucider dans de nombreux cas. Des études telles que celles de Gerberick *et al.* (1997, 1999) démontrent par ailleurs la possibilité d'utiliser les molécules d'adhérence intercellulaire afin de déterminer si le xénobiotique se comporte comme un allergène ou un irritant. La poursuite des recherches concernant ces molécules devrait dès lors permettre non

seulement de raffiner leur utilisation en tant que biomarqueurs de l'exposition à certains types de xénobiotiques, mais encore d'en comprendre le mode d'action et d'en prévoir les effets.

3. JONCTIONS LACUNAIRES ET COMMUNICATION INTERCELLULAIRE

Dans le cas de nombreux contaminants, l'exposition chronique d'un organisme à de faibles doses engendre des désordres physiologiques non létaux à court terme. Ces effets peuvent se manifester de différentes façons au niveau cellulaire et moléculaire. En général, l'une des premières réponses cellulaires à être observée est la perte d'association ou de communication d'une cellule avec les autres cellules avoisinantes. Cette perte de communication semble particulièrement importante dans le développement de certaines tumeurs et pourrait être reliée au fait que des messages inhibiteurs de croissance ou des messages suicides venant d'une cellule saine ne peuvent être transmis à une cellule qui démontre des signes de dérégulation. La communication intercellulaire directe entre les cellules avoisinantes se fait via les jonctions lacunaires (*gap junctional intercellular communication* ou GJIC) qui permettent de joindre les cytoplasmes des cellules via un pore intercellulaire.

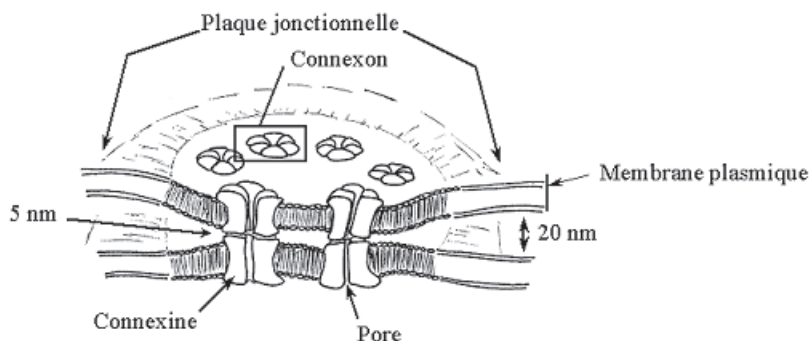
3.1. CONNEXINES ET JONCTIONS LACUNAIRES

Il est bien établi que le cancer trouve son origine dans un déséquilibre de l'homéostasie. Or, cet équilibre est maintenu et contrôlé par la propagation de messagers à l'intérieur des cellules (communication intracellulaire), à l'extérieur des cellules (communication extracellulaire) et entre les cellules (communication intercellulaire). Ces trois types de communication cellulaire assurent le contrôle de la prolifération, de la différenciation, de l'adaptation et de l'apoptose dans un tissu sain. Bien qu'il existe une grande variété de types de cancers pouvant affecter un même tissu, certaines caractéristiques se retrouvent associées à presque toutes les tumeurs. Si l'on examine ces caractéristiques, il est alors possible d'associer la formation et la promotion de tumeurs à un dysfonctionnement de la communication intercellulaire via les jonctions lacunaires. Une revue détaillée de cette approche a été publiée par Trosko et Ruch (1998). Ces auteurs postulent même qu'un accroissement de la communication intercellulaire pourrait bénéficier au traitement de certains cancers.

La communication intercellulaire se fait par le biais des jonctions lacunaires. Ces jonctions sont formées de canaux transmembranaires reliant le cytoplasme de deux cellules voisines. Les canaux entre les cellules sont formés de deux semi-canaux ou connexons, eux-mêmes formés par la juxtaposition de six protéines appelées connexines (figure 7.3). Les connexines (Cx) forment une famille de protéines transmembranaires. Le diamètre du pore entre deux cellules varie avec le type de Cx formant la jonction et peut aller de 1,5 à 2 nm. Ceci permet le passage de petits solutés d'une cellule à l'autre (<1 kD). Lors de la formation des jonctions lacunaires, les canaux forment un agglomérat souvent appelé « plaque jonctionnelle » qui est constitué d'un grand nombre de jonctions (de 100 à 1000). La taille de la plaque jonctionnelle peut varier selon le type de cellule et le tissu, et peut atteindre 15 μm .

Figure 7.3

Représentation schématique d'une plaque jonctionnelle



À ce jour, 15 Cx ont été identifiées et clonées chez les mammifères (tableaux 7.1 et 7.2). Bien que leur poids moléculaire varie sensiblement, la structure de la portion transmembranaire des connexines qui forme la jonction est bien conservée. Elles possèdent toutes (Yeager et Nicholson, 1996 ; Bennett *et al.*, 1994) quatre régions transmembranaires et deux terminaisons (amino et carboxyl) intracellulaires (figure 7.4). La troisième portion transmembranaire de la molécule (à partir du NH_2 terminal) est particulièrement riche en acides aminés polaires (hydrophiles) et tapisse le canal entre les deux cellules (Yamasaki *et al.*, 1993).

Tableau 7.1
Liste des connexines identifiées à ce jour chez les mammifères

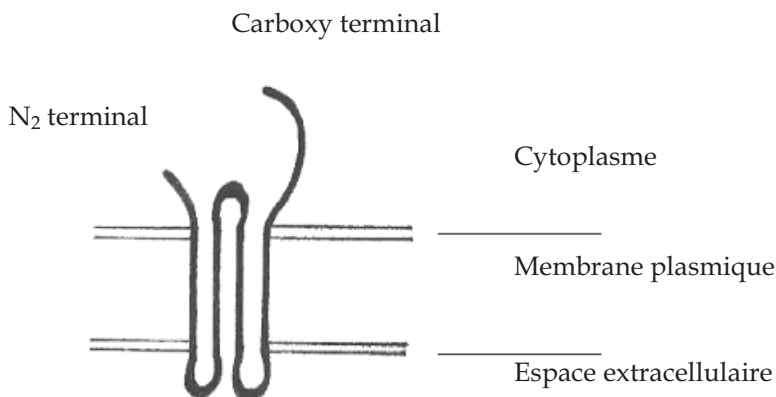
Connexine	Source	Tissu	Références
Cx26	Rongeur, humain	Foie, glande mammaire, intestin, pancréas, épидидyme, cochlée	Lautermann <i>et al.</i> , 1998 ; Lee et Rhee, 1998 ; Monaghan <i>et al.</i> , 1996 ; Pozzi <i>et al.</i> , 1995 ; Kuraoka <i>et al.</i> , 1993 ; Lee <i>et al.</i> , 1992 ; Dufresne <i>et al.</i> , 2001
Cx30	Rongeur	Cerveau, peau, cochlée (souris)	Nagy <i>et al.</i> , 1999 ; Dahl <i>et al.</i> , 1996 ; Lautermann <i>et al.</i> , 1999 ; Goliger et Paul, 1994
Cx30.3	Rongeur	Rein, peau	Tucker et Barajas, 1994 Hennemann <i>et al.</i> , 1992a
Cx31	Rongeur	Rein, peau, placenta	Tucker et Barajas, 1994
Cx31.1	Rongeur	Peau, épithélium	Budunova <i>et al.</i> , 1996 ; Goliger et Paul, 1994 ; Hennemann <i>et al.</i> , 1992a
Cx32	Rongeur, humain	Glande mammaire, foie, système nerveux, pancréas, thyroïde, rein, épидидyme	Munari-Silem, 1996 ; Pozzi <i>et al.</i> , 1995 ; Krutovskikh <i>et al.</i> , 1995 ; Zhang et Nicholson, 1994, 1989 ; Kuraoka <i>et al.</i> , 1993 ; Green <i>et al.</i> , 1996 ; Dufresne <i>et al.</i> , 2001
Cx33	Rongeur	Testicule	Haefliger <i>et al.</i> , 1992
Cx36	Rongeur, humain	Œil, système nerveux central	Al Ubaidi <i>et al.</i> , 2000 ; Belluardo <i>et al.</i> , 1999
Cx37	Rongeur, humain	Cœur, endothélium, estomac, testicule, ovaire, peau, poumon	Haefliger <i>et al.</i> , 2000 ; Chang <i>et al.</i> , 1996 ; Goliger et Paul, 1994 ; Reed <i>et al.</i> , 1993 ; Willecke <i>et al.</i> , 1991
Cx40	Rongeur, oiseau, humain	Cœur, endothélium, muscles lisses, poumon	Becker <i>et al.</i> , 1998 ; Groenewegen <i>et al.</i> , 1998 ; Little <i>et al.</i> , 1995
Cx43	Rongeur, oiseau, humain	Cœur, endothélium, œil, cellules immunitaires, épидидyme, glande mammaire, ovaire, utérus, pancréas, thyroïde, peau	Cyr <i>et al.</i> , 1996 ; Monaghan <i>et al.</i> , 1994 ; Munari-Silem, 1996 ; Pozzi <i>et al.</i> , 1995 ; Goliger et Paul, 1994 ; Butterweck <i>et al.</i> , 1994
Cx45	Rongeur, humain	Cerveau (embryonnaire), cœur, intestin, rein, poumon, peau	Davis <i>et al.</i> , 1995 ; Butterweck <i>et al.</i> , 1994 ; Hennemann <i>et al.</i> , 1992b ; Willecke <i>et al.</i> , 1991
Cx46	Rongeur	Cœur, rein, œil	Hopperstad <i>et al.</i> , 2000 ; Davis <i>et al.</i> , 1995 ; Rup <i>et al.</i> , 1993
Cx50	Rongeur, humain	Cœur, œil	Hopperstad <i>et al.</i> , 2000 ; Zampighi <i>et al.</i> , 1999 ; White <i>et al.</i> , 1992
Cx57	Rongeur	Peau, cœur, rein, testicule, ovaire, intestin	Manthey <i>et al.</i> , 1999

Tableau 7.2**Liste des connexines identifiées à ce jour chez les vertébrés aquatiques**

Connexine	Source	Tissu	Références
Cx27.5	Poisson	Rétine	Dermietzel <i>et al.</i> , 2000
Cx30	Amphibien	Embryon	Levin et Mercola, 2000 ; Meijer <i>et al.</i> , 2000
Cx32	Poisson, amphibien	Cœur, ovaire	Kilarski <i>et al.</i> , 1998 ; Wang et Peracchia, 1996
Cx32.2	Poisson	Ovaire	Yoshizaki <i>et al.</i> , 1994
Cx32.7	Poisson	Ovaire	Yoshizaki <i>et al.</i> , 1994
Cx34.7	Poisson	Intestin	O'Brien <i>et al.</i> , 1998
Cx35	Poisson, amphibien	Rétine, cerveau, ovocyte	White <i>et al.</i> , 1999 ; O'Brien <i>et al.</i> , 1998, 1996
Cx38	Amphibien	Ovocyte	Wang et Peracchia, 1996
Cx41	Amphibien	Ovaire	Yoshizaki et Patiño, 1995 ; Reed <i>et al.</i> , 1993
Cx43	Poisson, amphibien	Rétine, ovaire	Dermietzel <i>et al.</i> , 2000 ; Janssen-Bienhold <i>et al.</i> , 1998
Cx43.3 (DACX43)	Poisson, amphibien	Rétine,	Wagner <i>et al.</i> , 1998
Cx44.1	Poisson	Rétine	Dermietzel <i>et al.</i> , 2000
Cx50	Amphibien	Ovocyte	Zampighi <i>et al.</i> , 1999
Cx55.5	Poisson	Rétine	Dermietzel <i>et al.</i> , 2000

Les connexons peuvent être homomériques ou hétéromériques. De plus, le canal lui-même peut être formé de connexons identiques (homotypique) ou différents (hétérotypique) (Falk, 2000 ; Goodenough *et al.*, 1996). Ces variations de structure affectent la porosité de la jonction lacunaire et permettent de contrôler les substances pouvant diffuser d'une cellule à l'autre. La régulation de ces différents types de jonction lacunaire n'est pas encore bien établie.

L'un des rôles les plus importants des jonctions lacunaires est de permettre le passage de médiateurs, tel l'AMPc, d'une cellule à l'autre afin de coordonner les activités cellulaires au niveau tissulaire. Cette fonction assure non seulement l'homéostasie d'un tissu, mais permet également la réaction synchrone et rapide de nombreuses cellules à l'intérieur d'un tissu. À l'inverse, la faible taille des canaux permet l'exclusion des macromolécules telles que l'ARN, les récepteurs enzymatiques, les protéines et les polysaccharides, assurant ainsi l'intégrité fonctionnelle de chaque cellule.

Figure 7.4**Représentation schématique de l'insertion d'une connexine au sein de la membrane plasmique**

La variation de poids moléculaire entre les connexines résulte de différences de taille au niveau de la boucle intracellulaire et au niveau du carboxy terminal.

D'autres fonctions essentielles ont été attribuées aux jonctions lacunaires (Krutovskikh et Yamasaki, 1997 ; Holder *et al.*, 1993) : a) la conduction d'influx électriques dans les cellules excitables, facilitant ainsi une contraction coordonnée ; b) le transport de nutriments dans les tissus non vascularisés ; c) la propagation d'une réponse à un stimulus hormonal par l'intermédiaire de seconds messagers ; d) la régulation du développement embryonnaire ; e) l'aide à l'élimination de certains métabolites par diffusion vers le système vasculaire.

Afin de mieux comprendre certains mécanismes associés à l'inhibition de la communication intercellulaire lors de la discussion à venir, il est nécessaire d'aborder brièvement les aspects de la formation, de la régulation et de la dégradation des jonctions lacunaires. La connaissance actuelle sur la formation des jonctions lacunaires est presque exclusivement basée sur l'étude de la formation de jonctions composées de Cx43. Après traduction de l'ARN messager, la protéine est importée dans le réticulum endoplasmique. De là, la protéine est transférée dans l'appareil de Golgi, où l'hexamérisation et la formation des connexons ont lieu. Les connexons sont ensuite transportés jusqu'à la membrane plasmique par vésicule. Les mécanismes contrôlant l'insertion des connexons dans la membrane plasmique ainsi que l'appariement des connexons de deux cellules voisines sont encore inconnus. Une fois en place, les connexons se regroupent pour former des plaques de plusieurs centaines de jonctions. Il n'est pas encore

clairement établi si les canaux s'ouvrent avant ou après la formation des plaques jonctionnelles. Lors de la mise en place de la jonction lacunaire, la Cx43 est phosphorylée. L'état de phosphorylation de la protéine affecte la perméabilité de la jonction. La formation des jonctions lacunaires est également intimement liée à la présence de protéines d'adhésion. En effet, il a été démontré que les cadhérines sont indispensables à l'établissement des jonctions lacunaires (Jongen *et al.*, 1991). De par cette association, le calcium joue un rôle important dans la phase finale de la mise en place des jonctions lacunaires.

Contrairement à ce qui a longtemps été admis, les jonctions lacunaires ne sont pas des structures durables. En effet, la demi-vie des Cx est très courte (de 1,5 à 3,5 h), ce qui implique un rythme de synthèse et de dégradation très élevé et un remplacement quasi permanent des jonctions afin de maintenir la communication entre les cellules (Windoffer *et al.*, 2000). Ce dynamisme confère aux cellules une certaine plasticité et leur permet de réguler rapidement la communication intercellulaire en augmentant ou en diminuant le nombre de jonctions lacunaires.

On a proposé plusieurs mécanismes de dégradation des jonctions lacunaires qui semblent Cx-spécifiques et peuvent varier d'un tissu à l'autre. Il semble probable que plusieurs voies de dégradation soient disponibles au sein d'une même cellule. Le premier pas de la dégradation des jonctions lacunaires semble être une invagination dynamique de la membrane conduisant à la formation de vésicules tubulaires contenant les jonctions (Windoffer *et al.*, 2000). Dans le cas de connexons formés de Cx43 par exemple, la jonction est « internalisée » et peut être dégradée dans les lysosomes (Guan et Ruch, 1996) ou les protéosomes, après ubiquitination (Laing *et al.*, 1997 ; Laing et Beyer, 1995), en réponse à des facteurs physiologiques et/ou environnementaux. L'importance relative de ces deux voies de dégradation semble être spécifique du tissu (Trosko et Ruch, 1998). Certains travaux semblent indiquer que c'est la jonction tout entière (2 connexons) qui est internalisée par l'une des deux cellules (Laird, 1996 ; Larsen *et al.*, 1979). Une étude récente sur la dynamique de la formation et de la dégradation des jonctions formées de Cx32 (Windoffer *et al.*, 2000) laisse supposer que le recyclage rapide des éléments composant la jonction se ferait par l'intermédiaire de microvésicules très mobiles capables de transporter les éléments vers les sites de biosynthèse et de dégradation. Une autre voie de dégradation semble associée à des protéases dépendantes du calcium. La Cx32 (Elvira *et al.*, 1994) et la Cx50 (Lin *et al.*, 1997) par exemple peuvent être dégradées par des calpains.

La porosité des jonctions lacunaires est contrôlée principalement par le niveau de phosphorylation des Cx, ce qui a pour conséquence de modifier la structure tertiaire de la protéine et ainsi de moduler la taille

du canal entre les cellules (Brink, 1996). D'autres facteurs tels que le pH, la concentration de calcium, les radicaux libres et la différence de potentiel transmembranaire peuvent également affecter la porosité de la jonction.

L'induction par des contaminants de la perte de GJIC peut être le résultat de l'inhibition d'un ou plusieurs des mécanismes régulatoires décrits précédemment (Trosko *et al.*, 1998). Et comme nous l'avons déjà mentionné, la perte de communication intercellulaire peut favoriser la promotion de tumeurs. Peu de travaux ont été effectués sur l'étude des effets des contaminants environnementaux sur la GJIC, et aucun à notre connaissance chez des espèces sauvages. La section qui va suivre résume l'état des connaissances actuelles sur les effets des contaminants organiques, des organochlorés et des métaux sur la GJIC.

3.2. EFFETS DES XÉNOBIOTIQUES

3.2.1. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les contaminants organiques aromatiques sont des molécules qui, de par leur faible solubilité et leur affinité pour les lipides, ont tendance à se déposer et à se concentrer dans les tissus biologiques riches en lipides. De nombreux travaux ont démontré que plusieurs de ces molécules, en particulier les HAP, peuvent promouvoir des tumeurs *in vivo* et *in vitro*. De plus, ces composés organiques sont aujourd'hui présents dans pratiquement tous les biotopes. Les connaissances des effets des HAP sur la GJIC sont principalement le fruit des travaux d'Upham et collaborateurs sur des lignées de cellules épithéliales de foie, le foie étant l'organe dans lequel on retrouve les concentrations de HAP les plus élevées et le centre de la métabolisation la plus active de ces contaminants. Ces auteurs se sont intéressés à l'inhibition différentielle de la GJIC par plusieurs HAP de structure différente. Malheureusement, ils n'ont pas mesuré les niveaux d'expression des ARNm ou des Cx; il est donc difficile d'établir le mécanisme par lequel ces molécules agissent sur la GJIC. D'une manière générale, les HAP de plus petit poids moléculaire (3 cycles) ont un pouvoir inhibiteur plus grand, en partie à cause d'une plus grande solubilité (Upham *et al.*, 1994). Il semble également que la structure isomérique des molécules soit un facteur déterminant pour l'inhibition de la GJIC. En effet, les HAP dont la structure comporte une substitution formant une *bay-like region* sont capables d'inhiber la GJIC (Rummel *et al.*, 1999; Weis *et al.*, 1998, Upham *et al.*, 1998, 1996), alors que les mêmes concentrations d'isomères à structure linéaire et planaire n'ont pas d'effet détectable *in vitro* sur la GJIC (Rummel *et al.*, 1999; Upham *et al.*, 1996). De plus, certains composés non substitués (de faible poids moléculaire), tel le naphthalène, se sont avérés cytotoxiques (Weis *et al.*, 1998) et ont engendré des

dommages membranaires pouvant être à l'origine de la perte de GJIC observée. Des expériences réalisées récemment ont montré qu'une exposition *in vivo* à la β -naphthoflavone à raison de 2 %, 1 %, et 0 % de la ration alimentaire pendant 6 semaines entraîne une réduction de Cx32 dans le foie qui coïncide avec une induction des CYP1A1 et 2 (Shoda *et al.*, 2000).

L'inhibition de la GJIC par les HAP est rapide ; elle varie de 30 s à 5 min suivant le composé (Weis *et al.*, 1998) et, dans la plupart des cas, elle est réversible après 1 h de dépuration (Upham *et al.*, 1996 ; 1994). Il est intéressant de noter que les produits de dégradation par ozonation de plusieurs HAP particulièrement cancérigènes (le pyrène, le benzo(a)pyrène, le fluoranthène) se sont avérés capables d'inhiber la GJIC *in vitro* (Upham *et al.*, 1994). Cette technique de traitement des effluents utilisée pour la dégradation par oxydation de molécules organiques ne semble donc pas éliminer les risques d'exposition à des composés promoteurs de tumeurs.

3.2.2. Phénobarbital (PB)

Le PB est reconnu comme un promoteur de tumeurs dans le foie et, de ce fait, la plupart des études sur les effets du PB ont été conduites sur le foie ou des lignées cellulaires de cellules hépatiques. Les premières mentions de l'effet du PB sur la communication intercellulaire remontent à plus de 10 ans (Fitzgerald *et al.*, 1989 ; Ruch et Klaunig, 1988). Depuis, toutes les études ont montré une réduction dramatique reliée à la dose de la communication intercellulaire par le PB pouvant atteindre, suivant la dose, 50 % *in vivo* (Kolaja *et al.*, 2000a ; Ito *et al.*, 1998 ; Krutovskikh *et al.*, 1995) et 70 % *in vitro* (Ren et Ruch, 1996 ; Leibolt et Schwarz, 1993 ; Ruch *et al.*, 1987). De plus, Ren *et al.* (1998) ont montré que le PB a une action spécifique à la cellule et inhibe la GJIC dans les hépatocytes et non dans les cellules épithéliales de foie.

La réduction de la GJIC semble résulter de la combinaison de plusieurs effets qui varient avec la dose et la durée du traitement : 1) réduction (faible) de la concentration de protéine Cx32 ; 2) localisation cytoplasmique aberrante de la protéine Cx32 ; 3) réduction du nombre de jonctions lacunaires (Ito *et al.*, 1998 ; Krutovskikh *et al.*, 1995) ; et 4) stress oxydatif (Guppy *et al.*, 1994 ; Leibolt et Schwarz, 1993 ; Scholz *et al.*, 1990 ; Ruch et Klaunig, 1986). Dans tous les cas, les niveaux d'expression des ARNm des Cx exprimées dans le foie (Cx32, Cx26 et Cx43) n'ont pas été affectées par le PB.

Le mécanisme principal lié à la diminution de GJIC semble un stress oxydatif puisque la présence d'antioxydants permet d'empêcher l'inhibition de la communication. Plusieurs antioxydants ont donné des résultats similaires : traitement à la superoxide dismutase, la N,N'-diphényl-1,4-phénylénédiamine, la vitamine E (Leibolt et Schwarz, 1993 ; Ruch et

Klaunig, 1986) et la glutathione (Guppy *et al.*, 1994). Cependant, une partie des résultats semblent contradictoires. En effet, la plupart des études suggèrent que le stress oxydatif provient des produits de la dégradation du PB via les cytochromes P450 (Klaunig et Ruch, 1990 ; Guppy *et al.*, 1994 ; Neveu *et al.*, 1994c ; Ren *et al.*, 1998) puisque la présence d'un inhibiteur spécifique des cytochromes P450 (SKF-525A) prévient l'inhibition de la GJIC par le PB. Au contraire, Leibold et Schwarz (1993) précisent qu'il semble peu probable que les cytochromes P450 soient à l'origine des radicaux oxydatifs, puisque la GJIC est inhibée après seulement 5 minutes d'exposition au PB (période trop courte pour induire une activité P450-dépendante). Si c'est le cas, les cytochromes P450 pourraient jouer un rôle autre que la production de radicaux oxydatifs dans la modulation de l'effet du PB sur la GJIC. L'origine du stress oxydatif responsable de l'inhibition de la GJIC ne semble donc pas encore bien établie.

Finalement, deux points intéressants ressortent de la littérature. D'une part, les effets du PB sur la communication intercellulaire *in vitro* sont réversibles au bout de 24 heures si le PB est retiré du milieu de culture (Ren et Ruch, 1996 ; Leibold et Schwarz, 1993). D'autre part, la répétition de l'exposition des hépatocytes au PB permet le « conditionnement » des cellules, ce qui les rend réfractaires aux effets du PB (Ruch et Klaunig, 1988). De la même manière, chez des rats traités pendant 28 jours à une faible dose (0,1 % m/v dans l'eau), l'exposition des hépatocytes au PB *in vitro* n'entraîne aucune modification de la GJIC (Guppy *et al.*, 1994).

3.2.3. Organochlorés

Les effets des composés organochlorés sur les jonctions lacunaires ont été de loin les mieux étudiés de tous les contaminants promoteurs de tumeurs rassemblés ici. Les organochlorés sont un groupe de composés organiques dont un ou plusieurs atomes d'hydrogène ont été substitués par un atome de chlore. Cette classe de molécules regroupe de nombreux composés utilisés comme insecticides tels que le lindane et le DDT ainsi que des rejets industriels comme les biphényles polychlorés (BPC) et les dioxines. Ces composés sont particulièrement stables et persistants dans l'environnement. Le foie est le principal organe cible de ces contaminants ; c'est pourquoi l'effet des organochlorés a été étudié dans le foie et dans des lignées cellulaires d'hépatocytes. Il semble que tous les résultats publiés indiquent que les organochlorés inhibent la GJIC à des doses plus ou moins fortes. Dans certains cas cette inhibition est réversible après une période de latence ; dans d'autres, 30 minutes d'exposition suffisent à inhiber la GJIC sans aucun signe de récupération après 24 heures (dans des lignées cellulaires). Il ressort que ces agents promoteurs de tumeurs affectent la GJIC en modulant les processus traductionnels et post-traductionnels plutôt que la transcription des Cx.

DDT et lindane

De tous les insecticides, c'est le DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis(*p*-chlorophényl)éthane) qui a reçu le plus d'attention. Bien que ce composé soit particulièrement toxique et carcinogène, il demeure en utilisation dans des cas extrêmes pour empêcher la pullulation cyclique de certains insectes.

Tous les articles publiés à ce jour montrent que le DDT inhibe la GJIC en fonction de la dose aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, quel que soit le type cellulaire ou le protocole utilisé.

In vivo, des doses variant de 5 à 50 mg/kg/jour administrées oralement entraînent une réduction de 40 à 60 % de la GJIC chez le rat (Kurtovskikh *et al.*, 1995 ; Tateno *et al.*, 1994). La réduction de la GJIC est significative après une semaine de traitement et elle se maintient si le traitement est prolongé jusqu'à 5 semaines (Kurtovskikh *et al.*, 1995). Cependant, dans le cas d'un traitement de 50 mg/kg/jour prolongé jusqu'à 6 semaines, Tateno *et al.* (1994) montrent que la GJIC s'est rétablie. Ces études montrent que les niveaux d'ARNm des Cx32, Cx26 et Cx43 ne sont guère affectés dans le foie, à l'exception de la Cx26 dont le niveau d'ARNm augmente après 5 semaines de traitement à 50 mg/kg/jour. Par contre, le marquage immunohistochimique des protéines semble diminuer nettement avec le temps, aussi bien pour la Cx32 que la Cx26.

In vitro, l'inhibition de la GJIC par le DDT est fonction de la dose et de la durée (deGraaf *et al.*, 2000 ; Ren *et al.*, 1998 ; Guan et Ruch, 1996 ; Kang *et al.*, 1996 ; Ruch *et al.*, 1994 ; Leibold et Schwarz ; 1993 ; Aylsworth *et al.*, 1989 ; Tsushimoto *et al.*, 1983). Des doses de 1 à 30 μ M sur une période variant de quelques minutes à 8 heures entraînent une inhibition de la communication variant de 10 % à 70 %. Ces effets sont partiellement réversibles après 12 heures et totalement réversibles après 24 heures de dépuration (Kang *et al.*, 1996).

Plusieurs mécanismes semblent en cause dans la réduction de communication intercellulaire. Tout d'abord, il est intéressant de noter que le DDT ne semble pas ou très peu affecter le niveau d'expression des ARNm des Cx43, Cx32 ou Cx26 (Guan et Ruch, 1996 ; Kang *et al.*, 1996 ; Ruch *et al.*, 1994). En revanche, à forte dose, les niveaux de protéines (Cx32) diminuent (deGraaf *et al.*, 2000). Plusieurs publications rapportent que le DDT entraîne une disparition des plaques jonctionnelles qui s'accompagne d'une diminution de la concentration de Cx43 phosphorylée (Guan et Ruch, 1996 ; Ruch *et al.*, 1994 ; Ren *et al.*, 1998). Ces travaux suggèrent que les jonctions formées de Cx43 phosphorylée seraient internalisées et dégradées dans les lysosomes (Guan et Ruch, 1996). D'autres auteurs font état d'effets au niveau du *trafficking* cellulaire des protéines (Kang *et al.*, 1996 ; Tateno *et al.*, 1994) ou de l'altération du niveau de Ca^{2+} intracellulaire (Ren *et al.*, 1998).

Tout comme le DDT, le lindane (Y-hexachlorocyclohexane) est un insecticide dont l'utilisation est prohibée, reconnu comme promoteur de tumeurs dans le foie. En fait, les effets et les mécanismes d'action du lindane sont similaires à ceux du DDT. Le lindane est un puissant inhibiteur réversible de la GJIC (Guan *et al.*, 1995 ; Guan et Ruch, 1996 ; Leibold et Schwarz, 1993 ; Tsushimoto *et al.*, 1983). Les travaux de Guan *et al.* (1995) démontrent que les effets du lindane (50 mM) varient avec la durée de l'exposition. Après 10-30 minutes d'exposition : inhibition presque totale de la GJIC, mais pas d'effet sur le nombre de jonctions, ni sur l'ARNm ou la protéine Cx43 ; après 1-4 heures d'exposition : inhibition de la GJIC, perte des jonctions lacunaires, diminution de la Cx43 phosphorylée ; pas d'effet sur l'ARNm. Après 1-14 jours : réduction de la GJIC, réduction de la protéine et de l'ARNm (Cx43), réduction non spécifique de la transcription du gène codant pour la Cx43.

La perte de plaque jonctionnelle, donc de GJIC, semble être associée à l'endocytose des jonctions et à la dégradation des Cx43 phosphorylées (Cx43-P2) dans les lysosomes (Guan et Ruch, 1996). En effet, la disparition des plaques jonctionnelles coïncide avec l'apparition d'un marquage de Cx43 cytoplasmique. Ce marquage finit par disparaître après 4 heures de traitement. De plus, la concentration de Cx43-P2 diminue en parallèle, sans que les niveaux de Cx43 non phosphorylée n'augmentent. Finalement, la colchicine et la chloroquine préviennent la diminution de Cx43-P2 et la disparition du marquage cytoplasmique de Cx43, ce qui semble confirmer que les connexons sont internalisés et dégradés dans les lysosomes. Leibold et Schwarz (1993) sont d'avis que l'inhibition de la GJIC par le lindane s'opère par le biais du stress oxydatif, puisque l'utilisation de vitamine E comme antioxydant empêche la perte de communication intercellulaire.

Il semble donc que ces deux pesticides agissent sur les Cx au niveau post-traductionnel, en augmentant l'endocytose des jonctions et la dégradation des Cx formant les connexons.

Hexachlorobenzène (HCB)

L'HCB est un organochloré qui induit la formation de tumeurs hépatiques chez le rat femelle, mais pas chez le mâle. Ce dimorphisme sexuel se manifeste aussi au niveau de la porphyrie, qui est induite uniquement chez la femelle. L'HCB est un cancérigène épigénétique, c'est-à-dire qu'il ne cause pas de mutation à l'ADN mais peut changer l'expression génétique dans le foie. En effet, une exposition à court terme au HCB (5 jours) suffit à causer une augmentation de la susceptibilité des femelles à l'induction de tumeurs au dinitrosamine (DEN) 95 jours plus tard, même quand la teneur en HCB n'est plus mesurable (Krishnan *et al.*, 1991).

Nos travaux ont démontré que l'HCB cause une diminution à long terme de la Cx26 et de la Cx32 dans le foie. Cette diminution est causée seulement chez les rats femelles et pourrait être une des causes responsables pour le dimorphisme sexuel de l'HCB dans l'induction de tumeurs (Plante *et al.*, 2002).

Autres organochlorés et pesticides

Les effets du pentachlorophénol (PCP) sur la GJIC ont été étudiés par Sai et collaborateurs (1998, 2000). Dans des cultures de cellules épithéliales de foie de rat, le PCP diminue la GJIC de façon dose dépendante après 4 heures de traitement (Sai *et al.*, 1998). Cette réduction est suivie d'un rétablissement de la GJIC après 6-8 heures de traitement, puis d'une nouvelle phase d'inhibition après 16-24 heures de traitement. Cette inhibition de la communication est réversible et la GJIC retourne à son niveau normal après 2-4 heures de dépuration. L'inhibition de la GJIC s'explique en partie par la diminution de la concentration de Cx43. Cependant, la localisation membranaire de la Cx43 et le niveau de phosphorylation de la protéine ne sont pas affectés après 24 heures de traitement au PCP.

In vivo, des doses de PCP de 300 ppm et 600 ppm ajoutées à la nourriture de souris mâles (B6C3F1) pendant deux semaines provoquent une inhibition en fonction de la dose de la GJIC dans les hépatocytes. Ce phénomène est associé à une réduction du nombre de jonctions lacunaires formées de Cx32 au niveau de la membrane plasmatique et à un accroissement de la prolifération cellulaire (Sai *et al.*, 2000). Comme c'est le cas pour d'autres composés organochlorés, le mécanisme d'action semble également passer par l'intermédiaire d'un stress oxydatif, puisque des antioxydants sont capables de prévenir partiellement l'inhibition de la GJIC par le PCP (Sai *et al.*, 2000 ; Sai-Kato *et al.*, 1995a,b).

Les congénères de BPC et de dioxines sont des promoteurs de tumeurs au travers de différents mécanismes biochimiques. Cette famille de molécules est grande et en général seuls quelques congénères représentatifs sont étudiés. Tous les travaux rassemblés ici montrent que les BPC et les dioxines inhibent la GJIC de façon dépendante de la dose et réversible. Les congénères BPC153 et BPC118 inhibent complètement la GJIC dans des cellules épithéliales de foie de rat après une heure de traitement (Wärngård *et al.*, 1996), alors que seule une inhibition partielle est obtenue après un traitement prolongé (pouvant atteindre 48 heures) avec le PCB126 (Wärngård *et al.*, 1996) et la 2,3,7,8-dichlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) (Wärngård *et al.*, 1996 ; Ruch *et al.* 1990). Dans tous les cas, la communication intercellulaire était rétablie après 24 heures. De même, l'Aroclor 1254 diminue la GJIC en fonction de la dose à des concentrations non cytotoxiques dans des hépatocytes, augmente la prolifération

parenchymateuse et inhibe l'apoptose hépatique à la concentration de 100 ppm (Kolaja *et al.*, 2000). Kang *et al.* (1996) ont montré que la réduction de GJIC par les congénères de BPC, le toxaphène et la dieldrine peut atteindre 50 %. De plus, il semble que les effets inhibiteurs de certains de ces contaminants soient additifs (Kang *et al.*, 1996). Le mode d'action des BPC et des dioxines sur la GJIC n'est pas encore bien établi. La TCDD et le BPC126 semblent diminuer la concentration de Cx32 dans le foie faiblement à la dose de 10 ppm et pratiquement complètement à la dose de 100 ppm (Bager *et al.*, 1996). En revanche, il ne semble pas y avoir d'effet des BPC sur les niveaux de Cx43 et seule une déphosphorylation de la protéine était apparente (Wärngård *et al.*, 1996). Dans le cas de ces deux Cx, le niveau d'ARNm n'était pas affecté par le traitement. De plus, la distribution de ces deux protéines devient cytoplasmique au sein des tumeurs après traitement. La modulation de ces Cx par les BPC se fait donc au niveau post-transcriptionnel.

D'autres organochlorés tels que l'endosulfan, le chlordane et l'heptachlor inhibent la GJIC en fonction de la dose (50-200 μ M) (Ruch *et al.*, 1990). De plus, l'utilisation de SKF-525A (inhibiteur de P450) ne permet pas de rétablir la communication intercellulaire, donc le mode d'action de ces contaminants est indépendant des cytochromes P450. Nomata *et al.* (1996) montrent également que l'heptachlor inhibe la GJIC à des doses non cytotoxiques (10 mg/ml) dans des cellules épithéliales de glande mammaire humaine après 1 heure de traitement. Dans ce cas particulier, il est à noter que la GJIC n'a pas été rétablie après 24 h de dépuration. Aucune récupération n'est observée après 24 h avec un traitement à 1 μ g/ml. Le niveau d'ARNm Cx43 ne semble pas affecté par le traitement; par contre, la Cx43 est significativement hypophosphorylée par rapport au contrôle. De plus, l'analyse immunohistochimique indique une perte de Cx43 au niveau de la membrane. L'effet de l'heptachlor sur la Cx43 est donc post-traductionnel et proviendrait soit d'un changement au niveau du *trafficking*, soit de l'internalisation et du catabolisme des jonctions.

3.2.4. Métaux

Peu de travaux rapportent les effets des métaux sur la GJIC, bien que plusieurs métaux exercent leur toxicité en entrant en compétition avec le calcium. C'est le cas en particulier pour le Cd. Le Cd est un contaminant dont la présence dans l'environnement est associée au développement industriel. En outre, la fumée de cigarette est la plus importante source d'exposition au Cd chez l'humain. Aujourd'hui encore, peu de traitements contre le Cd sont efficaces.

Les reins et le foie sont les organes cibles où le Cd va s'accumuler préférentiellement. Dans ces organes, le Cd induit la nécrose, l'apoptose et la prolifération cellulaire. Il semble donc raisonnable de penser qu'il affecte la GJIC. Les travaux *in vivo* de Jeong *et al.* (2000) montrent que chez des souris traitées par injection (IP) de Cd (5-60 $\mu\text{M}/\text{kg}$), la GJIC est significativement inhibée. De plus, une réduction de l'expression des Cx32 et Cx26 est induite aussi bien par la dose de 30 $\mu\text{M}/\text{kg}$ de Cd (après 48 h) que par les doses de 5-60 $\mu\text{M}/\text{kg}$ de Cd (après 9 h). Le traitement au Cd produit également un dérèglement et une perte de l'actine du cytosquelette hépatique.

In vitro, l'exposition de cellules au Cd induit un accroissement de la phosphorylation de la Cx43 et une diminution du niveau de Cx32 (Fang *et al.*, 2001). L'accroissement de la phosphorylation de la Cx43 pourrait changer la conformation stérique de la protéine et être la cause d'une réduction de la GJIC à travers les jonctions formées de Cx43. Si les cellules sont exposées au Cd durant le stade de la promotion ou de la transformation, elles expriment de hauts niveaux de Cx43 et de Cx32. Cependant, la Cx43 est distribuée principalement dans la région périnucléaire et non dans la membrane plasmatique et serait donc probablement non fonctionnelle.

Bien que l'exposition à l'amiante soit reconnue comme une cause de cancer, une seule publication à notre connaissance rapporte l'étude de la GJIC associée à ces tumeurs. Dans des lignées cellulaires de mésothéliomes humains associés à l'amiantose, Linnainmaa *et al.* (1993) ont constaté que la GJIC était particulièrement faible par rapport au niveau mesuré dans des lignées primaires de cellules mésothéliales. Cette réduction de la GJIC ne semble pas être le résultat d'une diminution du niveau d'expression de l'ARNm ou de la protéine Cx43. Ces auteurs ont également montré que dans des cultures cellulaires hétérologues de cellules tumorales et de cellules mésothéliales primaires, 80-90 % des jonctions entre les deux types de cellules étaient fonctionnelles. L'exposition de ces cultures hétérologues à l'amiante n'a pas modifié la GJIC. Le travail de Linnainmaa *et al.* (1993) démontre que la déficience de la GJIC est commune à la plupart des cellules de mésothéliomes humains et que cette déficience est permanente. Cependant, le mécanisme de genèse des mésothéliomes par l'amiante demeure inconnu.

Le plomb (Pb) et le mercure (Hg) sont des métaux qui interfèrent avec de nombreuses fonctions cellulaires. Certains dérivés tels que le méthylmercure (MeHg) et le chlorure de méthylmercure sont génotoxiques et conduisent à la formation d'ADN adduit. Une approche intéressante pour étudier l'effet de ces métaux sur la GJIC consiste à mesurer la différence de potentiel entre deux cellules, de part et d'autre des jonctions lacunaires (Schirmmacher *et al.*, 1998).

Schirmmacher et collaborateurs (1998) ont utilisé des cultures de cellules ostéoblastiques pour analyser les effets d'expositions intracellulaires (i) et extracellulaires (e) au Pb, au Hg et au MeHg en suivant les variations du Ca^{2+} intracellulaire. Les concentrations suivantes ont été utilisées : Pb(i) : 25 μM ; Hg(i), Pb(e) et Hg(e) : 5 μM ; MeHg(e) : 1-10 μM . Des résultats, il ressort que le Pb(i et e) et le Hg(e) ne semblent pas avoir d'effet sur la communication intercellulaire proprement dite, alors que le Hg(i) et le MeHg(e) diminuent le couplage électrique de 79,5 % et de 62,4 % respectivement en moins de 15 minutes. Dans le cas des deux métaux, l'augmentation du niveau de Ca^{2+} intracellulaire modifie le couplage électrique entre les cellules, ce qui affecte la jonction lacunaire.

4. JONCTIONS D'ADHÉSION CELLULAIRE

Non seulement les jonctions adhérentes sont essentielles à l'adhésion entre les cellules, mais elles sont également impliquées dans la signalisation intracellulaire, qui permet la différenciation et l'établissement de la polarité des cellules. Les jonctions adhérentes font également partie du processus de régulation des jonctions serrées. Une modification des niveaux de ces protéines a été démontrée lors de la formation de tumeurs cancéreuses, de déficiences rénales et de pathologies telles que la maladie de Crohn (Hollander, 1988). Les effets des contaminants environnementaux sur ces protéines peuvent donc avoir des conséquences importantes pour la santé.

4.1. CADHÉRINES

Les jonctions d'adhérence sont formées par une vaste famille de protéines dépendantes du calcium que l'on nomme cadhérines. Il existe plus de cinquante cadhérines différentes. Ces protéines sont responsables de l'adhésion intercellulaire homotypique entre les cellules adjacentes. Les cadhérines sont des glycoprotéines transmembranaires de simple passage ancré au cytosquelette de la cellule par les caténines (Takeichi, 1991 ; Holton *et al.*, 1990 ; Fujimoto, 1997). La séquence primaire des cadhérines classiques (figure 7.3) contient différents domaines. La région extracellulaire est composée de cinq ectodomaines, dont le site de reconnaissance et de liaison (EC-1 ; figure 7.5). Ce domaine contient un motif de séquences d'acides aminés HAV qui est essentiel à la liaison. Les acides aminés qui entourent la HAV sont responsables de la reconnaissance homotypique. Chaque ectodomaine contient un site de liaison calcique essentiel à la fonction d'adhérence des cadhérines. La région cytoplasmique des cadhérines contient des domaines d'interaction avec les caténines qui, elles, sont impliquées dans la liaison au cytosquelette et dans l'activation des voies

de signalisation de la jonction d'adhérence. Le complexe cadhérine-caténine est requis pour l'adhésion cadhérine-cadhérine (Guger et Gumbiner, 1995 ; Yap *et al.*, 1998). En plus des caténines, différentes études ont démontré que la ZO-1 (*zona occludens-1*) peut aussi interagir avec le complexe cytoplasmique cadhérine-caténine. Le rôle précis de cette protéine, normalement impliquée dans le complexe des jonctions serrées, reste à établir dans la jonction d'adhérence.

4.2. VOIE DE SIGNALISATION DES CADHÉRINES

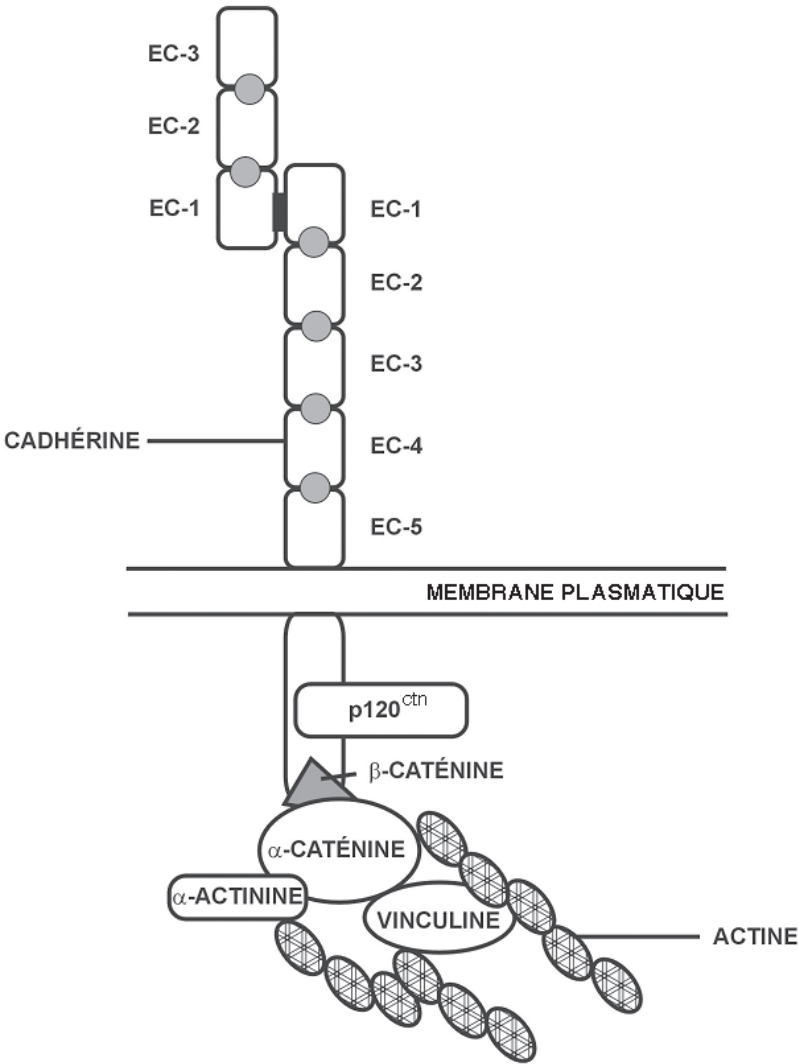
La liaison entre les caténines et les cadhérines est non seulement importante pour ancrer les cadhérines au cytosquelette, mais aussi à des fins de signalisation intracellulaire (Takeichi, 1991, Steinberg et McNutt, 1999 ; Gumbiner, 2000). La structure et la séquence des caténines α et γ ont un niveau élevé d'homologie avec la famille de protéines « Armadillo » qui sont impliquées dans une voie de signalisation intracellulaire chez la drosophile (Peifer *et al.*, 1994). Cette observation a mené à la suggestion que les caténines étaient elles aussi des protéines de signalisation.

Il existe énormément d'intérêt scientifique pour les voies de signalisation des cadhérines. La régulation de ces protéines pourrait représenter d'importantes avenues pour le développement de nouvelles thérapies pour combattre le cancer. Les tyrosines kinases telles que c-Yes, c-Src et c-Lyn ont toutes été identifiées dans la jonction adhérente (Owens *et al.*, 2000). Une augmentation dans la phosphorylation de la tyrosine dans des cellules transfectées avec Src ou Ras est associée à une perte d'adhésion cellulaire (Owens *et al.*, 2000), tandis que des inhibiteurs de la tyrosine phosphatase peuvent augmenter l'adhésion intercellulaire. La régulation des cadhérines, directement ou indirectement, est un facteur important qui contribue à la régulation des jonctions adhérentes. Certaines GTPases (Rac, Rho et Cdc42) ont aussi été impliquées dans la régulation des jonctions intercellulaires impliquant les cadhérines (Kaibuchi *et al.*, 1999). Le rôle précis de ces protéines reste toutefois à démontrer clairement, mais il semble impliqué dans l'assemblage et le démontage de la jonction d'adhérence (Gumbiner, 2000).

Il a été récemment démontré que la β -caténine peut réguler directement l'expression des gènes. Cette régulation implique la voie de signalisation Wnt qui a été identifiée chez plusieurs espèces. Le joueur principal de la cascade Wnt est la β -caténine. Les protéines Wnt sont une vaste famille de protéines riches en cystéines qui jouent un rôle important dans les processus de développement cellulaire. La cascade de signalisation Wnt implique plusieurs protéines qui sont induites par l'interaction entre la protéine extracellulaire Wnt et son récepteur membranaire *frizzle* (frz ;

Figure 7.5

Représentation schématique du complexe cadhérine-caténine dans une cellule épithéliale



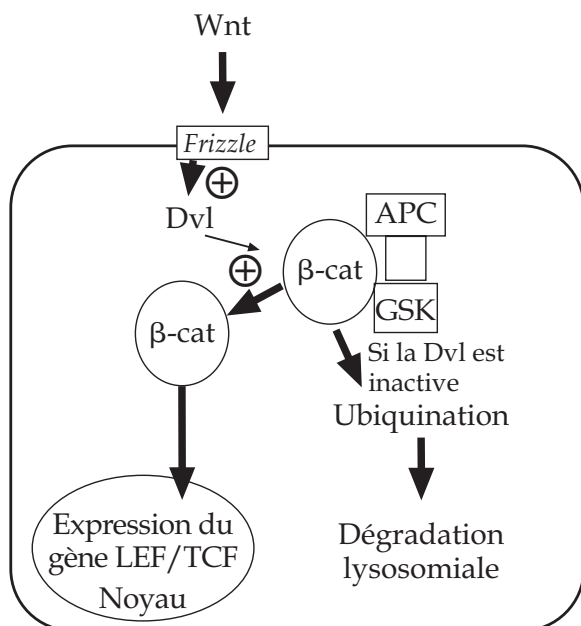
La liaison entre des cadhérines de différentes cellules s'établit au niveau de l'ectodomaine EC-1. Les sites de liaison calcique (cercles gris) sont présents dans chaque ectodomaine. La région cytoplasmique de la cadhérine interagit avec les caténines (α , β et p120^{ctn}). L' α -caténine se lie à l' α -actinine et à la vinculine qui, elles, interagissent avec le cytosquelette de la cellule, ainsi qu'avec la β -caténine qui est impliquée dans les voies de signalisation des cadhérines.

figure 7.6). Le complexe Wnt-frz active la protéine cytosolique Dvl, l'homologue chez les mammifères de la protéine *dishevel* (Dsh) de la drosophile. Dvl inhibe ensuite la glycogène kinase-3 β -synthétase (GSK-3 β). La GSK-3 β est elle-même liée à la β -caténine et à la protéine APC (*adenomatous polyposis coli tumor suppressor*). Quand la GSK-3 β est active, la β -caténine est phosphorylée et dégradée par la voie d'ubiquitine. Toutefois, quand la GSK-3 β est inhibée par la Dvl, la β -caténine demeure non phosphorylée et peut pénétrer le noyau cellulaire où elle induit l'expression du facteur de transcription TCF/LEF (Thorpe *et al.*, 2000). Le complexe β -caténine-LEF peut réguler l'expression de c-Myc, c-jun, Fra-1, et de la cycline D-1 (Ben-Ze'ev, 1999; Tetsu et McCormick, 1999; Kikuchi, 2000). Le rôle du complexe cadhérine-caténine dans la cascade de signalisation Wnt n'est pas encore bien défini.

4.3. RÉGULATION DE LA JONCTION ADHÉRENTE

La régulation de la jonction adhérente, et en particulier les cadhérines, est particulièrement importante pour le développement et la maturation cellulaire. L'expression de cadhérine spécifique n'est pas exclusive à un tissu ; toutefois, c'est l'expression spatiotemporelle des cadhérines qui est importante afin de définir la morphogenèse d'un tissu particulier (Edelman, 1993). Durant la différenciation tissulaire, les cellules vont passer de l'expression d'une cadhérine à une autre afin de former de nouveaux contacts cellulaires. Ceci permet la différenciation cellulaire à l'intérieur d'un épithélium défini. Cette caractéristique des molécules d'adhésion cellulaire nous permet de conclure que leur expression est régulée par des facteurs autocrines ou paracrines qui permettent la coordination cellulaire de l'expression de différentes cadhérines durant le processus de maturation et de différenciation.

Le système reproducteur mâle représente un modèle expérimental de choix afin de comprendre la régulation des molécules d'adhésion. Durant la spermatogenèse dans le testicule, les cellules germinales sont soumises à plusieurs changements de forme et d'association au cours de leur migration vers la lumière des canaux séminifères. De plus, l'épididyme, où les spermatozoïdes effectuent leur maturation, est fortement influencé par les androgènes. Il est donc possible d'étudier la régulation hormonale des molécules d'adhésion cellulaire. Il est également important de noter que la formation d'une barrière cellulaire dans le testicule et l'épididyme est essentielle à la spermatogenèse et à la maturation des spermatozoïdes, ce qui témoigne de l'importance des jonctions adhérentes dans la formation de cellules germinales matures et fonctionnelles.

Figure 7.6**Représentation schématique de la voie de signalisation Wnt**

Une des protéines Wnt se lie à son récepteur *frizzle* qui active la Dvl. Si la Dvl est activée, la β -caténine (β -cat) est stabilisée et elle peut agir comme facteur de transcription et activer des gènes tels que LEF/TCF. Si la protéine *frizzle* et la Dvl ne sont pas activées, la β -cat est dégradée par la voie des ubiquinones.

Dans l'épididyme, au moins trois différentes cadhérines sont exprimées : la cadhérine épithéliale (E-Cad), la cadhérine placentaire (P-Cad) et la cadhérine rénale (K-Cad) (Cyr et Robaire, 1991 ; Cyr *et al.*, 1992 ; Amini et Cyr, travaux non publiés). Les niveaux d'ARNm de la P-Cad dans l'épididyme sont fortement exprimés au cours de la première semaine après la naissance, tandis que les niveaux d'E-Cad sont faibles après la naissance, mais augmentent jusqu'à la puberté (Cyr *et al.*, 1993, 1995 ; Levy et Robaire, 1999).

Les résultats de notre laboratoire ont permis d'établir que l'expression de l'E-Cad dans l'épididyme est régulée par les androgènes (Cyr *et al.*, 1992). Toutefois, il est clair que d'autres facteurs endocriniens contribuent à la régulation de l'E-Cad. En effet, les études de développement indiquent une importante augmentation dans les niveaux d'ARNm de l'E-Cad au moment de la formation de la barrière hémato-épididymaire,

quand les niveaux d'androgènes circulants ne sont pas détectables (Cyr *et al.*, 1993). De plus, nous avons récemment démontré que les hormones thyroïdiennes peuvent aussi réguler les niveaux d'ARNm de l'E-Cad chez les jeunes rongeurs (St-Pierre *et al.*, 2003). Chez les rongeurs vieillissants, les niveaux de l'E-Cad baissent dans le corps de l'épididyme, ce qui s'accompagne d'une perte de la compétence de la barrière hémato-épididymaire (Levy et Robaire, 1999).

Il est maintenant bien établi qu'il existe une relation directe entre la formation et le maintien des jonctions serrées et des jonctions d'adhérence (Denker et Nigam, 1998). Le rôle précis, toutefois, reste encore à établir plus clairement. À l'aide de modèles cellulaires, on a démontré que l'interaction cadhérine-cadhérine précède la formation des jonctions serrées. De plus, il semble que l'activation de messagers intracellulaires qui résulte de la liaison entre cadhérines soit responsable de la phosphorylation et de la mobilisation des protéines cytoplasmiques impliquées dans la formation de la jonction serrée. Ces protéines, telles que les ZO, forment un complexe avec les protéines transmembranaires de la jonction serrée, soit l'occludine et les claudines (Tsukita, 2001 ; Gregory *et al.*, 2001).

Dans l'épididyme, nous avons démontré une relation entre les niveaux d'ARNm de l'E-Cad et la formation de la barrière hémato-épididymaire (Cyr *et al.*, 1993). De plus, nos études indiquent que la protéine de signalisation ZO-1 que l'on retrouve habituellement dans la jonction serrée est aussi associée à la β -caténine durant la formation de la barrière hémato-épididymaire, ce qui démontre une interaction directe entre ces deux protéines de signalisation durant la formation de la jonction serrée (DeBellefeuille et Cyr, 2001 ; Cyr, 2001).

La jonction d'adhérence représente donc une structure importante qui module les interactions entre les cellules avoisinantes. De plus, elle est aussi essentielle à la formation de jonctions serrées ainsi qu'au maintien de l'intégrité de l'épithélium. Il est donc facile de comprendre qu'une atteinte aux cadhérines et aux jonctions adhérentes peut avoir des conséquences importantes sur les divers épithéliums. Très peu d'études portant sur les effets des contaminants environnementaux ont été réalisées sur les cadhérines ou sur les composants des jonctions serrées. Ce manque d'information, toutefois, ne doit pas être interprété comme un manque d'effets ; c'est plutôt que peu d'études se sont penchées sur les effets de toxicité associés à ces protéines.

4.4. EFFETS DU CADMIUM

Le Cd exerce plusieurs effets toxiques sur différents tissus. Néanmoins, il demeure difficile de cerner un mécanisme précis de toxicité. Ceci indique que le Cd doit agir sur différentes voies métaboliques et biochimiques au sein de la cellule. Plusieurs effets de toxicité reliés au Cd semblent impliquer une augmentation de la perméabilité des tissus épithéliaux et endothéliaux. Dans les testicules, par exemple, le Cd provoque une augmentation de la perméabilité des capillaires, causant ainsi des hémorragies. *In vitro*, le Cd peut stimuler la séparation des cellules. De plus, dans les cellules rénales du chien (MDCK), le Cd cause une baisse des jonctions serrées entre les cellules. Dans ces cas, les effets du Cd semblent reliés à des effets au niveau de l'adhésion cellulaire et des cadhérines en particulier. Des études *in vitro* sur des cellules rénales d'origine porcine démontrent que le Cd cause une baisse importante dans les niveaux de l'E-cadhérine (Duizer *et al.*, 1999 ; Prozaliak et Niewhuis, 1991 ; Prozaliak, 2000). Il a été démontré que cet effet intervient au niveau de la liaison du calcium sur les ectodomains de l'E-cadhérine, où le Cd peut se lier sur les sites de liaisons du calcium (Prozaliak et Lamar, 1996). Ce mécanisme d'action pourrait expliquer plusieurs effets de toxicité du Cd et en particulier son impact dans l'induction du cancer. L'E-Cad est considérée comme une protéine antimétastatique, c'est-à-dire que les cellules cancéreuses arrêtent de produire de l'E-Cad afin de migrer d'une tumeur vers des sites secondaires. Une inhibition des interactions cadhérine-cadhérine pourrait avoir des conséquences importantes au niveau des métastases cancéreuses et de leur invasion de sites secondaires.

Même si le Cd agit au niveau des cadhérines, il ne faut pas exclure la possibilité que le cadmium pourrait aussi agir à d'autres niveaux afin de déréguler les interactions cellule-cellule. Dans les cellules de Sertoli, le Cd induit une baisse des niveaux d'occludine et des jonctions serrées sans avoir d'effets au niveau de l'E-Cad. Ceci n'exclut pas la possibilité que, dans ces cellules, le Cd agisse sur d'autres cadhérines ou sur d'autres protéines impliquées dans les interactions cellule-cellule.

5. CONCLUSIONS

Les interactions cellulaires demeurent la base de la formation et du fonctionnement épithéliaux. Une dérégulation de ces interactions peuvent avoir des conséquences importantes sur la santé des individus. Même s'il existe très peu d'information sur les effets des contaminants environnementaux et des interactions cellule-cellule, nous constatons de plus en plus que ses structures essentielles représentent une cible des xénobiotiques. En fait, nous ne faisons que commencer à comprendre les conséquences associées à une perte de ces interactions.

RÉFÉRENCES

- ADAMS, D.H., E. MAINOLFI, P. BURRA, J.M. NEUBERGER, R. AYRES, E. ELIAS et R. ROTHLEIN (1992). « Detection of circulating intercellular adhesion molecule-1 in chronic liver diseases », *Hepatology*, vol. 16, p. 810-814.
- AL UBAIDI, M.R., T.W. WHITE, H. RIPPS, I. PORAS, P. AVNER, D. GOMES et R. BRUZZONE (2000). « Functional properties, developmental regulation, and chromosomal localization of murine connexin36, a gap-junctional protein expressed preferentially in retina and brain », *Journal of Neuroscience Research*, vol. 59, p. 813-826.
- ARAKI, M., K. ARAKI, L. BIANCONE, I. STAMENKOVIC, S. IZUI, K. YAMAMURA et P. VASSALLI (1997). « The role of E-selectin for neutrophil activation and tumor metastasis in vivo », *Leukemia*, vol. 11, p. 209-212.
- AYLSWORTH, C.F., J.E. TROSKO, C.C. CHANG, K. BENJAMIN et E. LOCKWOOD (1989). « Synergistic inhibition of metabolic co-operation by oleic acid or 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate and dichlorodiphenyltrichlorethane (DDT) in Chinese hamster V79 cells: Implication of a role for protein kinase C in the regulation of gap junctional intercellular communication », *Cell Biology and Toxicology*, vol. 5, p. 27-37.
- BAGER, Y., K. KENNE, V. KRUTOVSKIKH, M. MESNIL, O. TRAUB et L. WÄRNGÅRD (1994). « Alteration in expression of gap junction proteins in rat liver after treatment with the tumour promoter 3,4,5,3',4'-pentachlorophenyl », *Carcinogenesis*, vol. 15, p. 2439-2443.
- BANKS, R.E., A.J. GEARING, I.K. HEMINGWAY, D.R. NORFOLK, T.J. PERREN et P.J. SELBY (1993). « Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies », *British Journal of Cancer*, vol. 68, p. 122-124.
- BECKER, D.L., J.E. COOK, C.S. DAVIES, W.H. EVANS et R.G. GOURDIE (1998). « Expression of major gap junction connexin types in the working myocardium of eight chordates », *Cell Biology International*, vol. 22, p. 527-543.
- BELLUARDO, N., A. TROVATO SALINARO, G. MUDO, Y.L. HURD et D.F. CONDORELLI (1999). « Structure, chromosomal localization, and brain expression of human Cx36 gene », *Journal of Neuroscience Research*, vol. 57, p. 740-752.
- BENEKLI, M., I.H. GULLU, G. TEKUZMAN, M.C. SAVAS, M. HAYRAN, G. HASCELİK et D. FIRAT (1998). « Circulating intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin levels in gastric cancer », *British Journal of Cancer*, vol. 78, p. 267-271.
- BENNETT, M.V.L., X. ZHENG et M.L. SOGIN (1994). « The connexins and their family tree », dans *Molecular Evolution of Physiological Processes*, New York, The Rockefeller University Press, p. 223-233.
- BENTLEY, A.M., S.R. DURHAM et A.B. KAY (1994). « Comparison of the immunopathology of extrinsic, intrinsic and occupational asthma », *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, vol. 4, p. 222-232.
- BHALLA, D.K. et S.K. GUPTA (2000). « Lung injury, inflammation, and inflammatory stimuli in rats exposed to ozone », *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 59, p. 211-228.
- BRINK, P.R. (1996). « Gap junction channel gating and permselectivity: Their roles in co-ordinated tissue function », *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, vol. 23, p. 1041-1046.
- BUDUNOVA, I.V., S. CARBAJAL et T.J. SLAGA (1996). « Effect of diverse tumor promoters on the expression of gap-junctional proteins connexin (Cx)26, Cx31.1, and Cx43 in SENCAR mouse epidermis », *Molecular Carcinogenesis*, vol. 15, p. 202-214.
- BUTTERWECK, A., C. ELFGANG, K. WILLECKE et O. TRAUB (1994). « Differential expression of the gap junction proteins connexin45, -43, -40, -31, and -26 in mouse skin », *European Journal of Cell Biology*, vol. 65, p. 152-163.

- BUTTERWECK, A., U. GERGS, C. ELFGANG, K. WILLECKE et O. TRAUB (1994). « Immunochemical characterization of the gap junction protein connexin45 in mouse kidney and transfected human HeLa cells », *Journal of Membrane Biology*, vol. 141, p. 247-256.
- CALDERON-GARCIDUENAS, L., A. RODRIGUEZ-ALCARAZ, R. GARCIA, L. RAMIREZ et G. BARRAGAN (1995). « Nasal inflammatory responses in children exposed to a polluted urban atmosphere », *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 45, p. 427-437.
- CERVELLO, M., L. VIRRUSO, G. LIPANI, L. GIANNITRAPANI, M. SORESI, A. CARROCCIO, R. GAMBINO, R. SANFILIPPO, L. MARASA et G. MONTALTO (2000). « Serum concentration of E-selectin in patients with chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma », *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 126, p. 345-351.
- CHANG, M., R. WERNER et G. DAHL (1996). « A role for an inhibitory connexin in testis ? » *Developmental Biology*, vol. 175, p. 50-56.
- CINES, D.B., E.S. POLLAK, C.A. BUCK, J. LOSCALZO, G.A. ZIMMERMAN, R.P. MCEVER, J.S. POBER, T. M. WICK, B.A. KONKLE, B.S. SCHWARTZ, E.S. BARNATHAN, K.R. MCCRAE, B.A. HUG, A.M. SCHMIDT et D.M. STERN (1998). « Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders », *Blood*, 91, p. 3527-3561.
- COBB, N. et R.A. ETZEL (1991). « Unintentional carbon monoxide-related deaths in the United States, 1979 through 1988 », *JAMA*, vol. 266, p. 659-663.
- CROCKETT-TORABI, E. (1998). « Selectins and mechanisms of signal transduction », *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 63, p. 1-14.
- CYR, D.G. (2001). « Cell-cell interactions in the epididymis », dans B. Robaire, C. Morales et H. Chemes (dir.), *Andrology in the Twenty-first Century*, New York, Medimond Medical Publications, p. 215-226.
- CYR, D.G. et B. ROBAIRE (1991). « Developmental regulation of epithelial and placental-cadherin mRNA in the rat epididymis », *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 637, p. 399-408.
- CYR, D.G., O.W. BLASCHUK et B. ROBAIRE (1992). « Identification and developmental regulation of cadherin messenger ribonucleic acids in the rat testis », *Endocrinology*, vol. 131, p. 139-145.
- CYR, D.G., L. HERMO, N. EGENBERGER, C. MERTINEIT, J. TRASLER et D.W. LAIRD (1999). « Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis », *Endocrinology*, vol. 140, p. 3815-3834.
- CYR, D.G., L. HERMO et D.W. LAIRD (1996). « Immunocytochemical localization and regulation of connexin43 in the adult rat epididymis », *Endocrinology*, vol. 137, p. 1474-1784.
- CYR, D.G., L. HERMO et B. ROBAIRE (1993). « Developmental changes in epithelial cadherin messenger ribonucleic acid and immunocytochemical localization of epithelial cadherin during postnatal epididymal development in the rat », *Endocrinology*, vol. 132, p. 1115-1124.
- CYR, D.G., B. ROBAIRE et L. HERMO (1995). « Structure and turnover of junctional complexes between principal cells of the rat epididymis », *Microscopy Research Techniques*, vol. 30, p. 54-66.
- DAHL, E., D. MANTHEY, Y. CHEN, H.J. SCHWARZ, Y.S. CHANG, P.A. LALLEY, B.J. NICHOLSON et K. WILLECKE (1996). « Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, p. 17903-17910.
- DAVIS, L.M., M.E. RODEFELD, K. GREEN, E.C. BEYER et J.E. SAFFITZ (1995). « Gap junction protein phenotypes of the human heart and conduction system », *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, vol. 6, p. 813-822.
- DEBELLEFEUILLE, S., L. HERMO, M. GREGORY, J. DUFRENE et D.G. CYR (2002). « Catenins in the rat epididymis : Their expression and regulation in adulthood and during post-natal development », *Endocrinology*, p. 5040-5049.

- DEGRAAF, I.A.M., O. TAJIMA, J.P. GROTEN et A.P.M. WOLTERBEEK (2000). « Intercellular communication and cell proliferation in precision-cut rat liver slices : Effect of medium composition and DDT », *Cancer Letters*, vol. 154, p. 53-62.
- DERMIETZEL, R., M. KREMER, G. PAPUTSOGLU, A. STANG, I.M. SKERRETT, D. GOMES, M. SRINIVAS, U. JANSSEN-BIENHOLD, R. WEILER, B.J. NICHOLSON, R. BRUZZONE et D.C. SPRAY (2000). « Molecular and functional diversity of neural connexins in the retina », *Journal of Neurosciences*, vol. 20, p. 8331-8343.
- DOSQUET, C., M.C. COUDERT, E. LEPAGE, J. CABANE et F. RICHARD (1997). « Are angiogenic factors, cytokines, and soluble adhesion molecules prognostic factors in patients with renal cell carcinoma ? », *Clinical Cancer Research*, vol. 3, p. 2451-2458.
- DUDLEY, R.E., D.J. SVOBODA et C. KLAASSEN (1982). « Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 65, p. 302-313.
- DUFRESNE, J., K.W. FINNISON, M. GREGORY et D.G. CYR (2003). « Expression of multiple connexins in the rat epididymis indicates a complex regulation of gap junctional communication », *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 284, p. C33-43.
- DUIZER, E., A.J. GILDE, C.H. VERSANTVOORT et J.P. GROTEN (1999). « Effects of cadmium chloride on the paracellular barrier function of intestinal epithelial cell lines », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 155, p. 117-126.
- EDELMAN, G.M. (1993). « A golden age for adhesion », *Cell Adhesion Communication*, vol. 1, p. 1-7.
- ELVIRA, M., K.K. WANG et A. VILLALOBO (1994). « Phosphorylated and non-phosphorylated connexin-32 molecules in gap junction plaques are protected against calpain proteolysis after phosphorylation by protein kinase C », *Biochemical Society Transactions*, vol. 22, p. 793-796.
- ETZIONI, A., C.M. DOERSCHUK et J.M. HARLAN (1999). « Of man and mouse : Leukocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies », *Blood*, vol. 94, p. 3281-3288.
- FALK, M.M. (2000). « Connexin-specific distribution within gap junctions revealed in living cells », *Journal of Cell Science*, vol. 113, p. 4109-4120.
- FANG, M.-Z., W.-C. MAR et M.-H. CHO (2001). « Cadmium-induced alterations of connexin expression in the promotional stage of *in vitro* two-stage transformation », *Toxicology*, vol. 161, p. 117-127.
- FITZGERALD, D.J., M. MESNIL, M. OYAMADA, H. TSUDA, N. ITO et H. YAMASAKI (1989). « Changes in gap junction protein (connexin 32) gene expression during rat liver carcinogenesis », *Journal of Cell Biochemistry*, vol. 41, p. 97-102.
- FRIERG, L., T. KJELLSTROM et G.F. NORDBERG (1986). « Cadmium », dans *Handbook on the Toxicology of Metals*, Amsterdam, Elsevier, p. 130-184.
- FUJIMOTO, K., A. NAGAFUCHI, S. TSUKITA, A. KURAOKA, A. OHOKUMA et Y. SHIBATA (1997). « Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha catenin on cell membranes during gap junction formation », *Journal of Cell Science*, vol. 110, p. 311-322.
- GAU, R.J., H.L. YANG, S.N. CHOW, J.L. SUEN et F.J. LU (2000). « Humic acid suppresses the LPS-induced expression of cell-surface adhesion proteins through the inhibition of NF-kappaB activation », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 166, p. 59-67.
- GEARING, A.J., I. HEMINGWAY, R. PIGOTT, J. HUGHES, A.J. REES et S.J. CASHMAN (1992). « Soluble forms of vascular adhesion molecules, E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1 : Pathological significance », *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 667, p. 324-331.
- GEARING, A.J. et W. NEWMAN (1993). « Circulating adhesion molecules in disease », *Immunology Today*, vol. 14, p. 506-512.
- GERBERICK, G.F., L.W. CRUSE, C.M. MILLER, E.E. SIKORSKI et G.M. RIDDER (1997). « Selective modulation of T cell memory markers CD62L and CD44 on murine draining lymph node cells following allergen and irritant treatment », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 146, p. 1-10.
- GERBERICK, G.F., L.W. CRUSE et C.A. RYAN (1999). « Local lymph node assay : Differentiating allergic and irritant responses using flow cytometry », *Methods*, vol. 19, p. 48-55.

- GOLIGER, J.A. et D.L. PAUL (1994). « Expression of gap junction proteins Cx26, Cx31.1, Cx37, and Cx43 in developing and mature rat epidermis », *Developmental Dynamics*, vol. 200, p. 1-13.
- GONZALEZ, S., J. HARDS, S. VAN EEDEN et J.C. HOGG (1996). « The expression of adhesion molecules in cigarette smoke-induced airways obstruction », *European Respiratory Journal*, vol. 9, p. 1995-2001.
- GOODENOUGH, D.A., J.A. GOLIGER et D.L. PAUL (1996). « Connexins, connexons and intercellular communication », *Annual Review of Biochemistry*, vol. 65, p. 475-502.
- GREEN, L.M. M. LABLUE, J.P. LAZARUS et J.C. JENNINGS (1996). « Reduced cell-cell communication in experimentally induced autoimmune thyroid disease », *Endocrinology*, vol. 137, p. 2823-2832.
- GREGORY, M., J. DUFRESNE, L. HERMO et D.G. CYR (2001). « Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the epididymis and is regulated by androgens », *Endocrinology*, vol. 142, p. 854-863.
- GROENEWEGEN, W.A., T.A. VAN VEEN, H.M. VAN DER VELDEN et H.J. JONGSMA (1998). « Genomic organization of the rat connexin40 gene : Identical transcription start sites in heart and lung », *Cardiovascular Research*, vol. 38, p. 463-471.
- GUAN, X., W.J. BONNEY et R.J. RUCH (1995). « Changes in gap junction permeability, gap junction number, and connexin43 expression in lindane-treated rat liver epithelial cells », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 130, p. 79-86.
- GUAN, X. et R.J. RUCH (1996). « Gap junction endocytosis and lysosomal degradation of connexin43-P2 in WB-F344 rat liver epithelial cells treated with DDT and lindane », *Carcinogenesis*, vol. 17, p. 1791-1787.
- GUGER, K.A. et B.M. GUMBINER (1995). « β -catenin has Wnt-like activity and mimics the Nieuwkoop signaling center in *Xenopus* dorsal-ventral patterning », *Developmental Biology*, vol. 172, p. 115-125.
- GUMBINER, B.M. (1996). « Cell adhesion : The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis », *Cell*, vol. 84, p. 345-357.
- GUMBINER, B.M. (2000). « Regulation of cadherin adhesive activity », *Journal of Cell Biology*, vol. 148, p. 399-404.
- GUPPY, M.J., J.C. WILTON, R. SHARMA, R. COLEMAN et J.K. CHIPMAN (1994). « Modulation of phenobarbitone-induced loss of gap junctional intercellular communication in hepatocyte couplets », *Carcinogenesis*, vol. 15, p. 1917-1921.
- HAEFLIGER, J.A., R. BRUZZONE, N.A. JENKINS, D.J. GILBERT, N.G. COPELAND et D.L. PAUL (1992). « Four novel members of the connexin family of gap junction proteins. Molecular cloning, expression, and chromosome mapping », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, p. 2057-2064.
- HAEFLIGER, J.A., R. POLIKAR, G. SCHNYDER, M. BURDET, E. SUTTER, T. PEXIEDER, P. NICOD et P. MEDA (2000). « Connexin37 in normal and pathological development of mouse heart and great arteries », *Developmental Dynamics*, vol. 218, p. 2 331-344.
- HARTUNG, H.P., J.J. ARCHELOS, J. ZIELASEK, R. GOLD, M. KOLTZENBURG, K.H. REINERS et K.V. TOYKA (1995). « Circulating adhesion molecules and inflammatory mediators in demyelination : A review », *Neurology*, vol. 45, p. 22-32.
- HEBBAR, M., F. REVILLION, M.M. LOUCHEZ, M.O. VILAIN, C. FOURNIER, J. BONNETERRE et J.P. PEYRAT (1998). « The relationship between concentrations of circulating soluble E- selectin and clinical, pathological, and biological features in patients with breast cancer », *Clinical Cancer Research*, vol. 4, p. 373-380.
- HENNEMANN, H., E. DAHL, J.B. WHITE, H.J. SCHWARZ, P.A. LALLEY, S. CHANG, B.J. NICHOLSON et K. WILLECKE (1992a). « Two gap junction genes, connexin 31.1 and 30.3, are closely linked on mouse chromosome 4 and preferentially expressed in skin », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, p. 17225-17233.
- HENNEMANN, H., H.J. SCHWARZ et K. WILLECKE (1992b). « Characterization of gap junction genes expressed in F9 embryonic carcinoma cells : Molecular cloning of mouse connexin31 and -45 cDNAs », *European Journal of Cell Biology*, vol. 57, p. 51-58.

- HERNANDEZ, M. et M. MACIA (1996). « Free peripheral sulfhydryl groups, CD11/CD18 integrins, and calcium are required in the cadmium and nickel enhancement of human-polymorphonuclear leukocyte adherence », *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 30, p. 437-443.
- HOFFER, E., Y. BAUM, A. TABAK et C. FREVERT (1999). « Adhesion molecules of blood polymorphonuclear leukocytes and alveolar macrophages in rats : Modulation by exposure to ozone », *Human and Experimental Toxicology*, vol. 18, p. 547-551.
- HOFFMANN, E. O., J.A. COOK, N.R. DI LUZIO et J.A. COOVER (1975). « The effects of acute cadmium administration in the liver and kidney of the rat, Light and electron microscopic studies », *Laboratory Investigation*, vol. 32, p. 655-664.
- HOLDER, J.W., E. ELMORE, et J.C. BARRETT (1993). « Gap junction function and cancer », *Cancer Research*, vol. 53, p. 3475-3485.
- HOLGATE, S.T., M.K. CHURCH, P.H. HOWARTH, E.N. MORTON, A.J. FREW et R. DJUKANOVIC (1995). « Genetic and environmental influences on airway inflammation in asthma », *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 107, p. 29-33.
- HOLLANDER, D. (1988) « Crohn's disease-a permeability disorder of the tight junction ? », *Gut*, vol. 29, p. 1621-1624.
- HOLTON, J.L., T.P. KENNY, P.K. LEGAN, J.E. COLLINS, J.N. KEEN, R. SHARMA et D.R. GARROD (1990). « Desmosomal glycoproteins 2 and 3 (desmocollins) show N-terminal similarity to calcium-dependent cell-cell adhesion molecules », *Journal of Cell Science*, vol. 97, p. 239-246.
- HOPPERSTAD, M.G., M. SRINIVAS et D.C. SPRAY (2000). « Properties of gap junction channels formed by Cx46 alone and in combination with Cx50 », *Biophysics Journal*, vol. 79, p. 1954-1966.
- HORIGUCHI, H., A. HARADA, E. OGUMA, M. SATO, Y. HOMMA, F. KAYAMA, M. FUKUSHIMA et K. MATSUSHIMA (2000). « Cadmium-induced acute hepatic injury is exacerbated in human interleukin-8 transgenic mice », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 163, p. 231-239.
- ITO, S., M. TSUDA, A. YOSHITAKE, T. YANAI et T. MASEGI (1998). « Effect of phenobarbital on hepatic gap junctional intercellular communication in rats », *Toxicology and Pathology*, vol. 26, p. 253-259.
- JANSSEN, BIENHOLD U., R. DERMIETZEL et R. WEILER (1998). « Distribution of connexin43 immunoreactivity in the retinas of different vertebrates », *Journal of Comparative Neurology*, vol. 396, p. 310-321.
- JEONG, S.H., S.S. HABEEBU et CD KLAASSEN (2000). « Cadmium decreases gap junctional intercellular communication in mouse liver », *Toxicological Sciences*, vol. 57, p. 156-166.
- JONGEN, W.M.F., D. J. FITZGERALD, M. ASAMOTO, C. PICCOLI, T.J. SLAGA D. GROS, M. TAKEICHI et H. YAMASAKI (1991). « Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca²⁺ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin », *Journal of Cell Biology*, vol. 114, p. 545-555.
- KAIBUCHI, K., S. KURODA, M. FUKATA et A. NAKAGAWA (1999). « Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases », *Current Opinions in Cell Biology*, vol. 11, p. 591-596.
- KALRA, V.K., Y. YING, K. DEEMER, R. NATARAJAN, J.L. NADLER et T.D. COATES (1994). « Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells », *Journal of Cellular Physiology*, vol. 160, p. 154-162.
- KANG, K.S., M.R. WILSON, T. HAYASHI, C.C. CHANG et J.E. TROSKO (1996). « Inhibition of gap junctional intercellular communication in normal human breast epithelial cells after treatment with pesticides, PCBs, and PBBs, alone or in mixtures », *Environmental Health Perspectives*, vol. 104, p. 192-200.
- KAYAMA, F., T. YOSHIDA, M. R. ELWELL et M.I. LUSTER (1995). « Role of tumor necrosis factor-alpha in cadmium-induced hepatotoxicity », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 131, p. 224-234.

- KIKUCHI, A. (2000). « Regulation of β -catenin signaling in the Wnt pathway », *Biochemical Biophysical Research Communications*, vol. 268, p. 243-248.
- KILARSKI, W.M., B. WITCZUK, G. KUPRYSZEWSKI, D. SEMIK et A. GORLICH (1998). « Antiserum against connexin32 fragment reacts with a 32-kD protein localised in gap junctions of mouse and rat liver, endometrium and in the fish heart », *Folia Histochemistry Cytobiology*, vol. 36, p. 111-118.
- KIM, Y.J., L. BORSIG, N.M. VARKI et A. VARKI (1998). « P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, p. 9325-9330.
- KLAUNIG, J.E. et R.J. RUCH (1990). « Comparative effects of phenobarbital, DDT, and lindane on mouse hepatocyte gap junctional intercellular communication », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 102, p. 553-563.
- KOLAJA, K.L., D.T. ENGELKEN et C.D. KLAASSEN (2000a). « Inhibition of gap-junction-intercellular communication in intact rat liver by nongenotoxic hepatocarcinogens », *Toxicology*, vol. 146, p. 15-22.
- KOLAJA, K.L., J.S. PETRICK et C.D. KLAASSEN (2000b). « Inhibition of gap-junctional-intercellular communication in thyroid-follicular cells by propylthiouracil and low iodine diet », *Toxicology*, vol. 143, p. 195-202.
- KRISHNA, M.T., A. BLOMBERG, G.L. BISCIONE, F. KELLY, T. SANDSTROM, A. FREW et S. HOLGATE (1997). « Short-term ozone exposure upregulates P-selectin in normal human airways », *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 155, p. 1798-1803.
- KRISHNAN, K., J. BRODEUR et M. CHARBONNEAU (1991). « Development of an experimental model for the study of hexachlorobenzene-induced hepatic porphyria in the rat », *Fundamental and Applied Toxicology*, vol. 17, p. 433-441.
- KRUTOVSKIKH, V.A., M. MESNIL, G. MAZZOLENI et H. YAMASAKI (1995). « Inhibition of rat liver gap junction communication by tumor-promoting agents *in vivo*. Association with aberrant localization of connexin proteins », *Laboratory Investigation*, vol. 72, p. 571-577.
- KRUTOVSKIKH, V.A. et H. YAMASAKI (1997). « The role of gap junctional intercellular communication (GJIC) disorders in experimental and human carcinogenesis », *Histology and Histopathology*, vol. 12, p. 761-768.
- KURAOKA, A., H. IIDA, T. HATAE, Y. SHIBATA, M. ITOH et T. KURITA (1993). « Localization of gap junction proteins, connexins 32 and 26, in rat and guinea pig liver as revealed by quick-freeze, deep-etch immunoelectron microscopy », *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 41, p. 971-980.
- LAAN, M.P., H. KONING, M.R. BAERT, A.P. ORANJE, W.A. BUURMAN, H.F. SVELKOUK et H.J. NEIJENS (1998). « Levels of soluble intercellular adhesion molecule-1, soluble E-selectin, tumor necrosis factor- α , and soluble tumor necrosis factor receptor p55 and p75 in atopic children », *Allergy*, vol. 53, p. 51-58.
- LAING, J.G. et E.C. BEYER (1995). « The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, p. 26399-26403.
- LAING, J.G., P.N. TADROS, E.M. WESTPHALE et E.C. BEYER (1997). « Degradation of connexin43 gap junctions involves both the proteasome and the lysosome », *Experimental Cell Research*, vol. 236, p. 482-492.
- LAIRD, D.W. (1996). « The life cycle of a connexin gap junction formation, removal and degradation », *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 28, p. 311-318.
- LARSEN, W.J., H.N. TUNG, S.A. MURRAY et C.A. SWENSON (1979). « Evidence for the participation of actin microfilaments and bristle coats in the internalization of gap junction membrane », *Journal of Cell Biology*, vol. 83, p. 576-587.
- LAUTERMANN, J., H.G. FRANK, K. JAHNKE, O. TRAUB et E. WINTERHAGER (1999). « Developmental expression patterns of connexin26 and -30 in the rat cochlea », *Developmental Genetics*, vol. 25, p. 306-311.

- LAUTERMANN, J., W.J. TEN CATE, P. ALTENHOFF, R. GRÜMMER, O. TRAUB, H. FRANK, K. JAHNKE et E. WINTERHAGER (1998). « Expression of the gap-junction connexins 26 and 30 in the rat cochlea », *Cell and Tissue Research*, vol. 294, p. 415-420.
- LEE, M.J. et S.K. RHEE (1998). « Heteromeric gap junction channels in rat hepatocytes in which the expression of connexin26 is induced », *Molecular Cells*, vol. 8, p. 295-300.
- LEE, S.W., C. TOMASETTO, D. PAUL, K. KEYOMARSI et R. SAGER (1992). « Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines », *Journal of Cell Biology*, vol. 118, p. 1213-1221.
- LEIBOLD, E. et L.R. SCHWARTZ (1993). « Inhibition of intercellular communication in rat hepatocytes by phenobarbital, 1,1,1-trichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl)ethane (DDT) and γ -hexachlorocyclohexane (lindane) : Modification by antioxidants and inhibitors of cyclo-oxygenase », *Carcinogenesis*, vol. 14, p. 2377-2382.
- LEVIN, M. et M. MERCOLA (2000). « Expression of connexin 30 in *Xenopus* embryos and its involvement in hatching gland function », *Developmental Dynamics*, vol. 219, p. 96-101.
- LEVY, S. et B. ROBAIRE (1999). « Segment-specific changes with age in the expression of junctional proteins and the permeability of the blood-epididymis barrier in rats », *Biology of Reproduction*, vol. 60, p. 1392-1401.
- LIM, A.G., R.P. JAZRAWI, J.H. LEVY, M.L. PETRONI, A.C. DOUDS, J.D. MAXWELL et T.C. NORTHFIELD (1995). « Soluble E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in primary biliary cirrhosis », *Journal of Hepatology*, vol. 22, p. 416-422.
- LIN, J.S., S. FITZGERALD, Y. DONG, C. KNIGHT, P. DONALDSON et J. KISTLER (1997). « Processing of the gap junction protein connexin50 in the ocular lens is accomplished by calpain », *European Journal of Cell Biology*, vol. 73, p. 141-149.
- LINNAINMAA, K., K. PELIN, E. VANHALA, T. TUOMI, C. PICCOLI, D.J. FITZGERALD et H. YAMASAKI (1993). « Gap junction intercellular communication of primary asbestos-associated malignant human mesothelial cells », *Carcinogenesis*, vol. 14, p. 1597-1602.
- LITTLE, T.L., E.C. BEYER et B.R. DULING (1995). « Connexin 43 and connexin 40 gap junctional proteins are present in arteriolar smooth muscle and endothelium *in vivo* », *American Journal of Physiology*, vol. 268, p. 729-739.
- MACKAY, C.R., W. MARSTON et L. DUDLER (1992). « Altered patterns of T cell migration through lymph nodes and skin following antigen challenge », *European Journal of Immunology*, vol. 22, p. 2205-2210.
- MANTHEY, D., F. BUKAUSKAS, C.G. LEE, C.A. KOZAK et K. WILLECKE (1999). « Molecular cloning and functional expression of the mouse gap junction gene connexin-57 in human HeLa cells », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, p. 14716-14723.
- MCHEYZER-WILLIAMS, M.G. et M.M. DAVIS (1995). « Antigen-specific development of primary and memory T cells *in vivo* », *Science*, vol. 268, p. 106-111.
- MEIJER, H.A., W.J. DICTUS et A.A. THOMAS (2000). « Cloning and analysis of the untranslated regions of the *Xenopus laevis* connexin30 mRNA », *Gene*, vol. 258, p. 71-76.
- MONAGHAN, P., C. CLARKE, N.P. PERUSINGHE, D.W. MOSS, X.Y. CHEN et W.H. EVANS (1996). « Gap junction distribution and connexin expression in human breast », *Experimental Cell Research*, vol. 223, p. 29-38.
- MOYNAGH, P.N., D.C. WILLIAMS et L.A. O'NEILL (1994). « Activation of NF-kappa B and induction of vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular adhesion molecule-1 expression in human glial cells by IL-1. Modulation by antioxidants », *Journal of Immunology*, vol. 153, p. 2681-2690.
- MUNARI-SILEM, Y. (1996). « Gap junctions in the thyroid gland : Distribution, regulation, function », *Annales d'endocrinologie*, vol. 57, p. 484-486.
- NAGY, J.I., D. PATEL, P.A. OCHALSKI et G.L. STELMACK (1999). « Connexin30 in rodent, cat and human brain : Selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance », *Neuroscience*, vol. 88, p. 447-468.

- NEUBERT, R., A.C. NOGUEIRA et D. NEUBERT (1992). « Thalidomide and the immune system. 2. Changes in receptors on blood cells of a healthy volunteer », *Life Sciences*, vol. 51, p. 2107-2116.
- NEUBERT, R., A.C. NOGUEIRA et D. NEUBERT (1993). « Thalidomide derivatives and the immune system. I. Changes in the pattern of integrin receptors and other surface markers on T lymphocyte subpopulations of marmoset blood », *Archives of Toxicology*, vol. 67, p. 1-17.
- NEVEU, M.J., K.L. BABCOCK, E.L. HERTZBERG, D.L. PAUL, B.J. NICHOLSON et H.C. PITOT (1994). « Colocalized alterations in connexin32 and cytochrome P450IIB1/2 by phenobarbital and related liver tumour promoters », *Cancer Research*, vol. 54, p. 3145-3152.
- NEWMAN, W., L.D. BEALL, C.W. CARSON, G.G. HUNDER, N. GRABEN, Z.I. RANDHAWA, T.V. GOPAL, J. WIENER-KRONISH et M.A. MATTHAY (1993). « Soluble E-selectin is found in supernatants of activated endothelial cells and is elevated in the serum of patients with septic shock », *Journal of Immunology*, vol. 150, p. 644-654.
- NIGAM, S.K., N. DENISENKO, E. RODRIGUEZ-BOULAN et S. CITI (1991). « The role of phosphorylation in development of tight junctions in cultured renal epithelial (MDCK) cells », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 181, p. 548.
- NOGUEIRA, A.C., R. NEUBERT, H. HELGE et D. NEUBERT (1994). « Thalidomide and the immune system. 3. Simultaneous up- and down-regulation of different integrin receptors on human white blood cells », *Life Sciences*, vol. 55, p. 77-92.
- NOMATA, K., K.S. KANG, T. HAYASHI, D. MATESIC, L. LOCKWOOD, C.C. CHANG et J.E. TROSKO (1996). « Inhibition of gap junctional intercellular communication in hepatachlor- and heptachlor epoxide-treated normal human breast epithelial cells », *Cell Biology and Toxicology*, vol. 12, p. 69-78.
- O'BRIEN, J., M.R. AL UBAIDI et H. RIPPS (1996). « Connexin 35: A gap-junctional protein expressed preferentially in the skate retina », *Molecular Biology of the Cell*, vol. 7, p. 233-243.
- O'BRIEN, J., R. BRUZZONE, T.W. WHITE, M.R. AL UBAIDI et H. RIPPS (1998). « Cloning and expression of two related connexins from the perch retina define a distinct subgroup of the connexin family », *Journal of Neuroscience*, vol. 18, p. 7625-7637.
- OWENS, D.W., G.W. MCLEAN, A.W. WYKE, C. PARASKEVA, E.K. PARKINSON, M.C. FRAME et V.G. BRUNTON (2000). « The catalytic activity of the Src family kinases is required to disrupt cadherin-dependent cell-cell contacts », *Molecular Biology of the Cell*, vol. 11, p. 51-64.
- PEIFER, M., L.M. PAI et M. CASEY (1994). « Phosphorylation of the *Drosophila* adherens junction protein Armadillo: Roles for wingless signal and zeste-white 3 kinase », *Developmental Biology*, vol. 166, p. 543.
- PICKER, L.J. (1994). « Control of lymphocyte homing », *Current Opinion in Immunology*, vol. 6, p. 394-406.
- PIECHOCKI, M.P., R.M. TOTI, M.J. FERNSTROM, R.D. BURKE et R.J. RUCH (2000). « Liver cell-specific transcriptional regulation of connexin32 », *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1491, p. 107-122.
- PLANTE, I., M. CHARBONNEAU et D.G. CYR (2002). « Gender-specific hepatic tumour promotion by hexachlorobenzene may be mediated by alteration in gap junctions », *Carcinogenesis*, vol. 23, p. 1243-1249.
- POZZI, A., B. RISEK, D.T. KIANG, N.B. GILULA et N.M. KUMAR (1995). « Analysis of multiple gap junction gene products in the rodent and human mammary gland », *Experimental Cell Research*, vol. 220, p. 212-219.
- PROZIALECK, W.C. (2000). « Evidence that E-cadherin may be a target for cadmium toxicity in epithelial cells », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 164, p. 231-249.
- PROZIALECK, W.C. et P.C. LAMAR (1999). « Interaction of cadmium (Cd(2+)) with a 13-residue polypeptide analog of a putative calcium-binding motif of E-cadherin », *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 451, p. 93-100.

- PROZIALECK, W.C. et R.J. NIEWENHUIS (1991). « Cadmium (Cd²⁺) disrupts Ca(2⁺)-dependent cell-cell junctions and alters the pattern of E-cadherin immunofluorescence in LLC-PK1 cells », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 181, p. 1118-1124.
- REED, K.E., E.M. WESTPHALE, D.M. LARSON, H.Z. WANG, R.D. VEENSTRA et E.C. BEYER (1993). « Molecular cloning and functional expression of human connexin37, an endothelial cell gap junction protein », *Journal of Clinical Investigation*, vol. 91, p. 997-1004.
- REN, P. et R.J. RUCH (1996). « Inhibition of gap junctional intercellular communication by barbiturates in long-term primary cultured rat hepatocytes is correlated with liver tumour promoting activity », *Carcinogenesis*, vol. 17, p. 2119-2124.
- REN, P., P.P. MEHTA et R.J. RUCH (1998). « Inhibition of gap junctional intercellular communication by tumor promoters in connexin43 and connexin32-expressing liver cells: Cell specificity and role of protein kinase C », *Carcinogenesis*, vol. 19, p. 169-175.
- ROITT, I. M.J. BROSTOFF et D.K. MALE (1994). *Immunologie*, Bruxelles, De Boeck-Wesmael.
- RUCH, R.J., W.J. BONNEY, K. SIGLER, X. GUAN, D. MATESIC, L.D. SCHAFER, E. DUPONT et J.E. TROSKO (1994). « Loss of gap junctions from DDT-treated rat liver epithelial cells », *Carcinogenesis*, vol. 15, p. 301-306.
- RUCH, R.J., R. FRANSSON, S. FLODSTROM, L. WARNGARD et J.E. KLAUNIG (1990). « Inhibition of hepatocyte gap junctional intercellular communication endosulfan, chlordane and heptachlor », *Carcinogenesis*, vol. 11, p. 1097-10101.
- RUCH, R.J. et J.E. KLAUNIG (1986). « Antioxidant prevention of tumour promoter induced inhibition of mouse-hepatocyte intercellular communication », *Cancer Letters*, vol. 33, p. 137-150.
- RUCH, R.J. et J.E. KLAUNIG (1988). « Kinetics of phenobarbital inhibition of intercellular communication in hepatocytes », *Cancer Research*, vol. 48, p. 2519-2523.
- RUCH, R.J., J.E. KLAUNIG et M.A. PEREIRA (1987). « Inhibition of intercellular communication between mouse hepatocytes by tumor promoters », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 87, p. 111-120.
- RUMMEL, A.M., J.E. TROSKO, M.R. WILSON et B.L. UPHAM (1999). « Polycyclic aromatic hydrocarbons with bay-like regions inhibited gap junctional intercellular communication and stimulated MAPK activity », *Toxicological Sciences*, vol. 49, p. 232-240.
- RUP, D.M., R.D. VEENSTRA, H.Z. WANG, P.R. BRINK et E.C. BEYER (1993). « Chick connexin-56, a novel lens gap junction protein: Molecular cloning and functional expression », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, p. 706-712.
- SAI, K., B.L. UPHAM, K.S. KANG, R. HASEGAWA, T. INOUE et J.E. TROSKO (1998). « Inhibitory effect of pentachlorophenol on gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells *in vitro* », *Cancer Letters*, vol. 130, p. 9-17.
- SAI, K., J. KANNO, R. HASEGAWA, J.E. TROSKO et T. INOUE (2000). « Prevention of the down-regulation of gap junctional intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol », *Carcinogenesis*, vol. 21, p. 1671-1676.
- SAI-KATO, K., T. MEMURA, A. TAKAGI, R. HASEGAWA, A. TANIMURA et Y. KUROKAWA (1995a). « Pentachlorophenol-induced oxidative DNA damage in mouse liver and protective effect of antioxidants », *Food and Chemical Toxicology*, vol. 33, p. 877-882.
- SAI-KATO, K., A. TAKAGI, T. MEMURA, R. HASEGAWA et Y. KUROKAWA (1995b). « Role of oxidative stress in non-genotoxic carcinogenesis with special reference to liver tumors induced by peroxisome proliferators », *Biomedical and Environmental Sciences*, vol. 8, p. 269-279.
- SALVI, S., A. BLOMBERG, B. RUDELL, F. KELLY, T. SANDSTROM, S.T. HOLGATE et A. FREW (1999). « Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers », *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 159, p. 702-709.
- SCHIRRMACHER, K., W.M. BINGMANN et D. BÜSSELBERG (1998). « Effects of lead, mercury, and methyl mercury on gap junctions and [Ca²⁺]_i in bone cells », *Calcified Tissue International*, vol. 63, p. 134-139.

- SCHOLZ, W., K. SCHÜTZE, W. KUNZ et M. SCHWARZ (1990). « Phenobarbital enhances the formation of reactive oxygen in neoplastic rat liver nodules », *Cancer Research*, vol. 50, p. 7015-7022.
- SCHOOK, L.B. et D.L. LASKIN (1994). *Xenobiotics and Inflammation*, New York, Academic Press.
- SHEN, Y., V. RATTAN, C. SULTANA et V.K. KALRA (1996). « Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes », *American Journal of Physiology*, vol. 270, p. 1624-1633.
- SHODA, T., K. MITSUMORI, H. ONODERA, K. TOYODA, C. UNEYAMA, K. TAKADA et M. HIROSE (2000). « Liver tumor-promoting effect of β -naphthoflavone, a strong CYP 1A1/2 inducer, and the relationship between CYP 1A1/2 induction and Cx32 decrease in its hepatocarcinogenesis in rat », *Toxicology and Pathology*, vol. 28, p. 540-547.
- SORESÌ, M., M. CERVELLO, G. LIPANI, A. CARROCCIO, A. CARTABELLOTTA, L. MARASA, C. CASTO, L. VIRRUSO et G. MONTALTO (1997). « Circulating intercellular adhesion molecule-1 in patients with hepatocellular carcinoma », *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 9, p. 805-809.
- SPOELSTRA, F.M., C. BERENDS, B. DIJKHUIZEN, J.G. DE MONCHY et H.F. KAUFFMAN (1998a). « Effect of theophylline on CD11b and L-selectin expression and density of eosinophils and neutrophils *in vitro* », *European Respiratory Journal*, vol. 12, p. 585-591.
- SPOELSTRA, F.M., H. HOVENGA, J.A. NOORDHOEK, D.S. POSTMA et H.F. KAUFFMAN (1998b). « Changes in CD11b and L-selectin expression on eosinophils are mediated by human lung fibroblasts *in vitro* », *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 158, p. 769-777.
- STEERENBERG, P.A., J.G. VAN AMSTERDAM, R.J. VANDEBRIEL, J.G. VOS, L. VAN BREE et H. VAN LOVEREN (1999). « Environmental and lifestyle factors may act in concert to increase the prevalence of respiratory allergy including asthma », *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 29, p. 1303-1308.
- STEINBERG, M.S. et P.M. McNUTT (1999). « Cadherins and their connections: Adhesion junctions have broader functions », *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 11, p. 554-560.
- STEPHENS, T.D. (1997). « Thalidomide: Proposed mechanisms of action », *Teratology*, vol. 56, p. 377.
- STEPHENS, T.D., C.J. BUNDE et B.J. FILLMORE (2000). « Mechanism of action in thalidomide teratogenesis », *Biochemical Pharmacology*, vol. 59, p. 1489-1499.
- ST-PIERRE, N., J. DUFRESNE et D.G. CYR (2003). « Effects of neonatal hypothyroidism on connexin 43 in the rat testis and epididymis », *Biology Reproduction*, vol. 68, p. 1232-1240.
- TAKEICHI, M. (1991). « Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator », *Science*, vol. 251, p. 1451.
- TATENO, C., S. ITO, M. TANAKA, M. OYAMADA et A. YOSHITAKE (1994). « Effect of DDT on hepatic gap junctional intercellular communication in rats », *Carcinogenesis*, vol. 15, p. 517-521.
- TAYLOR, M.L., M.E. BRUMMET, S.A. HUDSON, K. MIURA et B.S. BOCHNER (2000). « Expression and function of P-selectin glycoprotein ligand 1 (CD162) on human basophils », *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 106, p. 918-924.
- TEDDER, T.F., D.A. STEEBER et P. PIZCUETA (1995). « L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites », *Journal of Experimental Medicine*, vol. 181, p. 2259-2264.
- TETSU, O. et F. MCCORMICK (1999). « Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells », *Nature*, vol. 398, p. 422-426.
- THEOCHARIS, S., A. MARGELI, C. FASITSAS, M. LOIZIDOU et G. DELICONSTANTINOS (1991). « Acute exposure to cadmium causes time-dependent liver injury in rats », *Comparative Biochemistry and Physiology. C: Comparative Pharmacology and Toxicology*, vol. 99, p. 127-130.

- THOM, S.R. (1993). « Leukocytes in carbon monoxide-mediated brain oxidative injury », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 123, p. 234-247.
- THOM, S.R., S.T. OHNISHI et H. ISCHIROPOULOS (1994). « Nitric oxide released by platelets inhibits neutrophil B2 integrin function following acute carbon monoxide poisoning », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 128, p. 105-110.
- THORPE, C.J., A. SCHLESINGER et B. BOWERMAN (2000). « Wnt signalling in *Caenorhabditis elegans*: Regulating repressors and polarizing the cytoskeleton », *Trends in Cell Biology*, vol. 10, p. 10-17.
- TROSKO, J.E. et R.J. RANDALL (1998). « Cell-cell communication in carcinogenesis », *Frontiers in Bioscience*, vol. 3, p. 208-236.
- TROSKO, J.E., C.C. CHANG, B. UPHAM et M. WILSON (1998). « Epigenetic toxicology as toxicant-induced changes in intercellular signalling leading to altered gap junctional intercellular communication », *Toxicology Letters*, vols 102-103, p. 71-78.
- TSUKITA, S., M. FURUSE et M. ITOH (2001). « Multifunctional strands in tight junctions », *Nature Reviews in Molecular and Cellular Biology*, vol. 2, p. 285-293.
- TSUSHIMOTO, G., C.C. CHANG, J.E. TROSKO et F. MATSUMURA (1983). « Cytotoxic, mutagenic, and cell-cell communication inhibitory properties of DDT, lindane, and chlordane on Chinese hamster cells *in vitro* », *Archives of Environmental Contaminants and Toxicology*, vol. 12, p. 721-729.
- TUCKER, M.A. et L. BARAJAS (1994). « Rat connexins 30.3 and 31 are expressed in the kidney », *Experimental Cell Research*, vol. 213, p. 224-230.
- UPHAM, B.L., L.M. WEIS et J.E. TROSKO (1998). « Modulated gap junctional intercellular communication as a biomarker of PAH epigenetic toxicity: Structure-function relationship », *Environmental Health Perspectives*, vol. 4, p. 975-981.
- UPHAM, B.L., L.M. WEIS, A.M. RUMMEL, S.J. MASTEN et J.E. TROSKO (1996). « The effects of anthracene and methylated anthracenes on gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells », *Fundamentals in Applied Toxicology*, vol. 34, p. 260-264.
- UPHAM, B.L., S.J. MASTEN, B.R. LOCKWOOD et J.E. TROSKO (1994). « Nongenotoxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygenation by-products on the intercellular communication of rat liver epithelial cells », *Fundamentals in Applied Toxicology*, vol. 23, p. 470-475.
- VELIKOVA, G., R.E. BANKS, A. GEARING, I. HEMINGWAY, M.A. FORBES, S.R. PRESTON, N.R. HALL, M. JONES, J. WYATT, K. MILLER, U. WARD, J. AL-MASKATTI, S. M. SINGH, P.J. FINAN, N.S. AMBROSE, J.N. PRIMROSE et P.J. SELBY (1998). « Serum concentrations of soluble adhesion molecules in patients with colorectal cancer », *British Journal of Cancer*, vol. 77, p. 1857-1863.
- VERMA, A., D.J. HIRSCH, C.E. GLATT, G.V. RONNETT et S.H. SNYDER (1993). « Carbon monoxide: A putative neural messenger », *Science*, vol. 259, p. 381-384.
- VOLPES, R., J.J. VAN DEN OORD et V.J. DESMET (1990). « Immunohistochemical study of adhesion molecules in liver inflammation », *Hepatology*, vol. 12, p. 59-65.
- VOLPES, R., J. J. VAN DEN OORD et V.J. DESMET (1992). « Vascular adhesion molecules in acute and chronic liver inflammation », *Hepatology*, vol. 15, p. 269-275.
- WAGNER, T.L., E.C. BEYER et D.G. MCMAHON (1998). « Cloning and functional expression of a novel gap junction channel from the retina of *Danio aequipinnatus* », *Visual Neuroscience*, vol. 15, p. 1137-1144.
- WANG, X.G. et C. PERACCHIA (1996). « Connexin 32/38 chimeras suggest a role for the second half of inner loop in gap junction gating by low pH », *American Journal of Physiology*, vol. 271, p. 1743-1749.
- WÄRNGÅRD, L., Y. BAGER, Y. KAO, K. KENNE et U.G. AHLBORG (1996). « Mechanistical studies of the inhibition of intercellular communication by organochlorine compounds », *Archives of Toxicological Supplements*, vol. 18, p. 149-159.

- WEIS, L.M., A.M. RUMMEL, S.J. MASTEN, J.E. TROSKO et B.L. UPHAM (1998). « Bay or bay-like regions of polycyclic aromatic hydrocarbons were potent inhibitors of gap junctional intercellular communication », *Environmental Health Perspectives*, vol. 106, p. 17-22.
- WHITE, T.W., M.R. DEANS, J. O'BRIEN, M.R. AL UBAIDI, D.A. GOODENOUGH, H. RIPPS et R. BRUZZONE (1999). « Functional characteristics of skate connexin35, a member of the gamma subfamily of connexins expressed in the vertebrate retina », *European Journal of Neuroscience*, vol. 11, p. 1883-1890.
- WHITE, T.W., R. BRUZZONE, D.A. GOODENOUGH et D.L. PAUL (1992). « Mouse Cx50, a functional member of the connexin family of gap junction proteins, is the lens fiber protein MP70 », *Molecular and Cellular Biology*, vol. 3, p. 711-720.
- WILLECKE, K., R. HEYNKES, E. DAHL, R. STUTENKEMPER, H. HENNEMANN, S. JUNGBLUTH, T. SUCHYNA et B.J. NICHOLSON (1991). « Mouse connexin37: Cloning and functional expression of a gap junction gene highly expressed in lung », *Journal of Cell Biology*, vol. 114, p. 51049-51057.
- WINDOFFER, R., B. BEILE, A. LEIBOLD, S. THOMAS, U. WILHEIM et R.E. LEUBE (2000). « Visualization of gap junction mobility in living cells », *Cell and Tissue Research*, vol. 299, p. 347-362.
- WOLKERSTORFER, A., M.P. LAAN, H.F. SVELKOUK, H.J. NEIJENS, P.G. MULDER, A.M. OUDESLUYS-MURPHY, R.N. SUKHAI et A.P. ORANJE (1998). « Soluble E-selectin, other markers of inflammation and disease severity in children with atopic dermatitis », *British Journal of Dermatology*, vol. 138, p. 431-435.
- YAMASAKI, H., V. KRUTOVSKIKH, M. MESNIL, A. COLUMBANO, H. TSUDA et N. ITO (1993). « Gap junctional intercellular communication and cell proliferation during rat liver carcinogenesis », *Environmental Health Perspectives*, vol. 101, p. 191-198.
- YAP, A.S., J.M. MULLIN et B.R. STEVENSON (1998). « Molecular analysis of tight junction physiology: Insights and paradoxes », *Journal of Membrane Biology*, vol. 163, p. 159-167.
- YEAGER, M. et B.J. NICHOLSON (1996). « Structure of gap junctions in intercellular channels », *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 6, p. 183-192.
- YIANGOU, M., X. GE, K. C. CARTER et J. PAPAConstantinou (1991). « Induction of several acute-phase protein genes by heavy metals: A new class of metal-responsive genes », *Biochemistry*, vol. 30, p. 3798-3806.
- YOSHIZAKI, G., R. PATINO et P. THOMAS (1994). « Connexin messenger ribonucleic acids in the ovary of Atlantic croaker: Molecular cloning and characterization, hormonal control, and correlation with appearance of oocyte maturational competence », *Biology of Reproduction*, vol. 51, p. 493-503.
- YOSHIZAKI, G. et R. PATINO (1995). « Molecular cloning, tissue distribution, and hormonal control in the ovary of Cx41 mRNA, a novel *Xenopus* connexin gene transcript », *Molecular Reproduction and Development*, vol. 42, p. 7-18.
- ZAMPIGHI, G.A., D.D LOO, M. KREMAN, S. ESKANDARI et E.M. WRIGHT (1999). « Functional and morphological correlates of connexin50 expressed in *Xenopus laevis* oocytes », *Journal of General Physiology*, vol. 113, p. 507-524.
- ZHANG, J.T. et B.J. NICHOLSON (1989). « Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junctions, Cx26, as deduced from its cDNA », *Journal of Cell Biology*, vol. 109, p. 3391-3401.
- ZHANG, J.T. et B.J. NICHOLSON (1994). « The topological structure of connexin 26 and its distribution compared to connexin 32 in hepatic gap junctions », *Journal of Membrane Biology*, vol. 139, p. 15-29.

CHAPITRE

8

STRESS PHYSIOLOGIQUE ET PERTURBATION ENDOCRINIENNE CHEZ LES BIVALVES MARINS

JOCELYNE PELLERIN

*Institut des sciences de la mer de Rimouski (ISMER)
Université du Québec à Rimouski (UQAR)*

SOPHIE GAUTHIER-CLERC

*Institut des sciences de la mer de Rimouski (ISMER)
Université du Québec à Rimouski (UQAR)*

AHMED SIAH

*Institut des sciences de la mer de Rimouski (ISMER)
Université du Québec à Rimouski (UQAR)*

OLIVIER ASSOI-ETCHIAN

*Institut des sciences de la mer de Rimouski (ISMER)
Université du Québec à Rimouski (UQAR)*

RÉSUMÉ

Ce chapitre se veut une illustration des principaux travaux réalisés en écotoxicologie dans notre laboratoire. Loin de nous la prétention de faire un tour complet des biomarqueurs disponibles internationalement. Il y a d'excellents ouvrages qui ont réussi avec brio cet objectif (Lagadic *et al.*, 1998). Plutôt, nous avons mis l'emphasis sur les signaux cellulaires et moléculaires développés et validés dans nos laboratoires ces dernières années. Fidèles à l'approche multiparamétrique utile lors des études sur le terrain et aussi pour bien détecter l'ampleur des effets des contaminants ou tout simplement pour aider à l'interprétation des réponses obtenues, nous présentons dans ce chapitre des indications de signaux moléculaires et cellulaires qui s'apparient bien et s'utilisent avec succès chez les bivalves marins et estuariens.

Le premier ensemble de biomarqueurs comprend, au niveau moléculaire, la mesure du stress oxydant occasionné par la surproduction de radicaux libres de l'oxygène, en réponse aux stress du milieu, dont la présence de contaminants. Les mesures des activités catalasiques et des glutathione-*S*-transférases sont utiles pour estimer avec précision les effets des variations des facteurs du milieu (température, hydrodynamisme, concentrations en phytoplancton lorsque ces conditions sont limitantes) et constituent un signal précoce de perturbations plus importantes, telles les diminutions de réserves énergétiques et, conséquemment, du processus de reproduction des bivalves. Les réponses moléculaires reliées aux processus oxydants sont corrélées aux réponses cellulaires conduisant à la déstabilisation de la membrane lysosomale, lesquelles peuvent être indicatrices de dommages physiologiques plus fonctionnels, telle une cytophagie par protéolyse, et d'une utilisation rapide des réserves énergétiques pour contrer les effets chroniques d'un stress. Pour estimer des dommages potentiels au niveau de la population, des études de la croissance des individus et de paramètres fonctionnels reliés à la reproduction sont essentiels pour en déterminer la signification physiologique. Les mesures du potentiel de croissance, intégrant les mesures d'excrétion d'azote, de respiration et d'assimilation ont été utilisées avec succès sur le terrain pour estimer la performance physiologique d'individus à différentes positions en zone intertidale et aussi en mésocosmes, lors d'une exposition de bivalves à du pétrole et à un coagulant à base de silicone.

La reproduction étant un facteur clé de la performance des populations, nous avons ces dernières années tenu compte que de nombreux polluants ont une influence marquée sur la reproduction par le biais de leurs effets sur le niveau des réserves énergétiques ou grâce à la modulation endocrinienne. Nous avons étudié plus particulièrement la gamétogenèse, qui comprend la stéroïdogenèse et la vitellogenèse et qui est un processus clé de la reproduction pouvant être la cible de contaminants.

L'activité de l'aspartate transcarbamylase (ATCase) s'est avérée un bon indice de l'activité gonadique lors de la reproduction, signal moléculaire que nous avons utilisé en parallèle avec les relevés histologiques de stades de maturation sexuelle, les mesures de protéines apparentées à la vitelline et les niveaux d'hormones stéroïdes dans la gonade. Ces marqueurs se sont montrés sensibles aux organoétains tant en milieu naturel qu'en laboratoire, d'où leur potentiel évident pour les années à venir.

À l'heure actuelle, les perspectives de recherche s'orientent vers le développement systématique d'anticorps anti-vitellogénine chez les invertébrés marins pour des dosages rapides par ELISA, voire vers la recherche d'un anticorps universel. Quelles sont les hormones stéroïdiennes clés dans le processus de maturation sexuelle chez la moule bleue et la mye commune? Quels sont les sites d'action des perturbateurs endocriniens? Autant de questions auxquelles nous tenterons de répondre dans les prochaines années...

1. INTRODUCTION

Les vingt dernières années ont vu le développement de différents outils pour estimer les dommages physiologiques et écologiques des contaminants dans un écosystème. Il s'agissait d'adapter en premier lieu les outils toxicologiques disponibles en santé humaine pour les rendre compatibles à la réalité environnementale. Toutefois le défi était grand : comme l'*Homo sapiens* ne constitue qu'une espèce, on peut considérer que l'organisme humain est un écosystème en soi. Les progrès de la médecine font en sorte que l'on connaît bien chez l'humain les réponses enzymatiques et les variations des molécules plasmatiques suite à des dysfonctionnements physiologiques. Toutefois, les milieux terrestres et aquatiques sont constitués de milliers d'espèces dont la physiologie et la variabilité des réponses en fonction des facteurs du milieu restent encore à découvrir. Les recherches sur les conséquences environnementales de la présence de polluants se sont donc dirigées vers l'étude des effets de polluants précis, reconnus pour être dommageables pour la santé humaine, et sur des espèces dont on connaissait l'importance écologique et/ou commerciale. Néanmoins, l'adéquation entre les résultats obtenus en laboratoire et les effets observés *in situ* n'était pas celle escomptée. Les chercheurs en sont donc venus à établir des critères de choix d'espèces pour réaliser des études qui permettraient de rendre compte d'effets de polluants en milieu naturel, dont les écosystèmes aquatiques. Parmi ces critères, mentionnons la sédentarité, sinon la mobilité restreinte de l'animal dans son habitat, ainsi que la représentativité écologique de l'espèce dans la chaîne alimentaire. Mentionnons, pour les milieux estuariens et marins qui nous intéressent, les travaux de Couillard et Nellis (1999) et de Kirchhoff *et al.* (1999) qui montrent la pertinence d'utiliser un poisson, le choquemort (*Fundulus heteroclitus*) tandis que les travaux de Pelletier (St-Jean *et al.*, 1999 ; Bouchard *et al.*, 1999) et de Pellerin (Gauthier-Clerc *et al.*, 2002 ; Siah *et al.*, 2002 ; Pellerin-Massicotte, 1997 ; Pellerin-Massicotte, 1995) privilégient les bivalves comme modèle biologique. En outre, il devenait impératif de connaître les réponses physiologiques de base de ces espèces sentinelles afin de mieux comprendre la variabilité des réponses des biomarqueurs et, ainsi, d'interpréter adéquatement les données d'études écotoxicologiques.

La compréhension des mécanismes d'adaptation physiologique, explicatifs de la variabilité spatiale de la croissance et de la reproduction de bivalves marins présents en milieu estuarien froid, s'est donc avérée un champ de recherche pertinent, autant pour estimer les impacts réels de perturbateurs anthropiques que pour estimer la qualité du milieu aquatique ou marin en vue de l'exploitation d'espèces comestibles et d'importance économique. L'hypothèse de départ de ces programmes de recherche était, qu'en plus des facteurs de densité, de compétition et de prédation

déjà étudiés en écologie marine, les facteurs abiotiques comme le temps d'émersion, la concentration en oxygène, la disponibilité des substances nutritives ainsi que la présence de contaminants pouvaient contribuer aux variations des réponses.

1.1. LES BIOMARQUEURS

L'intégrité des populations et des communautés exposées à des stress naturels et chimiques peut être évaluée, une fois les réponses de base bien maîtrisées, entre autres, par la mesure de molécules telles les enzymes de détoxification et les macromolécules impliquées dans le métabolisme énergétique ou par la mesure fonctionnelles comme la phagocytose et la maturation sexuelle. Ces marqueurs de stress sont des signaux cellulaires à l'échelle moléculaire, biochimique ou physiologique dont les caractéristiques structurales ou fonctionnelles peuvent être rapidement modifiées à la suite de contraintes environnementales ou de l'exposition à des polluants. Ils sont des indicateurs précoces de l'atteinte des individus et peuvent être prédictifs d'une altération des populations, voire d'un dysfonctionnement des communautés. Parmi les systèmes métaboliques pouvant fournir une signalisation cellulaire, ceux que nous avons utilisés avec succès sont reliés aux processus oxydants et aux systèmes affectés par les perturbateurs endocriniens telles la maturation sexuelle et les teneurs en hormones impliquées dans ce processus.

2. SIGNAUX CELLULAIRES ET MOLÉCULAIRES DE STRESS PHYSIOLOGIQUE

2.1. LES PROCESSUS OXYDANTS

Les cellules des êtres aérobies, en état d'oxydoréduction normal, ont une concentration basale en radicaux libres de l'oxygène. On appelle stress oxydant une augmentation de radicaux libres de l'oxygène qui provoque des dommages cellulaires irréversibles, telles la peroxydation des lipides ou la dénaturation oxydante des acides aminés et des bases azotées (Regoli, 2000). La peroxydation des lipides constitués d'acides gras polyinsaturés entraîne une désorganisation des structures membranaires. Les protéines qui y sont imbriquées n'y sont plus fonctionnelles et on observe la libération de pentane et d'aldéhydes qui, à fortes concentrations, s'avèrent toxiques pour la cellule. La dénaturation oxydante des acides aminés conduit à une déstabilisation des structures secondaires et tertiaires des protéines, ainsi qu'à l'inactivation des enzymes. La modification des bases azotées par les radicaux libres de l'oxygène provoque, quant à elle, un arrêt ou une aberration de l'expression du message génétique dans la

cellule. Dans la majorité des cas, l'augmentation de la teneur cellulaire en radicaux libres de l'oxygène provient d'une production exagérée que les systèmes antioxydants ne sont pas capables de faire diminuer. Au niveau des organes, si ces radicaux libres de l'oxygène sont formés en forte quantité, les dommages cellulaires vont conduire à une nécrose des tissus ; par contre, si les radicaux libres de l'oxygène sont générés de façon continue, mais à des concentrations modérément plus élevées que la concentration basale, il sera plus probable d'assister à une cancérisation des tissus ou à un vieillissement prématuré (Cossu *et al.*, 1997).

En fait, une altération définitive des structures cellulaires peut se produire s'il existe un déficit dans les systèmes de protection cellulaire vis-à-vis les oxydants. Les mécanismes de résistance, importants pour évaluer le degré de tolérance des organismes aux stress naturels ou anthropiques, vont neutraliser les espèces électrophiles et les radicaux libres oxygénés et peuvent se classer en deux groupes :

- les molécules qui ont la propriété de fixer et de détruire les espèces électrophiles et radicalaires, tels le glutathion (GSH), la vitamine E, l'acide ascorbique, le β -carotène, les oses simples (surtout le glucose) et l'interféron β (Cossu *et al.*, 1997) ;
- les enzymes qui ont la capacité de transformer les radicaux libres oxygénés et qui se retrouvent entre autres dans le foie chez les mammifères ou dans la glande digestive chez les invertébrés (SOD, catalases, peroxydases) (Cossu *et al.*, 1997).

La production anormale d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) entraîne des effets délétères qui s'observent principalement dans les conditions suivantes en milieu marin :

- en période d'anoxie lors de l'émersion en zone intertidale (Pellerin-Massicotte, 1997) ;
- en présence de molécules toxiques, alors que les systèmes enzymatiques de détoxification (cytochromes P450, b5 et la NADPH-cytochrome c réductase) initient la chaîne de peroxydation dans la portion lipidique des membranes et génèrent des espèces réactives de l'oxygène qui attaquent les acides gras insaturés, avec production finale de malonyldialdéhyde (MDA) (Pellerin-Massicotte, 1997 ; Regoli, 2000).

Une relation a été établie chez les mammifères entre la formation d'ERO et les cassures chromosomiques, le métabolisme de l'oxygène et l'incidence du cancer ainsi que dans le processus de vieillissement (Ji *et al.*, 1990 ; Finkel et Holbrook, 2000). Chez les bivalves, une même dépendance a été établie par Ribera *et al.* en 1989. Totter (1980) met également l'accent sur l'importance des molécules antioxydantes dans le processus de sélection des populations qui auront une meilleure longévité. Les

polluants lipophiliques, pour leur part, perturberaient les lipides membranaires. Le mercure, le nickel et l'étain exerceraient leur toxicité par la peroxydation des lipides en relation avec les dommages cellulaires qui en résulteraient ; le glutathion (GSH) et la vitamine E protégeraient les cellules hépatiques du rat des effets toxiques du mercure. Même si les relations entre stress oxydant et micropolluants sont moins bien connues chez les organismes aquatiques, l'on sait maintenant que l'exposition du pétoncle de l'Antarctique au cuivre et au mercure affaiblit ses défenses antioxydantes (catalase et glutathion), effets qui sont corrélés aux dommages observés au niveau des membranes lysosomales (Regoli *et al.*, 1998).

2.1.1. Exemples de stress oxydant en milieu marin

Chez les invertébrés, des études chez la moule méditerranéenne, *Mytilus galloprovincialis*, montrent la présence de la malondialdéhyde (MDA) dans la glande digestive, les branchies et le manteau et des concentrations importantes de glutathion dans le manteau. Il n'y aurait pas chez cette espèce de différences selon le sexe dans la distribution des molécules de défense. Les travaux de Viarengo *et al.* (1991) chez *Mytilus edulis* L. indiquent nettement que les processus de peroxydation des lipides sont plus importants chez les moules plus âgées, le GSH et la vitamine E étant présents en concentrations moins grandes chez les moules plus âgées. Chez le pétoncle antarctique transplanté d'un site sain vers un lieu proche des décharges d'une station d'observation en Antarctique, malgré le peu de différences dans la stabilité de la membrane lysosomale, l'exposition aux effluents domestiques a entraîné des diminutions importantes des activités catalasiques et des glutathione-S-transférases (Regoli *et al.*, 1998). Ceci indique sans conteste une perte des propriétés antioxydantes du pétoncle, contrairement à d'autres résultats qui démontreraient la capacité de moules à capter le surplus de production des espèces réactives de l'oxygène, par une augmentation de l'activité catalasique (Pellerin-Massicotte, 1997). Ces résultats sur le pétoncle viennent renforcer nos observations sur la perte de la capacité immunitaire des bivalves en réponse à une exposition aux métaux (Sauvé *et al.*, 2002) et réaffirment bien la nécessité d'une approche multiparamétrique pour estimer avec justesse les effets toxiques des contaminants en milieu naturel. Ces effets peuvent être durables et mettre en danger la survie de l'organisme, voire de la population. C'est pourquoi nous avons toujours préconisé une telle approche multiparamétrique, en accord avec cette nouvelle tendance des années 1990 (Lagadic *et al.*, 1998 ; Depledge, 1994), qui vise justement à départager et à préciser les facteurs de dysfonctionnement chez les organismes aquatiques exposés aux contaminants et aux fluctuations des facteurs du milieu. Aux différents paramètres biochimiques et physiologiques choisis, les données de

croissance et de variations des mesures pondérales viennent en appui pour estimer le risque pour les populations à l'étude. Chaque biomarqueur doit être validé en milieu naturel et ses réponses basales bien comprises pour une interprétation juste. C'est dans ce sens que nous nous sommes posé la question suivante :

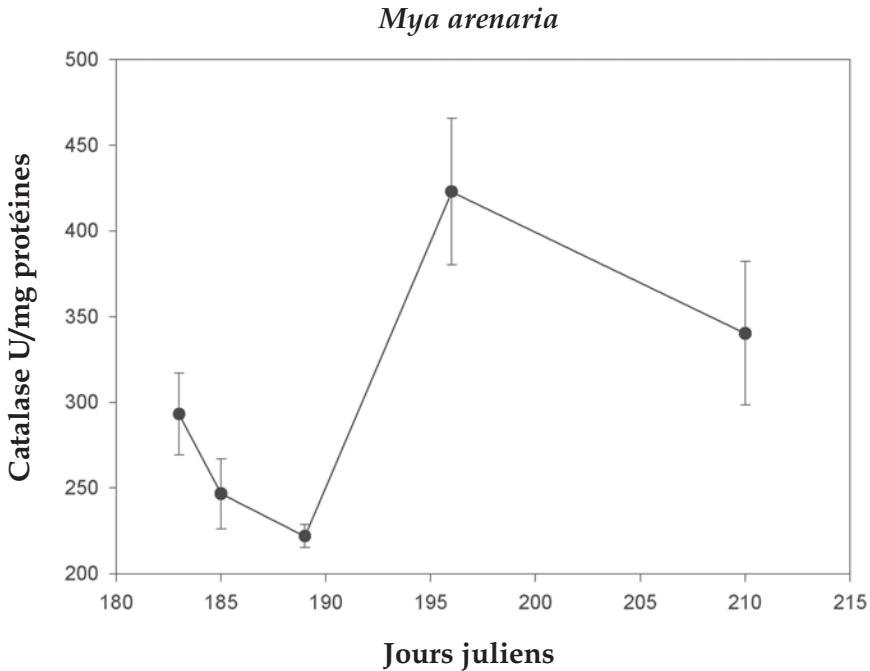
Les processus oxydants, en plus d'être induits par la présence de polluants, sont-ils amplifiés par les facteurs naturels comme la période d'immersion, la température, la salinité ?

Quelques éléments de réponse à cette question ont été trouvés par notre équipe lors d'une étude en mésocosmes (planches 3, 4 et 5). Celle-ci avait pour objectif d'établir l'effet des variations des paramètres physico-chimiques sur la production de radicaux libres et sur la performance physiologique d'invertébrés marins. Un suivi des facteurs du milieu en mésocosmes nous a montré une augmentation du seston et des pigments totaux à la fin juillet 1993, ainsi que des variations des concentrations en nitrates et en phosphate similaires à celles retrouvées en milieu naturel, montrant ainsi la pertinence de l'utilisation d'un tel dispositif expérimental.

2.1.2. Observations interspécifiques

Les observations interspécifiques nous renseignent bien sur la capacité d'acclimatation aux stress naturels. Comme Regoli *et al.* (1998) l'ont montré chez le pétoncle antarctique, *Adamussium colbecki*, les variations temporelles des activités catalasiques et des glutathione-*S*-transférases sont sensibles aux variations des concentrations en phytoplancton lorsque ces conditions sont limitantes et, conséquemment, au processus d'alimentation des bivalves.

De plus, chez la moule bleue, même si nous avons démontré antérieurement qu'en milieu naturel les processus oxydants sont induits par des températures plus froides (Pellerin-Massicotte, 1997), les températures chaudes estivales et les variations de salinité tout au long de l'exposition en mésocosmes n'ont pas induit de production de radicaux libres. Toutefois, chez *Nereis virens*, les processus oxydants ont été induits soit par une surcharge en matière organique dans les bacs, soit, plus vraisemblablement, par une augmentation de température associée à une baisse de salinité dans les mésocosmes au jour 196 (figure 8.1). Chez *Mya arenaria*, on observe une corrélation significative entre la réponse de la catalase et les changements de salinité et de température, autant en milieu naturel qu'en mésocosmes (figure 8.2).

Figure 8.1**Suivi des processus oxydants chez *Mya arenaria* via l'activité catalasique**

Des activités accrues ont été induites soit par une surcharge en matière organique dans les bacs, soit, plus vraisemblablement, par une augmentation de température associée à une baisse de salinité dans les mésocosmes au jour 196.

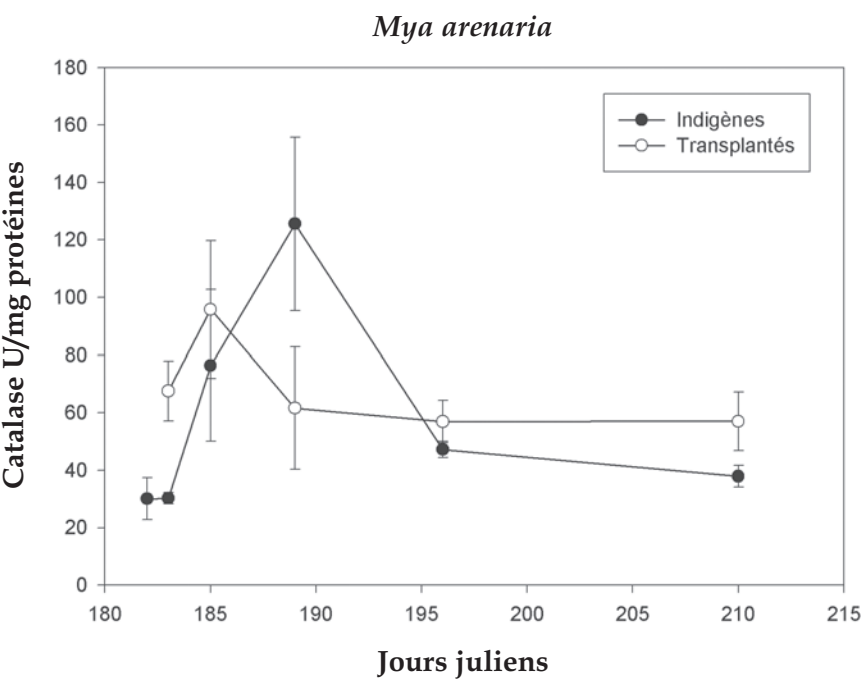
2.2. LA DÉSTABILISATION DE LA MEMBRANE LYSOSOMALE

La déstabilisation de la membrane lysosomale est un bel exemple d'un signal cellulaire d'un stress, bien corrélé avec le stress oxydatif (Regoli *et al.*, 1998), comme nous l'avons souligné ci-dessus. Les lysosomes sont des organelles cellulaires responsables d'un nombre considérable de fonctions digestives. À raison de plusieurs centaines par cellule, ils se présentent sous la forme de vésicules membraneuses contenant un stock d'enzymes hydrolytiques diverses, impliquées dans des processus de digestion de constituants intra- et extracellulaires ou celle de micro-organismes préalablement phagocytés. La barrière de perméabilité représentée par la membrane lysosomale est suffisante pour empêcher ces enzymes de s'échapper dans la cellule et d'y provoquer des altérations du cytoplasme. Par la diversité de leurs interventions, les lysosomes sont

à même d’entrer en contact avec de nombreux contaminants de l’environnement, métaux et xénobiotiques organiques. L’accumulation de telles substances dans les cellules et leur prise en charge par les lysosomes peut s’accompagner de dégradations de la structure de ces organites, notamment de la membrane, qui perd alors ses caractéristiques d’étanchéité. L’évaluation de ce type de perturbation subcellulaire s’est donc révélée un indice extrêmement sensible de la condition de la cellule. La déstabilisation de la membrane des lysosomes est liée de manière quantitative au degré de stress résultant des dégradations du cytoplasme par les enzymes lysosomales aussi bien qu’au degré d’altérations pathologiques générales qui en résulte.

Figure 8.2

Suivi des processus oxydants chez *Mya arenaria* autant en milieu naturel que transplantés dans les mésocosmes



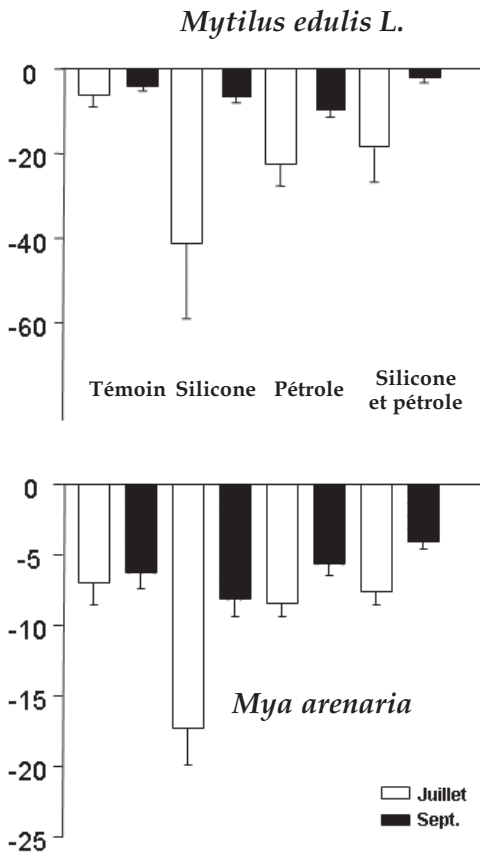
On note la correspondance de l’induction de l’activité catalasique aux jours 183 et 185 pour les myes placées dans les deux systèmes. Au jour 189, les myes indigènes ont dû subir un stress dû à la période d’émersion, possiblement une augmentation de température du sédiment, ce qui n’était pas possible en mésocosmes. La correspondance est parfaite aux jours suivants lorsque les myes retrouvent un niveau de base de la catalase.

2.2.1. Réponses de la membrane lysosomale aux paramètres du milieu

La déstabilisation de la membrane lysosomale, indicatrice de stress, est plus grande chez *Mytilus edulis* (L.), mais plus constante chez *Mya arenaria*, et est corrélée avec le temps d'exposition à l'air lors du cycle des marées, durant lequel le contenu protéique de la glande digestive décroît en

Figure 8.3

Exemple de réponses du potentiel de croissance (*scope for growth*) chez *Mya arenaria* et *Mytilus edulis*



On peut y voir les valeurs négatives du potentiel de croissance, valeurs conformes à celles retrouvées antérieurement chez des bivalves estuariens. On y retrouve aussi des effets négatifs du pétrole et du silicone utilisé comme coagulant du pétrole, agissant principalement sur l'excrétion d'azote, une des composantes du potentiel de croissance.

période d'émersion alors que l'on observe une augmentation de la déstabilisation de la membrane lysosomale. Il y a alors une activité accrue des enzymes lysosomales qui sont alors libérées dans le cytoplasme et il en résulte une cytophagie par protéolyse (Tremblay et Pellerin-Massicotte, 1995).

2.2.2. Réponses de la membrane lysosomale aux stress anthropiques

L'addition d'un facteur anthropique comme la présence de pollution *in situ* augmente ce signal cellulaire (Köhler, 1991 ; pour un examen complet de la question, voir Pellerin-Massicotte et Tremblay, 1997). L'émersion des animaux n'affecte cependant pas les indices biochimiques de croissance dans l'échelle de temps du cycle des marées. De plus, lors d'une étude de transfert de moules et de myes d'un site sain vers un site pollué dans l'estuaire maritime du Saint-Laurent, une déstabilisation plus grande de la membrane lysosomale a été observée en milieu contaminé (Pellerin-Massicotte *et al.*, 1993).

2.3. LA CROISSANCE : UN SIGNAL PHYSIOLOGIQUE, INTÉGRATEUR DES DYSFONCTIONNEMENTS

Les études écotoxicologiques n'auront de valeur que si on réussit à estimer le risque pour les populations exposées, d'où l'utilité de combiner des études de croissance qui viendront nous renseigner sur le bien-être physiologique des bivalves et satisfaire les conditions d'une approche multiparamétrique. Les variations de croissance observées en milieu contaminé constituent un signal d'effets potentiellement délétères, précurseurs d'effets létaux. On peut cependant se demander quel poids ont les paramètres du milieu sur les variations observées de la croissance et du potentiel de croissance (*scope for growth*), avant de se servir de ces mesures comme biomarqueur d'effets des contaminants.

2.3.1. Les paramètres du milieu : exemples de leur influence

Les périodes d'immersion et d'émersion étant cruciales pour le cycle d'alimentation de *Mya arenaria*, l'on pourrait s'attendre à ce que le potentiel de croissance des bivalves varie en fonction de la position en zone intertidale. En effet, les observations *in situ* en milieu peu contaminé (voir la planche 6) montrent, pour un même âge, des variations de taille importantes entre les niveaux de haute et basse mer en zone littorale. Le potentiel de croissance de *Mya arenaria* est cependant similaire pour des individus présents aux étages inférieurs et supérieurs de la zone intertidale (Bourassa, 1990). Aucune différence significative n'a pu être démontrée entre les deux groupes pour la consommation d'O₂, l'assimilation et

l'excrétion. Cependant, le groupe de l'étage supérieur, de plus petite taille, semble présenter une stratégie opportuniste en maintenant des taux de filtration supérieurs et des concentrations plus élevées en hydrates de carbone. Les études de Sobral et Widdows (1997) viennent confirmer la sensibilité du potentiel de croissance (*scope for growth*) aux températures variables du milieu : les températures élevées diminuent ce potentiel chez la palourde croisée d'Europe (*Ruditapes decussatus*).

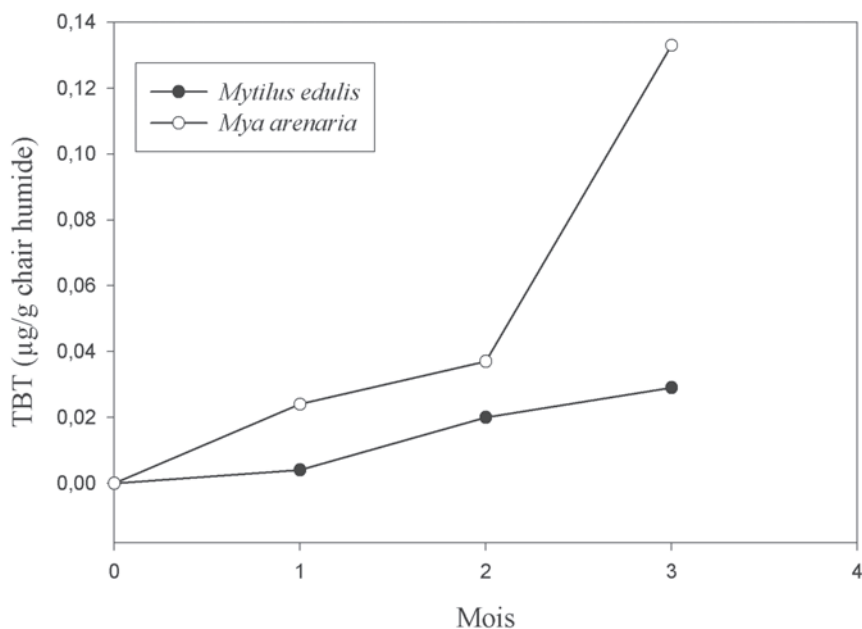
Ces variations spatiotemporelles nous interpellent et nous ont conduits à préciser l'ampleur de la variabilité de la croissance à une petite échelle spatiale, qui pourrait expliquer la variabilité à l'échelle moyenne. Ainsi, l'impact à court terme de divers facteurs écologiques sur la croissance, comme le temps d'émersion et la quantité de substances nutritives disponibles, a été évalué par des indices biochimiques de croissance tels les rapports ARN:ADN, protéines:ADN et protéines:ARN, chez le bivalve *Mya arenaria* (Mayrand *et al.*, 1994). Les résultats montrent que ni l'âge ni la taille n'influencent les indices biochimiques étudiés, du moins chez les individus adultes. Cependant, une importante variabilité spatiale des indices a été notée à une échelle de l'ordre de 6 m² et de 100 m², selon les tissus. Une variabilité temporelle marquée a aussi été relevée, mais les indices sont relativement indépendants des variations journalières de température. Les indices de l'hépatopancréas et du muscle adducteur augmentent rapidement en réponse aux variations journalières de la disponibilité de nourriture dans la colonne d'eau et le sédiment.

2.3.2. Le potentiel de croissance

Le potentiel de croissance est reconnu depuis plusieurs années pour sa sensibilité aux contaminants (Widdows *et al.*, 1995). Les paramètres physiologiques intégrateurs comme la filtration, l'assimilation, la respiration et l'excrétion, calculés en indice de croissance, nous ont également montré leur sensibilité après une exposition à des algues contaminées à 100 ng TBT l⁻¹ d'eau de mer à tous les 2 jours pendant 3 mois et également aux hydrocarbures (figure 8.3). Les études se sont déroulées en mésocosmes avec, comme organismes sentinelles, *Mytilus edulis* L. et *Mya arenaria*. Le potentiel de croissance est diminué en présence de TBT chez les deux espèces et la bioaccumulation est plus importante chez *Mya arenaria* (figure 8.4). L'ensemble de ces résultats montre la plasticité phénotypique de ces organismes benthiques et l'opportunisme qu'ils démontrent face aux conditions changeantes d'un milieu intertidal. Ces potentialités sont à considérer lors des études écotoxicologiques en milieu saumâtre compte tenu que ce biomarqueur a montré sa fiabilité en étant intégré à la panoplie de biomarqueurs du réseau BioMar de l'Union européenne en milieu naturel (Widdows *et al.*, 1995, 1996) et en laboratoire (Widdows *et al.*, 1982; Widdows, 1985).

Figure 8.4

Exposition de *Mya arenaria* et de *Mytilus edulis* à du TBT via du phytoplancton contaminé



Dans cette étude en mésocosmes, on note la plus grande bioaccumulation de TBT chez *Mya arenaria*.

3. SIGNALISATION CELLULAIRE DE LA REPRODUCTION ET DE SES DYSFONCTIONNEMENTS

La reproduction est reconnue comme un élément essentiel pour le maintien de l'équilibre des communautés dans les écosystèmes. Cependant, de nombreux polluants ont une influence marquée sur la reproduction autant sur le niveau des réserves énergétiques, comme les hydrates de carbone chez les bivalves (Mathieu, 1994 ; Pellerin-Massicotte *et al.*, 1993), que sur la modulation endocrinienne (Blaise *et al.*, 1999). Plusieurs processus clés de la reproduction (Tavera-Mendoza *et al.*, 2002 ; Wade *et al.*, 2002) peuvent être la cible de contaminants qui viendront modifier les actions des hormones et la physiologie de la reproduction (Gagné *et al.*, 2002). Mentionnons la gamétogenèse, qui comprend la stéroïdogénèse et la vitellogénèse. Les interactions sont complexes et multiples entre ces processus et les molécules clés qui constituent chaque étape de la régulation du cycle reproducteur chez les mollusques bivalves.

3.1. LA GAMÉTOGÈSE

La gamétogenèse chez les mollusques bivalves comprend, comme chez tous les métazoaires actuels, une ovogenèse et une spermatogenèse dont le déroulement est bien connu. La moule et la mye sont itéropares (plusieurs périodes de reproduction possibles la même année et sur plusieurs années) avec des épisodes de croissance de la gonade, de rupture, de résorption et de recroissance. Il n'y a pas de dimorphisme sexuel autre que pour la structure de la gonade, ni d'intersexualité, d'hermaphrodisme ou de changement de sexe, même si des cas isolés ont été rapportés (Ropes, 1982). Plusieurs facteurs environnementaux sont reconnus comme inducteurs de la ponte chez les bivalves : mentionnons la température, la photopériode, la salinité et l'alimentation, mais aucun de ces facteurs n'agit aussi puissamment que la température (Giese et Pearse, 1974).

3.1.1. Le développement des ovocytes

Le développement des ovocytes se fait en mode alimentaire grâce à l'apport de lipides, protéines, glucides et autres molécules véhiculées par l'hémolymphe et chez les deux sexes, on retrouve la présence de cellules nourricières adjacentes qui prennent part aux processus de phagocytose et de résorption des ovocytes. Au cours de la gamétogenèse chez *Mytilus edulis*, la dégradation du glycogène est soit assurée par la voie de la phosphorolysase directe impliquant la glycogène phosphorylase et la phosphoglucomutase, soit par la voie de l'hydrolyse du glycogène suivie d'une phosphorylation du glucose et qui met en jeu les enzymes amyloglucosidase et hexokinase (Zaba, 1981). En milieu aquatique, l'étude des enzymes a un intérêt pratique, celui de servir à évaluer l'état de santé des organismes (Pellerin-Massicotte, 1995), en vérifiant l'intégrité des voies métaboliques.

3.2. L'ENZYME ASPARTATE TRANSCARBAMYLASE

Un certain nombre de travaux ont montré qu'une synthèse accrue d'acides nucléiques (ADN et ARN) accompagne la transformation et la multiplication des cellules de la lignée germinale en gamètes au cours de la maturation sexuelle chez les mollusques (Motavkine et Varaskine, 1989). Les nucléotides pyrimidiques constituent avec les purines les unités fondamentales des acides nucléiques aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes (Jones, 1980). L'uridine monophosphate (UMP) est le précurseur des pyrimidines et sa synthèse fait intervenir six enzymes dont l'aspartate transcarbamylase (ATCase EC 2.1.3.2). Au cours de la réaction catalysée par l'ATCase, le groupe amine nucléophile d'un des substrats, en occurrence l'aspartate, attaque le groupement carbonyle du carbamylphosphate, qui est l'autre substrat de cette enzyme, en déplaçant le

phosphate pour aboutir à la formation du carbamylaspartate. L'ATCase est de loin l'enzyme la plus étudiée des six enzymes impliquées dans la biosynthèse des pyrimidines.

3.2.1. Utilisation de l'ATCase

L'activité de l'aspartate transcarbamylase (EC 2.1.3.2) constitue une mesure de la dynamique d'un processus en croissance rapide (Bergeron et Alayse-Danet, 1981 ; voir revue de Mathieu, 1985). Bergeron et Alayse-Danet (1981) ont démontré la corrélation entre l'activité ATCase et les variations du rapport gonado-somatique chez *Pecten maximus*. L'activité de l'ATCase est un bon indice de l'activité gonadique lors de la reproduction chez *Mytilus edulis* (Mathieu *et al.*, 1982). Les pics de l'activité de l'enzyme chez *Sepia officinalis* sont corrélés aux divisions des spermatocytes et des cellules folliculaires au cours de la vitellogénèse (Koueta et Boucaud-Camou, 1992).

L'activité de l'ATCase, utilisée comme indice biochimique de la productivité du zooplancton (Biegala et Harris, 1999), augmente de façon hautement significative avec le rapport ARN/ADN lors de la maturation sexuelle (Biegala *et al.*, 1999). Quelques travaux réalisés en laboratoire ont été consacrés à la mesure de la croissance à court terme des mollusques, à l'aide de la mesure de l'activité de l'ATCase. Ainsi, chez *Sepia officinalis*, Koueta *et al.* (1998) ont montré que l'activité ATCase semble un bon indice de croissance au cours des premiers stades de croissance active chez des individus juvéniles. Ces auteurs ont noté que l'activité de cette transférase corrélée à la concentration des ADN et ARN était influencée par la disponibilité de l'aliment. Chez les juvéniles *Crassostrea gigas*, l'utilisation de cette enzyme a permis de montrer des différences dans l'activité liées à la quantité d'aliments ingérés ou au régime alimentaire. Les résultats de cette étude ont mis en évidence une régulation à court terme de l'activité de cette enzyme (Erickson et Selivonchick, 1987).

La mesure de l'activité de l'ATCase est aussi un bon indice biochimique de la productivité du zooplancton (Biegala et Harris, 1999) et augmenterait de façon hautement significative avec le rapport ARN:ADN lors de la maturation sexuelle (Biegala *et al.*, 1999).

3.3. RÉGULATION DE LA GAMÉTOGÉNÈSE

Une régulation neurohormonale de la gamétogénèse a été observée chez tous les invertébrés avec des degrés divers de complexité, allant de l'action directe des neurosécrétions sur les gamètes (Cœlentérés) vers l'implication de cellules dont les sécrétions, souvent des hormones stéroïdes, sont des intermédiaires de l'influence des neurohormones (échinodermes, bivalves) (Motavkine et Varaskine, 1989). Le système neurosécréteur chez

les bivalves est assez évolué et est localisé dans des centres nerveux différents. Le contrôle de la gamétogenèse s'exerce principalement sur les cellules germinales par l'intermédiaire de gonadotrophines produites essentiellement par les ganglions cérébroïdes (Mathieu, 1991), tandis que la sérotonine (Kadai et Koide, 1989), de pair avec les prostaglandines (Deridovitch et Reunova, 1993), aurait un rôle majeur à jouer dans la rupture de la vésicule germinative. La décharge neurosécrétoire à courte échelle temporelle est activée par des changements brusques de température et par un choc osmotique via des décharges de médiateurs chimiques comme l'acétylcholine et la 5-hydroxytryptamine. Il existe également un cycle annuel de l'activité neurosécrétrice des cellules « A1 » qui se superpose au cycle gonadique. Bien que de nombreux stéroïdes et stérols aient été identifiés chez les mollusques bivalves, leur rôle physiologique reste encore à démontrer (Lubet et Mathieu, 1990).

3.4. LA STÉROÏDOGENÈSE

Les premières étapes de la biosynthèse des hormones stéroïdes sont similaires dans toutes les cellules stéroïdogènes, comme les cellules de Leydig pour la synthèse de la testostérone et les cellules ovariennes pour les œstrogènes et progestagènes. Dans les cellules des mammifères, la stéroïdogenèse est sous contrôle neuroendocrinien, faisant intervenir les hormones produites par l'antéhypophyse et dont la sécrétion est régulée par les gonadolibérines hypothalamiques (Gasnier, 1999). Cette fine régulation, bien étudiée chez les mammifères, se traduit chez les cellules stéroïdogènes par une stimulation de la séquestration du cholestérol dans la mitochondrie. Les molécules de cholestérol utilisées comme substrat pour la stéroïdogenèse sexuelle peuvent provenir de différentes sources dont la principale est l'endocytose de l'ester de cholestérol à l'intérieur des cellules stéroïdogènes *via* les apolipoprotéines (Benahmed *et al.*, 1981). Le cholestérol libre membranaire (Porpaczy *et al.*, 1997) et la synthèse *de novo* du cholestérol à partir de l'acétyl CoA (Benahmed *et al.*, 1981) participent eux aussi pour leur part (25 % pour la synthèse *de novo*) comme source de cholestérol pour les besoins stéroïdogènes de la cellule. Ainsi présent dans la cellule, le cholestérol est stocké sous forme estérifiée dans des gouttelettes lipidiques jusqu'à utilisation. Après stimulation par les hormones de l'antéhypophyse, l'ester de cholestérol est mobilisé à partir des gouttelettes lipidiques sous forme libre vers les mitochondries où il sera converti en prégnenolone. Les étapes de la stéroïdogenèse sont catalysées par plusieurs enzymes appartenant à la famille des cytochromes P450scc (*side-chain cleavage*).

Les cytochromes P450 stéroïdogéniques (C_{27sc} , C_{21sc} , 21-, 17 α -, 11 β -hydroxylase et aromatasase) sont des protéines avec un groupement hème et la protoporphyrine comme cofacteur. La réaction typique catalysée par le cytochrome P450 est l'hydroxylation des substrats lipophiles en présence du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) et d'une molécule d'oxygène. Les travaux de Privalle *et al.* (1983) ont établi que la formation de la prégnenolone à partir du cholestérol constituait l'étape limitant la stéroïdogénèse. L'action des hormones trophiques intervient sur la disponibilité du cholestérol pour le cytochrome P450 C_{27sc} en facilitant le transport du cholestérol à travers l'espace aqueux intermembranaire (Jefcoate *et al.*, 1986). Le rôle de la translocation intermitochondriale du cholestérol a été attribué à la protéine StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory*) (Clark *et al.*, 1994; Stocco, 2000). Il existe deux voies de formation des androgènes et œstrogènes à partir du prégnenolone : une voie delta 5 où la fonction 3 β est un hydroxyle, alors que cette fonction est une cétone dans la voie delta 4. La 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase-isomérase (3 β -HSD) catalyse la conversion des stéroïdes de la voie delta 5 vers la voie delta 4 en réalisant une déshydrogénation en 3 β et une isomérisation de la double liaison des stéroïdes en C_{19} et en C_{21} . La formation des androgènes fait intervenir la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase-isomérase (17 β -HSD) qui permet la réduction de l'androstènedione en testostérone. Ainsi synthétisée par la 17 β -HSD, la testostérone peut ensuite être métabolisée en œstradiol par le cytochrome P450 aromatasase.

3.4.1. Relations entre la disponibilité des réserves énergétiques et la régulation endocrinienne de la maturation des gonades

Mori (1969) fut l'un des premiers à montrer que la gonade des invertébrés est l'organe cible des hormones stéroïdes tout en démontrant le lien direct entre l'utilisation du glycogène et la maturation de la gonade. Il a également démontré que des réserves insuffisantes d'hydrates de carbone entraînent l'inhibition de la synthèse des hormones sexuelles chez *Crassostrea gigas*, ce qui trouble les mécanismes reproducteurs. La présence de progestérone, d'androgènes et de prostaglandine a aussi été observée dans les gonades et les reins de plusieurs bivalves dont *Mytilus edulis* (L.) (De Longcamp *et al.*, 1974; Reis-Henriques *et al.*, 1990). La progestérone s'élève en période de ponte en même temps que le 17 β -œstradiol et l'estrone, supportant l'hypothèse qu'elles sont impliquées dans la régulation de la maturation sexuelle. De plus, les œstrogènes faciliteraient la synthèse des métallothionéines durant le cycle reproducteur facilitant ainsi l'accumulation du Cd et du Cu (Reis-Henriques et Coimbra, 1990), une hypothèse qui n'a pas été exploitée à date et qui constituerait une belle perspective de recherche pour l'avenir.

3.4.2. Le rôle physiologique des stéroïdes chez les mollusques bivalves

Très peu d'études ont été effectuées pour préciser le rôle physiologique des stéroïdes chez les mollusques. Cependant, *Mytilus sp.* est l'une des espèces dont les mécanismes de la stéroïdogenèse ont été élucidés, tout au moins en partie. De Longcamp *et al.*, (1974) ont mis en évidence la présence de la 3 β -HSD/ Δ 5 isomérase, de la C₁₇₋₂₀ lyase, de la 17 β -HSD et de la 5 α -réductase, enzymes intervenant dans la synthèse de la progestérone, de la testostérone et du 17 β -œstradiol. Quelques endroits clés où ces enzymes sont impliquées dans la biosynthèse des stéroïdes pourraient être aussi des sites de perturbations suite à l'exposition à des xénostéroïdes. C'est une belle perspective de recherche que cette identification des sites explicatifs des phénomènes de changement de sexe au niveau des enzymes clés de la stéroïdogenèse.

Les acteurs intervenant dans la stéroïdogenèse chez *Mytilus edulis* sont apparentés à ceux des vertébrés : la progestérone (Siah *et al.*, 2002), la testostérone et le 17 β -œstradiol similaires aux vertébrés ont été détectés par GC-MS chez *Mytilus edulis* (Reis-Henriques *et al.*, 1990). L'hypothèse du contrôle de la maturité sexuelle chez *M. edulis* a été vérifiée par les études de Reis-Henriques *et al.* (1990). Ces auteurs ont observé des pics de la progestérone reliés aux périodes de forte activité de développement des gamètes. Ces résultats laissent présager un rôle de la progestérone dans la régulation du cycle reproducteur chez cette espèce.

3.5. RÔLE DE LA VITELLOGÉNINE ET DES PROTÉINES ASSOCIÉES

3.5.1. La vitellogenèse chez les invertébrés

Chez les invertébrés et en particulier les invertébrés marins appartenant au phylum des arthropodes, des échinodermes ou des mollusques, les lipoprotéines sont présentes dans l'hémolymph ou le liquide cœlomique, les ovaires ou la gonade de même que dans les œufs. Les voies de synthèse et de transfert de la vitellogénine ou de protéines apparentées sont toutefois difficiles à décrire, car les études n'ont pas systématiquement été réalisées en parallèle dans la gonade, l'hémolymph et l'hépatopancréas d'un même organisme. Seule la caractérisation de chacune des lipoprotéines de tous les tissus permettrait de décrire le ou les lieux de synthèse de la vitellogénine, alors précurseur de lipovitellines (LVn) ou de vitellines (Vn) dans la gonade. La synthèse de vitellines au sein de la gonade, également appelée autosynthèse, a été démontrée chez de nombreux crustacés tels *Balanus amphitrite* (Shimizu *et al.*, 1996), les crevettes (Yano et Chienzei, 1987 ; Tom *et al.*, 1987) et le crabe (Lee et Watson, 1995). La vitellogénine a été retrouvée également dans l'hémolymph de *Penaeus monodon* femelles (Longyant *et al.*, 1999) et en quantité accrue durant la

vitellogénèse chez *Macrobrachium rosenbergii* (Chang et Shih, 1995). Cette présence dans l'hémolymph de protéines femelles précurseurs de lipovitellines laisse présager d'une synthèse extraovarienne. Une hétérosynthèse ou synthèse extraovarienne est également envisagée d'après l'activité endocytotique des ovocytes ou encore la caractérisation de protéines membranaires liant spécifiquement la vitellogénine chez certains crustacés (Jugan et Van Herp, 1989). Pour les échinodermes, la caractérisation de la vitellogénèse est différente. Chez l'étoile de mer *Asterias rubens* (L.) l'hétérosynthèse est responsable de la synthèse de vitellogénine au sein du coelom pylorique et la vitellogénine est ensuite transportée dans l'ovaire via les coélémocytes (Voogt *et al.*, 1985). Chez l'oursin, l'ARN messager de vitellogénine a également été rapporté dans les intestins, les gonades mâles et femelles, ce qui démontre non seulement une véritable synthèse extraovarienne, mais aussi l'absence d'une spécificité reliée au sexe, même si l'accumulation de vitellogénine reste effective dans la cavité coelomique de femelles durant la vitellogénèse (Shyu *et al.*, 1986). Chez les mollusques bivalves la mise en évidence de vitelline est récente et la vitellogénèse est encore mal décrite. Une protéine apparentée aux vitellines a pu être localisée dans l'hémolymph de femelles et dans la gonade de *Crassostrea gigas* (Suzuki *et al.*, 1992 ; Li *et al.*, 1998) de même que chez *Patinopecten yessensis* (Osada *et al.*, 1992). Ces observations privilégient l'hypothèse d'un processus d'autosynthèse de la gonade chez les mollusques, renforcée par l'immunolocalisation de la vitelline dans la gonade de *Mercenaria mercenaria* exclusive aux ovocytes durant la gamétogenèse (Lee *et al.*, 1994). Une hétérosynthèse reste malgré tout à envisager par l'activité d'endocytose des ovocytes chez *Crassostrea gigas* (Eckelbarger et Davis, 1996) et chez *Mytilus edulis* (Pipe, 1987) ainsi que par la présence de protéines apparentées à la vitellogénine dans l'hémolymph de *Mya arenaria* durant la gamétogenèse (Blaise *et al.*, 1999). Tout comme chez les vertébrés ovipares, de nombreuses hormones et neurohormones sont impliquées dans la reproduction chez les invertébrés (Voogt *et al.*, 1985 ; Lubet et Mathieu, 1990 ; Longyant *et al.*, 1999) parmi lesquelles certains œstrogènes comme le 17 β -œstradiol (Matsumoto *et al.*, 1997 ; Schœnmakers *et al.*, 1981). Il a d'ailleurs été démontré que 17 β -œstradiol était capable d'induire *in vivo* le processus vitellogénique et notamment la synthèse de protéines apparentées aux vitellines chez *Asteria rubens* (Schœnmakers *et al.*, 1981), *Crassostrea gigas* (Li *et al.*, 1998) et *Mya arenaria* (Blaise *et al.*, 1999).

4. LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

4.1. PROBLÉMATIQUE GÉNÉRALE DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

Dès le début des années 1990, il a été démontré que de nombreux contaminants étaient capables de moduler le système endocrinien chez la faune sauvage comme chez l'humain (Colborn et Clement, 1992 ; Crain et

Guillette, 1997). Cette problématique s'est mise en place suite aux observations de liens de cause à effet entre la présence d'organochlorés et des dysfonctionnements de la reproduction chez la faune sauvage, tels les alligators, oiseaux et mammifères, les espèces les plus touchées étant les piscivores, tel que montré dans le tableau 8.1. Les systèmes affectés touchent autant la croissance de la gonade que les teneurs en hormones.

Parmi ces perturbateurs endocriniens figurent les pesticides organochlorés (DDT et ses métabolites), l'atrazine, le chlordane, le chlordecone, la dieldrine, le lindane et le méthoxychlore ainsi que les herbicides et les fongicides, les biphenyles polychlorés (BPC), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les dioxines et les dibenzofuranes, les alkylphénols, les phtalates, les organoétains, les œstrogènes naturels et synthétiques (Tyler *et al.*, 1998) et également certains métaux comme le cadmium et le plomb (Lee et Noone, 1995 ; Olsson *et al.*, 1995).

Tableau 8.1

Récapitulatif des effets observés sur différentes espèces exposées aux perturbateurs endocriniens

Espèces	Effets observés	Perturbateurs endocriniens	Références
Meunier noir	↓ diamètre gonade ↓ testostérone ↓ 17β-œstradiol	Effluents des industries de pâte et papier	Munkittrick <i>et al.</i> , 1994
Perches	↓ diamètre gonade	HAP, BPC, métaux	Hontela <i>et al.</i> , 1995
Alligator	↓ testostérone ↓ 17β-œstradiol ↓ follicules polyovulaires ↓ ovocytes polynucléaires	Toxaphène, dieldrine, BPC	Guillette <i>et al.</i> , 1994
Béluga	↓ activité folliculaire	DDT, Mirex, PCP	Beland <i>et al.</i> , 1992
<i>Balanus amphitrite</i>	↓ protéines de type vitelline	4-NP	Billinghurst <i>et al.</i> , 2000
<i>Mya arenaria</i>	↓ protéines de type vitelline ↓ délai de maturation sexuelle	4-NP	Blaise <i>et al.</i> , 1999

Certains de ces produits se sont avérés des compétiteurs pour les récepteurs des hormones stéroïdes sexuelles et venir modifier l'homéostasie endocrinienne. Tout comme l'action toxique d'autres contaminants, les perturbateurs endocriniens exercent leur action maximale sur des

animaux en développement, particulièrement lorsque l'exposition est réalisée aux stades embryonnaires. Des signaux cellulaires simples comme les concentrations plasmatiques d'œstradiol et de testostérone ont permis d'établir chez des vertébrés les ratios entre les genres des populations exposées (Matter *et al.*, 1998).

4.2. LE CAS DES XÉNO-ŒSTROGÈNES DANS L'ENVIRONNEMENT

4.2.1. Identification et mode d'action

Les xéno-œstrogènes, aussi appelés exo-œstrogènes ou œstrogènes environnementaux, sont des composés présents dans l'environnement et capables de se substituer aux œstrogènes, en particulier au 17 β -œstradiol, ou d'interférer avec son métabolisme. Trois modes d'action peuvent caractériser leurs propriétés œstrogéniques : former une liaison directe avec le récepteur-œstrogénique (ER) et l'activer, se lier à d'autres récepteurs nucléaires qui interagissent avec le domaine de l'ADN sensible aux œstrogènes (ERE : *estrogen responsive element*) ou encore perturber d'autres signaux de transduction impliqués dans l'émission du signal hormonal du 17 β -œstradiol (Mc Lachlan et Arnold, 1996 ; Gillesby et Zacharewski, 1998). Une interaction avec le récepteur aryl hydrolase (Ahr) capable de moduler l'activité du cytochrome P450, lui-même impliqué dans le métabolisme du 17 β -œstradiol, est un exemple de perturbation engendrée par les xéno-œstrogènes avec un signal de transduction (Gillesby et Zacharewski, 1998 ; Navas et Segner, 1998). Les propriétés œstrogéniques de contaminants peuvent être détectées grâce à des tests élaborés en laboratoire sur des cellules humaines ou des bactéries avec respectivement le test E-Screen, qui s'appuie sur la prolifération de cellules cancéreuses (MCF-7, CEF) (White *et al.*, 1994), ou les tests qui utilisent des gènes rapporteurs placés derrière l'élément ERE qui, après activation, entraîne leur transduction avec le gène *lac-Z* et la production de β -galactosidase (McLachlan et Arnold, 1996 ; Routledge et Sumpter, 1996).

De nombreux composés naturels et chimiques sont désormais reconnus comme étant des xéno-œstrogènes (Gillesby et Zacharewski, 1998). Leurs structures chimiques peuvent être très différentes, mais certaines études tentent de prévoir leur réactivité avec le récepteur ER en fonction de leurs caractéristiques structurales plus ou moins proches de celles du 17 β -œstradiol avec son groupement phénolique (Duax et Griffin, 1985 ; Bradbury *et al.*, 1996 ; Tong *et al.*, 1997).

4.2.2. Présence en milieu aquatique

Les principaux xéno-œstrogènes décrits dans l'environnement aquatique sont le 17 β -œstradiol et l'éthinylœstradiol, des résidus de pilules contraceptives, des phyto-œstrogènes, des organochlorés, des biphényles

polychlorés et certains alkylphénols (Tyler *et al.*, 1998). Leur transfert dans les cours d'eau, les estuaires et les zones côtières a principalement lieu via les effluents industriels et urbains. Les alkylphénols (AP) sont très largement utilisés comme surfactants non ioniques et ils présentent une activité œstrogénique tout comme leurs produits de dégradation (nonylphénol [NP], nonylphénolpolyéthoxylates [NPxEO], octylphénol [OP]) dont la présence dans le milieu est favorisée par le traitement biologique des effluents (Jobling et Sumpter, 1993 ; Routledge et Sumpter, 1996). Bien que l'œstrogénicité des xéno-œstrogènes soit de 1000 à 10 000 fois moins effective que celle du 17 β -œstradiol (White *et al.*, 1994 ; Nimrod et Benson, 1996), certaines concentrations rapportées dans l'eau à proximité de rejets peuvent être proches de concentrations déterminées expérimentalement pour induire un effet œstrogénique (Blackburn *et al.*, 1999). Les concentrations rapportées dans l'eau aux États-Unis ou en Europe sont de l'ordre du 0,038 à 46 $\mu\text{g/L}$ et jusqu'à plus de 2000 $\mu\text{g/L}$ dans des effluents (Bennie *et al.*, 1997 ; Lye *et al.*, 1999 ; Blackburn *et al.*, 1999). De plus, leur hydrophobicité facilite leur persistance dans la matrice sédimentaire sur laquelle ils s'adsorbent (Bennie *et al.*, 1997 ; Blackburn *et al.*, 1999 ; Lye *et al.*, 1999 ; Bennett et Metcalfe, 2000). Cette persistance représente alors un risque d'exposition permanent car la bioaccumulation des AP démontrée en laboratoire chez des organismes marins comme la moule ou la crevette (McLeese *et al.*, 1981 ; Ekelund *et al.*, 1990) a été confirmée *in situ* chez les poissons de zones estuariennes (Blackburn *et al.*, 1999 ; Lye *et al.*, 1999) et les bivalves d'eau douce (Bennett et Metcalfe, 2000).

4.3. UTILISATION DE LA VITELLOGÉNINE COMME SIGNAL D'EXPOSITION

Chez les vertébrés ovipares et les mollusques, l'induction par le 17 β -œstradiol, de la synthèse de vitellogénine ou de protéines apparentées reflète l'intérêt potentiel de ce type de protéines dans le cas d'exposition des organismes à des composés œstrogéniques naturels ou synthétiques. L'induction de la synthèse de vitellogénine a ainsi permis de démontrer l'œstrogénicité de nombreux composés par comparaison avec l'effet d'une exposition au 17 β -œstradiol. L'interaction avec le récepteur nucléaire spécifique aux œstrogènes de certains alkylphénols, BPC ou même du *o,p'*DDT, du *o,p'*DDE ou encore du lindane, a d'ailleurs été clairement démontrée chez des poissons mâles *Oncorhynchus mykiss* (White *et al.*, 1994 ; Flouriot *et al.*, 1995 ; Donohoe et Curtis, 1996). L'exposition *in vivo* ou *in vitro* à des effluents industriels ou de stations d'épuration reconnus pour être des vecteurs de ces xéno-œstrogènes montre clairement une relation de type dose/effet avec la synthèse de vitellogénine chez la truite arc-en-ciel (Purdom *et al.*, 1994 ; Sumpter et Jobling, 1995 ; Gagné et Blaise, 1998 ; Hansen *et al.*, 1998 ; Harries *et al.*, 1999), la carpe (Folmar *et al.*, 1996) et la

plie (Allen *et al.*, 1999). La dilution expérimentale de 75 % d'un effluent est parfois même nécessaire pour que ses propriétés œstrogéniques ne soient plus détectables (Harries *et al.*, 1999). La présence de vitellogénine dans le plasma de mâles permet alors de définir *in situ* l'intensité de l'exposition des organismes à des xéno-œstrogènes pour différents sites (Sumpter et Jobling, 1995 ; Harries *et al.*, 1997) et les concentrations en vitellogénine chez des mâles exposés *in situ* peuvent être supérieures à celles d'organismes témoins d'un facteur 4 à 6 et supérieures aux concentrations observées chez les femelles matures (Allen *et al.*, 1999). Toutes ces études ainsi qu'une bonne connaissance du processus vitellogénique chez les vertébrés ovipares ont conduit à un consensus pour reconnaître la vitellogénine comme biomarqueur d'exposition aux xéno-œstrogènes chez les poissons (Sherry *et al.*, 1999 ; Kime *et al.*, 1999 ; Nicolas, 1999) de même que chez la grenouille (Palmer *et al.*, 1998). Les efforts méthodologiques s'orientent désormais vers l'utilisation systématique d'anticorps anti-vitellogénine pour des dosages rapides par ELISA (Denslow *et al.*, 1999), voire vers la recherche d'un anticorps universel (Heppell *et al.*, 1995).

De récentes études laissent cependant présager l'intérêt de certains invertébrés comme le mollusque bivalve *Mya arenaria* (Blaise *et al.*, 1999) ou le crustacé *Balanus amphitrite* (Billinghurst *et al.*, 2000) en tant que candidats pour l'estimation de l'exposition d'après les résultats obtenus lors de l'induction de la synthèse de protéines apparentées à la vitellogénine après exposition *in vivo* au nonylphénol. Dans cette perspective, une connaissance approfondie de la vitellogenèse s'avère cependant nécessaire pour chaque espèce afin de définir les limites d'utilisation *in situ* de la vitellogénine comme biomarqueur d'exposition aux xéno-œstrogènes. La description d'une synthèse naturelle spécifique au sexe et au tissu des protéines apparentées à la vitellogénine ainsi que des variations saisonnières de leur synthèse reste à faire.

4.4. AUTRES EFFETS ASSOCIÉS À L'EXPOSITION AUX XÉNO-ŒSTROGÈNES

De nombreuses perturbations peuvent apparaître chez des organismes exposés *in vivo* aux œstrogènes naturels ou aux alkylphénols. La majeure partie des études disponibles concernent une nouvelle fois les poissons chez qui ces composés (EE2, NP, NP1EC, NP2EC, OP) affectent la croissance (Ashfield *et al.*, 1998 ; Drèze *et al.*, 2000), la reproduction avec notamment une baisse de l'indice ovosomatique (Ashfield *et al.*, 1998 ; Scholz et Gutzeit, 2000), voire la fécondité chez les femelles (Kramer *et al.*, 1998 ; Nimrod et Benson, 1996 ; Schold et Gutzeit, 2000). La différenciation sexuelle peut également être perturbée avec l'apparition de caractères sexuels secondaires femelles chez les mâles (Drèze *et al.*, 2000) allant même jusqu'à l'apparition du phénomène d'intersexe qui caractérise la présence

d'ovocytes dans les gonades mâles de juvéniles (Gray et Metcalfe, 1997). En Grande-Bretagne, ce phénomène d'intersexe a déjà été observé *in situ* en aval de rejets de stations d'épuration (Jobling *et al.*, 1996) ou dans des zones côtières, alors que les indices hépatosomatiques élevés étaient corrélés avec la présence de vitellogénine dans le plasma chez les organismes atteints (Allen *et al.*, 1999). Il est à noter que des déformations de coquilles de larves d'huître *Crassostrea gigas* de même qu'un retard dans leur développement sont apparus après exposition au 4-NP ou au 17 β -œstradiol (Nice *et al.*, 2000). L'interférence de ces deux composés avec le métabolisme du calcium des larves de même qu'avec le développement reste cependant à définir pour être véritablement reconnue comme la conséquence d'une perturbation endocrinienne et non pas d'une action toxique (Nice *et al.*, 2000). Servos (1999) a répertorié de très nombreuses études de toxicité (CL50, CE50, LOEL, NOEL, génotoxicité, mutagénicité) des alkylphénols et des alkylphénols polyéthoxylates. Cette toxicité croît lorsque la longueur de la chaîne des éthoxylates diminue puisque la liposolubilité des composés est alors plus importante (Servos, 1999). D'autres effets métaboliques semblables à ceux du 17 β -œstradiol et mesurés par caloresspirométrie ont été observés chez *Elliptio complanata*: stimulation du métabolisme pour de faibles concentrations, puis inhibition des concentrations plus importantes (Cheney *et al.*, 1997 ; Levine et Cheney, 2000). La taille variable des alkylphénols polyéthoxylates pourrait expliquer les variations de toxicité ; certaines molécules plus petites seraient capables de traverser les membranes tissulaires (Levine et Cheney, 2000).

4.5. LES ANTI-ŒSTROGÈNES

Les TCDD (2,3,7,8-tétrachlorodibenzodioxine) et les hydrocarbures aryl halogénés, produits de combustion ou sous-produits industriels, ainsi que les dioxines dibenzopolychlorées (PCDD) et les dibenzofuranes (PCDF) sont des résidus chimiques reconnus et identifiés dans tous les compartiments des écosystèmes. Compte tenu de la vaste gamme des fonctions physiologiques et cellulaires des œstrogènes, les anti-œstrogènes peuvent moduler ou bloquer plusieurs processus de la reproduction et du développement. Les plus susceptibles de l'être sont :

- la reproduction, puisque les œstrogènes jouent un rôle majeur dans les rétroactions entre les neurohormones et les hormones gonadiques. La vitellogenèse et la croissance de la gonade pourront donc être affectés ;
- le développement et la différenciation sexuelle, les stéroïdes régulant la différenciation sexuelle et la maturation sexuelle (Sumpter et Jobling, 1995).

5. SIGNALISATION CELLULAIRE EN MILIEU MARIN : RÉSULTATS RÉCENTS

5.1. VARIATION DE LA MATURATION SEXUELLE CHEZ *MYA ARENARIA* DANS LE FJORD DU SAGUENAY (QUÉBEC) : EXPOSITION À DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ?

Le fjord du Saguenay est situé sur la rive nord de l'estuaire du Saint-Laurent, près de 250 km en aval de Québec. La contamination du fjord est diffuse et multiple, par les métaux (Hg, Pb, Zn, Cu) et les HAP, dont les concentrations dans le sédiment diminuent de l'amont vers l'aval (Barbeau *et al.*, 1981 ; Martel *et al.*, 1986). *Mya arenaria* est très bien représentée le long du fjord de par sa grande tolérance pour de faibles salinités. Une première étude réalisée en 1996 avait mis à jour une immunodéficience chez les myes échantillonnées dans la partie amont du fjord (baie Éternité : BE) par rapport au site de référence (anse Saint-Étienne : ASE) situé en aval (Blaise *et al.*, 1996 ; Ginet, 1996). Les organismes présentaient en effet des réserves énergétiques plus faibles dans la glande digestive par rapport aux témoins, de même qu'une plus faible viabilité hémocytaire alors que la réponse immunologique était au contraire stimulée. Les conditions environnementales des deux sites BE et ASE étant comparables, le gradient de contamination des sédiments du fjord est alors apparu comme potentiellement responsable des effets observés chez les myes du site BE, localisé le plus en amont du fjord. Nous avons alors entrepris une deuxième campagne d'échantillonnage de mai à octobre 1997 afin de confirmer les différences intersites révélées en 1996. Nos objectifs ont été de dresser sur une période de 7 mois un diagnostic de la condition physiologique des myes par l'étude des variations des réserves énergétiques (glycogène, lipides, protéines) dans la gonade et le manteau, et décrire la maturation des gonades. Les réserves énergétiques peuvent en effet mettre en évidence des effets sublétaux liés au stress engendré par une exposition à des contaminants (Rajaleckshmi et Mohandras, 1993 ; Lagadic *et al.*, 1994). La mobilisation des réserves énergétiques de même que leur reconstitution présentant toutefois des variations saisonnières fortement liées à la gamétogenèse chez les bivalves (Ruiz *et al.*, 1992), le suivi de la gamétogenèse nous permettrait de discriminer l'effet d'un stress lié à l'exposition des organismes aux conditions propres au site de l'effet d'une implication des réserves énergétiques pour la maturation des gamètes (Sokolowski *et al.*, 1999).

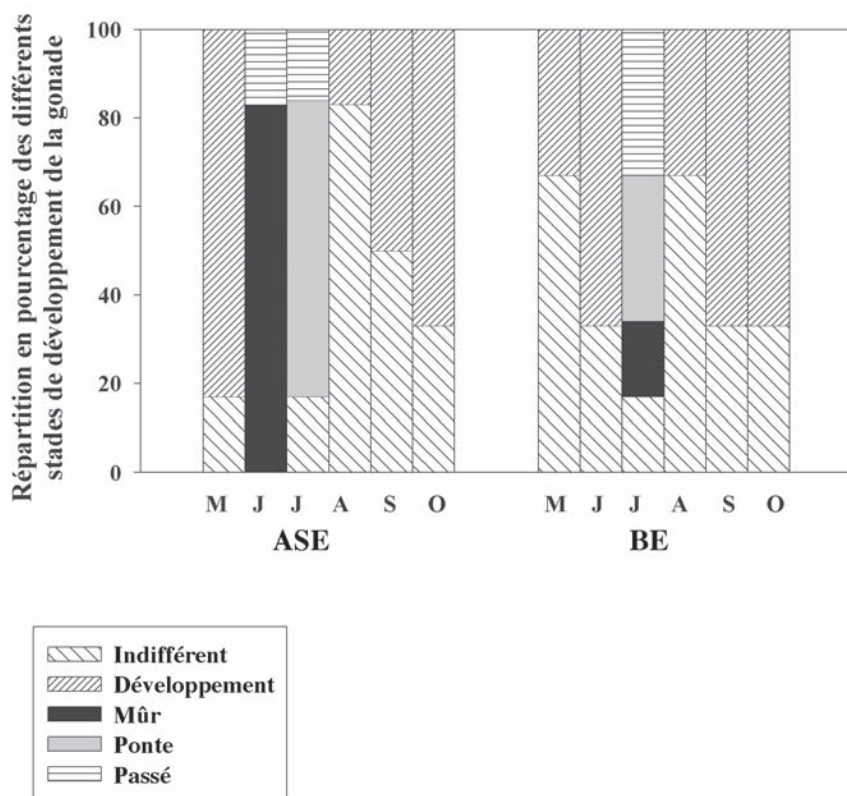
5.1.1. Relations entre les réserves énergétiques et la maturation des gamètes

Les résultats les plus probants de cette étude concernent la variation des réserves en glycogène de la gonade et le développement des gamètes. Comme le montre la figure 8.5, la maturation sexuelle des myes se déroule

au début de l'été aux deux sites d'échantillonnage avec des stades « mûrs » et des stades de « ponte » en juin et juillet au site de l'anse Saint-Étienne (ASE) et en juillet au site de la baie Éternité (BE). La maturation sexuelle présente cependant un retard de un mois pour les myes de BE et ce retard est concomitant avec l'observation de concentrations en glycogène de la gonade significativement plus élevées à ce site par rapport au site ASE (figure 8.6). La simultanéité de ces observations est cohérente dans l'hypothèse d'un retard de la remobilisation des réserves énergétiques de la gonade pour la gamétogenèse. Le glycogène est en effet une source de réserve majeure chez les bivalves durant la vitellogenèse et les variations saisonnières des concentrations en glycogène le montrent bien de mai à octobre, avec des concentrations les plus faibles durant le développement

Figure 8.5

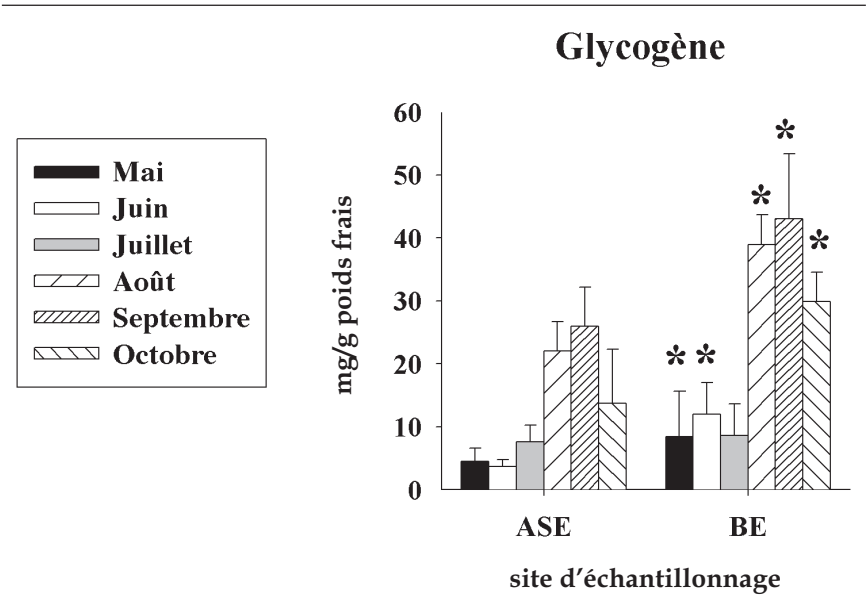
Profil des variations de la maturation sexuelle de *Mya arenaria* dans le fjord du Saguenay



des gamètes, puis une reconstitution des réserves à l’automne. Ce retard dans la vitellogenèse des myes du site BE a également été détecté avec le suivi saisonnier de la concentration en phosphore labile en milieu alcalin (ALP) déterminée dans l’hémolymphe des myes. Ce dosage des ALP permet en effet de déterminer indirectement des concentrations en protéines apparentées à la vitellogénine (Christensen *et al.*, 1999). Blaise *et al.* (1999) ont alors montré que la concentration en ALP était significativement inférieure dans l’hémolymphe des myes de BE au mois de mai par rapport aux myes échantillonnées le même mois au site ASE (figure 8.7). Chez les bivalves, de nombreux stéroïdes et neurohormones sont impliqués dans les mécanismes de remobilisation des réserves énergétiques (Mathieu, 1994). Il est à noter que chez *Crassostrea gigas*, le profil des concentrations en 17 β -œstradiol montre une augmentation de celles-ci durant la gamétogénèse et que l’augmentation du diamètre des ovocytes et de la concentration en vitelline de la gonade sont induites par le 17 β -œstradiol

Figure 8.6

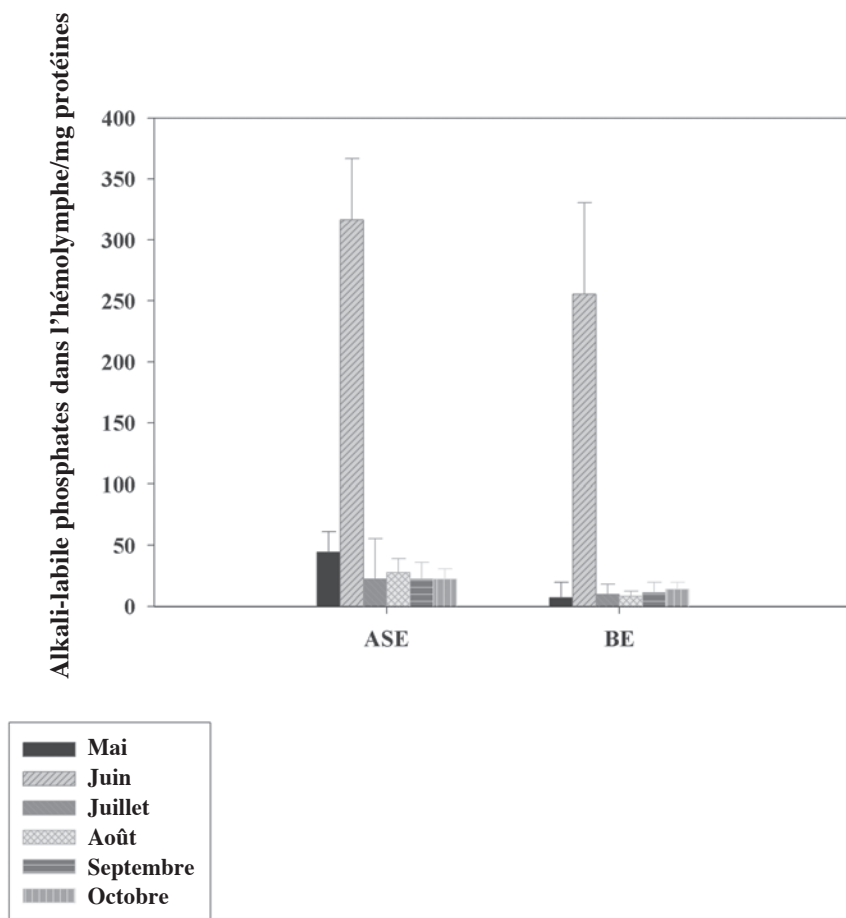
Profil saisonnier des variations des concentrations en glycogène de *Mya arenaria* dans le fjord du Saguenay



Les valeurs représentent les concentrations moyennes \pm SD. Un astérisque (*) montre une variation mensuelle significative par rapport au mois précédent ($p < 0,05$).

Figure 8.7

Profil des variations des concentrations en protéines apparentées aux vitellines dans l'hémolymphe de *Mya arenaria* dans le fjord du Saguenay



Les concentrations en protéines apparentées aux vitellines sont estimées par dosage indirect des phosphates labiles en milieu alcalin qui leur sont associés. Les valeurs représentent les concentrations moyennes \pm SD. Un astérisque (*) montre une variation mensuelle significative par rapport au mois précédent ($p < 0,05$).

(Matsumoto *et al.*, 1997 ; Li *et al.*, 1998). D'autre part, Blaise *et al.* (1999) ont également montré chez *Mya arenaria* une induction de la synthèse de protéines apparentées à la vitellogénine par le 17β -œstradiol, ce qui démontre une certaine induction de la vitellogenèse par le 17β -œstradiol,

même si d'autres signaux de nature neurohormonale pourraient contrôler l'action du stéroïde durant la gamétogenèse. Une perturbation de la vitellogenèse résultant d'une non-remobilisation du glycogène chez les myes échantillonnées au site BE du fjord du Saguenay pourrait alors être le résultat d'une exposition des myes à un perturbateur endocrinien.

5.2. EFFETS DU TRIBUTYLÉTAIN SUR LA REPRODUCTION DES MOLLUSQUES

Le cas du tributylétain (TBT) sur la population des mollusques marins est l'exemple typique d'un effet perturbateur sur la reproduction. Les organoétains et en particulier le tributylétain sont utilisés dans une diversité de produits industriels incluant les peintures antisalissures, les pesticides agricoles et les préservatifs de matériaux (Alzieu, 1991). Le TBT cause une diminution de la population des gastéropodes (Bryan et Gibbs, 1986) dont le potentiel reproducteur a subi des déficiences au contact de ce contaminant (Gibbs *et al.*, 1988). Les effets sur la reproduction et la croissance des huîtres reliés au TBT (Alzieu, 1991) ont conduit, en 1989, les autorités de l'Union européenne à prohiber l'utilisation du TBT sur les coques des bateaux dont la longueur est inférieure à 25 mètres (Morcillo et Porte, 1997). Malgré ces restrictions, la présence du TBT a été détectée dans l'environnement des zones côtières (Saint-Louis *et al.*, 1997). À de faibles concentrations en TBT (1 ng/l d'eau), il apparaît chez les femelles *Nucella lapillus* (gastéropode marin) une imposition du sexe mâle connue sous le nom d'effet « imposex » (Matthiessen et Gibbs, 1998). Au niveau moléculaire, plusieurs études convergent vers l'implication du TBT sur le niveau des hormones stéroïdiennes (Bettin *et al.*, 1996 ; Spooner *et al.*, 1991 ; Ronis et Masson, 1996 ; Morcillo *et al.*, 1998 ; Morcillo et Porte, 1997, 2000). Ces études montrent que le TBT entraîne une augmentation du niveau de la testostérone et une diminution du niveau de la progestérone et du 17 β -œstradiol (Spooner *et al.*, 1991). Néanmoins, d'après les résultats de Bettin *et al.* (1996) sur l'effet inhibiteur de l'aromatase par le TBT, cette inhibition n'explique pas la totalité des mécanismes par lesquels le TBT induit l'effet « imposex » chez les gastéropodes, ce qui laisse supposer que ce contaminant puisse intervenir sur d'autres voies de la stéroïdogenèse. Par exemple, l'administration de [^{14}C] testostérone radioactif à *Littorina littorea* est très faiblement éliminée (Ronis et Masson, 1996). Ces résultats supposeraient que le TBT entraîne une augmentation du niveau de la testostérone par inhibition des mécanismes qui interviennent sur son élimination (Ronis et Masson, 1996).

Chez le mollusque bivalve *Ruditapes decussata*, l'activité de la NADH réductase, enzyme clé dans le fonctionnement du système cytochrome P450 à fonction mixte, a subi 17 % d'inhibition après exposition des cellules

microsomales à 50 μ M en TBT (Morcillo et Porte, 1997). Les résultats des expériences réalisées sur des cultures cellulaires montrent une diminution du niveau des métabolites issus de la dégradation de la testostérone (Morcillo et Porte, 1997), alors qu'aucune variation du niveau de l'œstradiol n'a été observée. Par contre, le niveau de l'œstradiol diminue chez les bivalves exposés au laboratoire à différentes concentrations en TBT et la métabolisation de la testostérone ne semble pas affectée chez ces organismes (Morcillo et Porte, 1997). D'autre part, la transplantation de *R. decussata* dans une marina soumise à une contamination en TBT provoque un déséquilibre hormonal qui se traduit par une augmentation de la testostérone de 33 % et une diminution de l'œstradiol de cinq fois par rapport au contrôle (Morcillo et Porte, 2000). Malgré la controverse avec les observations *in vitro*, ces résultats semblent confirmer les travaux de contamination au laboratoire. Néanmoins, les auteurs soulignent l'importance des facteurs environnementaux et/ou d'autres composés xénobiotiques qui pourraient affecter le niveau des hormones sexuelles. Ainsi, il est nécessaire d'étudier la variation du niveau des hormones sexuelles et d'élucider leurs rôles au cours du cycle reproducteur chez les bivalves.

6. RÔLE DE LA PROGESTÉRONNE DANS LA MATURATION SEXUELLE : RÉSULTATS RÉCENTS

Dans le but de pouvoir prévenir et contrer les conséquences écologiques que peuvent induire les perturbateurs endocriniens chez ces espèces à la base du réseau trophique, il est nécessaire de valider des biomarqueurs capables, d'une part, de mettre en évidence l'exposition des animaux aux xénobiotiques et, d'autre part, de comprendre leurs effets sur les fonctions endocriniennes de l'organisme.

La reproduction, qui permet la pérennité de l'espèce, repose sur des mécanismes physiologiques régulés par les hormones sexuelles. Les principales études sur la synthèse des hormones stéroïdiennes et l'importance de leur rôle dans la reproduction ont été réalisées chez les vertébrés. Or, ce groupe représente moins de 5 % de la totalité des espèces animales (Barnes, 1968). Les hormones stéroïdiennes semblent bien conservées au cours de l'évolution, malgré quelques différences constatées chez quelques espèces de protostomes tels les crustacés, par exemple, qui utilisent des ecdystéroïdes comme régulateurs des processus de la reproduction (Charniaux-Cotton, 1985).

En se basant sur les effets des perturbateurs endocriniens chez les vertébrés (Guillette *et al.*, 2000) et sur la conservation de la structure moléculaire des stéroïdes au cours de l'évolution, notre étude s'intéresse :

- à la variation saisonnière de la progestérone au cours du cycle reproducteur chez *Mya arenaria* d'un site de référence ;
- à la comparaison du niveau de cette hormone avec celui des organismes d'un site soumis à une contamination d'origine anthropique tout en considérant la variation saisonnière.

Mya arenaria a été échantillonné à l'anse à l'Original (Parc provincial du Bic, Québec, Canada), considéré comme site de référence, et à Rimouski-Est (site contaminé), du mois de juillet à novembre 1998. Les individus d'une taille moyenne de $6,8 \pm 1,3$ cm ont été disséqués et pesés.

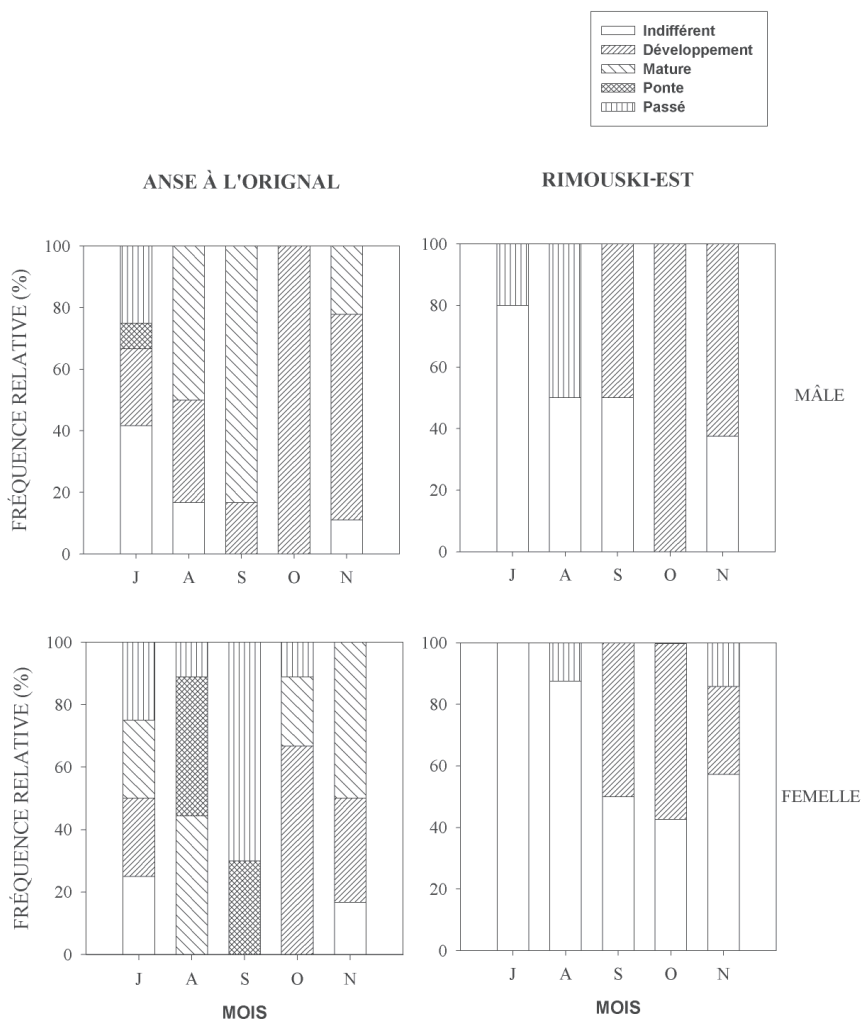
Pour mettre en évidence les différentes phases de développement de la gonade, nous avons procédé à des coupes histologiques sur la gonade et utilisé une technique de coloration pour déterminer les différents stades du cycle reproducteur au niveau de chaque mye (Gauthier-Clerc *et al.*, 1998). Le tissu est fixé dans une solution de Bouin avant de subir une succession de déshydratations dans des bains d'éthanol. L'inclusion est réalisée dans du métacrylate (JB-4 Embedding Kit). Des coupes de $3 \mu\text{m}$ ont été effectuées à l'aide d'un ultramicrotome de type Reichert-Jung 2050. Les coupes sont ensuite colorées au bleu de méthylène et à la fuchsine basique. L'observation des coupes a été effectuée sous microscope (Olympus BX50) au grossissement 250.

Le niveau de la progestérone dans la gonade a été quantifié par la technique ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) en utilisant un kit de Cayman Chemical (Progesterone Enzyme Immunoassay Kit). Les lectures ont été faites grâce à un lecteur de microplaque (Molecular Devices Vmax Kinetic Microplate Reader).

Les études histologiques, représentatives de l'état reproducteur des myes, relatent une forte activité gamétogénique au cours de la saison d'été (juillet-septembre) chez les myes de l'anse à l'Original. Au mois d'août 50 % des myes mâles échantillonnées sont au stade mature et 83 % en septembre (figure 8.8). Chez la femelle, en août, 44 % ont effectué la ponte et 70 % sont au stade passé en septembre. En octobre et novembre, on assiste à un redémarrage de la gamétogenèse qui se traduit par des stades de développement sexuel aussi bien chez les mâles que les femelles (figure 8.10). La période de maturation sexuelle est liée à une consommation en lipides gonadiques. Une partie de ces lipides pourrait être mobilisée comme précurseur à la synthèse de la progestérone. Au cours de notre étude, nous avons démontré la présence de la progestérone apparentée à celle des vertébrés par LC-MS dans la gonade chez *Mya arenaria*. Ainsi, nous avons utilisé la technique ELISA, qui fait intervenir des anticorps spécifiques à la progestérone. Nous observons un pic de la progestérone dans la gonade des myes de l'anse à l'Original au cours du mois

de septembre (5ng/g gonade, figure 8.9). Cette période est caractérisée par une forte activité gamétogénique qui se traduit par des stades de maturité sexuelle chez le mâle et des stades de ponte chez la femelle (figure 8.8). D'autre part, le profil de la progesterone est similaire pour les deux sexes (figure 8.9). Ceci laisse supposer que la progesterone joue

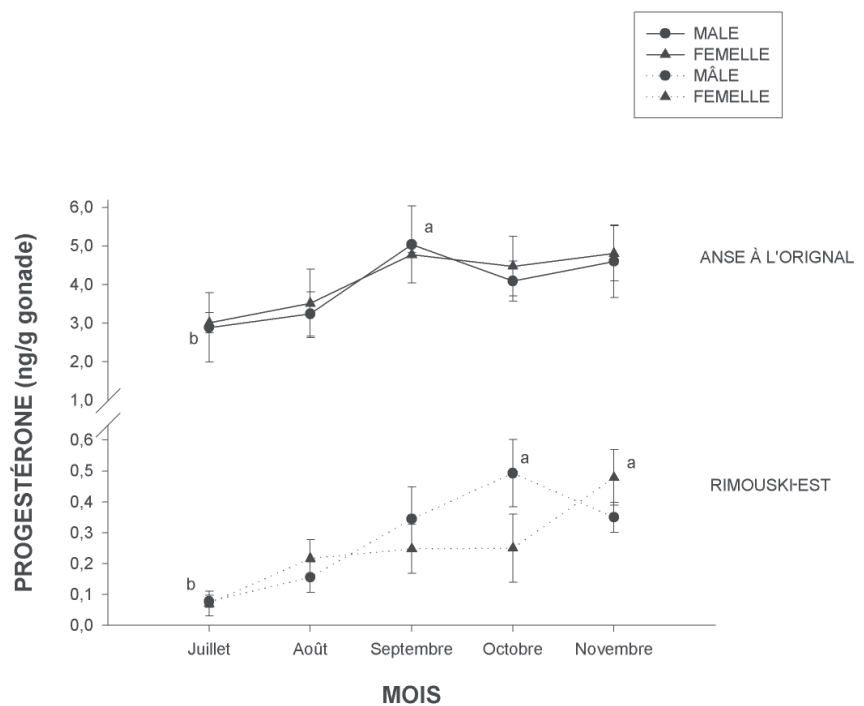
Figure 8.8
Fréquence des différents stades de maturation sexuelle chez *Mya arenaria*



Comparaison entre un site de référence (anse à l'Original) et un site portuaire (Rimouski-Est).

le même rôle chez la femelle et le mâle. Comparativement à nos résultats, la progestérone a été détectée chez les deux sexes de *Mytilus edulis* par Reis-Henriques *et al.* (1990). Le niveau de la progestérone (4ng/ g gonade) retrouvé chez *M. edulis* est similaire à nos résultats (5ng/ g gonade) ainsi que le pic de la progestérone qui a lieu au cours de la forte activité gamétogénique (Reis-Henriques et Coimbra, 1990). Comme Reis-Henriques et Coimbra (1990), nous croyons donc que la progestérone intervient dans la maturation sexuelle des myes comme régulateur hormonal. Néanmoins, les différences de maturation sexuelle observées entre les deux sexes ne peuvent s’expliquer par les niveaux de la progestérone. L’étude des hormones androgéniques (testostérone) et œstrogéniques (17 β -œstradiol) est nécessaire pour expliquer ces différences intersexes.

Figure 8.9
Profil de la progestérone chez *Mya arenaria*



Mâle (cercle); femelle (triangle); anse à l’Original (trait plein); Rimouski-Est (pointillé). Les valeurs représentent les concentrations moyennes \pm SE. a est significativement différent de b ($p < 0,05$).

Chez les myes de Rimouski-Est, les résultats histologiques nous montrent que les gonades n'ont pas atteint leur maturité sexuelle au cours de notre période d'échantillonnage (figure 8.8). Au cours de la saison d'été (juillet-septembre), les gonades mâles et femelles sont au stade passé et indifférencié alors qu'on assiste à un développement des cellules germinales mâles et femelles en octobre (100 % et 57,4 % respectivement) et en novembre (figure 8.8). Le développement des cellules germinales semblerait stimulé par la progestérone puisqu'on observe un pic de la progestérone au mois d'octobre (figure 8.9) dans la gonade des myes de Rimouski-Est. D'autre part, le niveau de la progestérone mesuré chez les myes de Rimouski-Est est huit fois inférieur à celui de l'anse à l'Original (figure 8.9). Ainsi, nous pouvons supposer que la faible activité gamétogénique observée à partir des études histologiques chez les organismes de Rimouski-Est semble liée aux faibles concentrations en progestérone mesurées dans la gonade de ces myes.

La première étape de la production des hormones stéroïdiennes concerne la conversion du cholestérol en prégnenolone grâce au cytochrome P450 C_{27sc}. À son tour, la prégnenolone est ensuite utilisée comme précurseur par la 3 β -HSD pour la synthèse de la progestérone. Les perturbateurs endocriniens peuvent affecter la stéroïdogénèse en diminuant la disponibilité du cholestérol au cytochrome P450sc dans la mitochondrie et/ou en réduisant l'activité de cette enzyme (Crain *et al.*, 1999). Cette étape joue un rôle clé dans la production de la progestérone dans les gonades. Par exemple, la dioxine inhibe la stéroïdogénèse chez le rat en empêchant la mobilisation du cholestérol au cytochrome P450, donc en réduisant la synthèse des hormones sexuelles (Moore *et al.*, 1991). Les xénobiotiques peuvent exercer leur effet directement sur l'activité des enzymes de la stéroïdogénèse et entraîner une diminution du niveau des hormones sexuelles (Kapur *et al.*, 1978). Singh et Singh (1992) ont observé une diminution du niveau de la 17 α -hydroxyprogestérone, de la testostérone et du 17 β -œstradiol à la suite d'une contamination des poissons-chats d'eau douce (*Heteropneustes fossilis*) aux pesticides organophosphorés (malathion) et organochlorés (γ -BHC). Ces composés inhiberaient probablement l'activité de l'aromatase ou entraveraient la sécrétion des gonadotrophines qui stimulent la stéroïdogénèse (Singh et Singh, 1992).

D'autre part, les effets des contaminants sur le niveau des hormones sexuelles peuvent avoir lieu de manière indirecte par stimulation des systèmes de détoxification tels que l'activité des oxygénases à fonction mixte (MFO). Des études réalisées sur l'impact des effluents d'usine de pâte kraft blanchie (BKME) sur la population de poissons benthiques meuniers noirs du lac Supérieur (*Catostomus commersoni*) ont montré une diminution du niveau de la 17 α ,20 β -dihydroxyprogestérone chez les deux sexes (Munkittrick *et al.*, 1992). Dans cette étude, les organismes présen-

tent une forte activité des MFO qui, outre leur action de conjugaison et d'élimination des xénobiotiques, sont capables de métaboliser les hormones stéroïdiennes (Waxman, 1996). Une autre espèce de meunier (*Catostomus catostomus*) et les corégones (*Coregonus clupeaformis*) de la baie Jackfish exposés aux BKME présentent les mêmes effets, mais à des amplitudes différentes (Munkittrick *et al.*, 1992). Ces résultats suggèrent que l'activité des isoenzymes du système MFO serait augmentée en présence de contaminants issus des BKME, ce qui entraînerait une diminution du niveau des hormones stéroïdiennes (McMaster *et al.*, 1991). Dans le même sens, plusieurs autres études ont montré le lien entre l'augmentation de l'activité du système des MFO et la diminution du niveau des hormones stéroïdiennes suite à une exposition aux BPC et aux HAP (Sivarajah *et al.*, 1978 ; Spies *et al.*, 1988).

Le site de Rimouski-Est, situé à proximité du port de Rimouski, est propice à une forte contamination, notamment en tributylétain (TBT). Les études de Saint-Louis *et al.* (1997) ont montré la présence du TBT dans les sédiments et les moules échantillonnés à proximité de ce port. Le mécanisme d'action du TBT au niveau hormonal n'est pas totalement élucidé, mais il semblerait intervenir comme inhibiteur de l'activité des cytochromes P450. Cependant, les études de Morcillo et Porte chez *Ruditapes decussata* (Morcillo et Porte, 1997, 2000 ; Morcillo *et al.*, 1998) montrent que l'action du TBT sur le système cytochrome P450 n'est pas dirigée sur une isoenzyme spécifique du système.

Cette étude met en relief, pour la première fois chez *Mya arenaria*, le rôle de régulateur hormonal de la progestérone sur son cycle reproducteur et, d'autre part, la caractérisation d'un site contaminé par une approche endocrinologique. Nos résultats montrent que le niveau de la progestérone chez les myes de Rimouski-Est est très faible comparativement aux myes de l'anse à l'Original. Cependant, il reste à élucider quels sont les facteurs qui interviennent dans cette perturbation et par quel mécanisme ils agissent. Ainsi, pour mieux comprendre l'action des perturbateurs endocriniens sur le niveau des hormones sexuelles, il est nécessaire d'effectuer des études en milieu contrôlé pour pouvoir discriminer entre l'effet du ou des contaminants et celui des facteurs environnementaux naturels.

7. EFFETS DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS SUR L'ENZYME ASPARTATE TRANSCARBAMYLASE

7.1. CAS DU TRIBUTYLÉTAIN (TBT)

L'effet du tributylétain (TBT) sur l'aspartate transcarbamylase n'a pas encore été démontré. Cependant, il est connu que le TBT et ses sous-produits de dégradation peuvent se lier aux ligands cellulaires des sites

actifs des protéines enzymatiques. La toxicité cellulaire du TBT se manifesterait par l'interaction de ce xénobiotique avec les groupes thiol (SH) des protéines à pouvoir catalytique, c'est-à-dire les enzymes (Tseng et Cooney, 1995).

7.1.1. Résultats récents sur l'ATCase chez *Mya arenaria*

Nous avons entrepris de caractériser l'ATCase gonadique et d'évaluer l'action du TBT sur l'activité de cette enzyme chez le mollusque bivalve *Mya arenaria*.

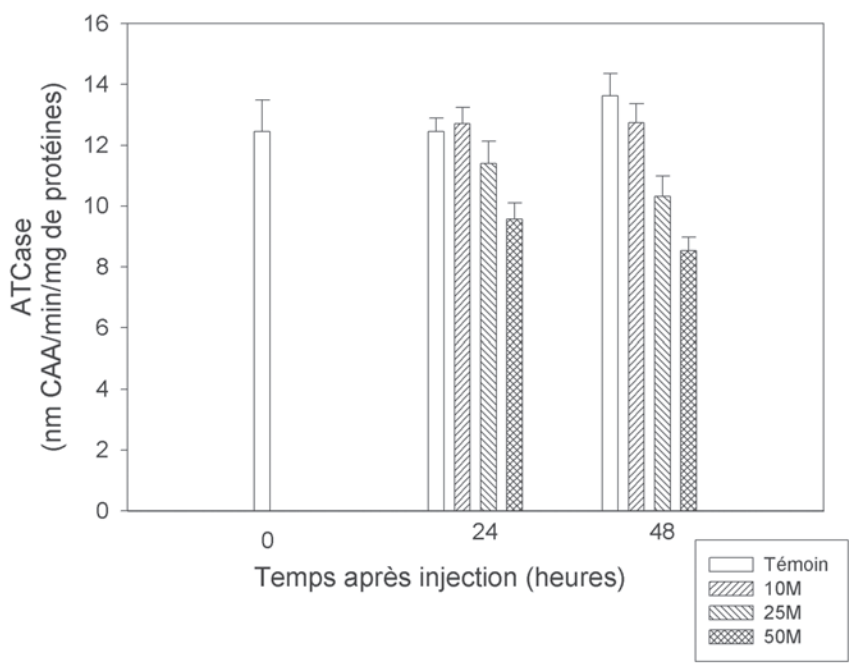
L'activité de l'ATCase est mesurée qualitativement avec la méthode colorimétrique (Le Maire *et al.*, 1990), technique basée sur la quantification des composés uréiques (Prescott et Jones, 1969). Ainsi, 15 individus de taille de $73,44 \pm 9,74$ mm ont été prélevés au mois d'août 1999 dans la zone intertidale de l'anse à l'Original, située dans le Parc provincial du Bic et considérée comme peu contaminée, sur la rive sud de l'estuaire maritime du Saint-Laurent ($48^{\circ} 21' N$; $68^{\circ} 47' W$). Les résultats (Etchian et Pellerin, 2003) ont démontré que l'entreposage des échantillons de gonade à $-80^{\circ} C$ réduit l'altération de l'enzyme comparativement aux échantillons entreposés à $-20^{\circ} C$. Nos résultats ont aussi démontré que l'ATCase gonadique de *Mya arenaria* avait un pH optimum de 9,2 et une température optimale et $37^{\circ} C$. Un dosage de cette enzyme nécessite une durée d'incubation de 60 minutes, une concentration en enzyme variant entre 1 et 2 mg/ml de protéines, et enfin 10 mM en aspartate et en carbamylphosphate. Des solvants comme le DMSO et le DMF ont un effet stimulateur de l'activité de l'ATCase; par contre, aucun effet n'est décelé avec l'éthanol. L'inhibition de l'activité de cette enzyme par les métaux comme le sulfate de cuivre et le para-hydroxymercuribenzoate (PHMB) est en accord avec la présence de groupements SH au sein de l'enzyme démontrée chez certains mollusques comme *Mytilus edulis* (Mathieu, 1985) et *Sepia officinalis* (Koueta *et al.*, 1987).

Afin de mettre en évidence l'effet du TBT sur l'activité de cette enzyme, nous avons aussi échantillonné des myes au niveau du site de l'anse à l'Original en septembre 1999. Les individus ont été maintenus dans 4 aquariums à la Station aquicole de l'ISMER de Pointe-au-Père à raison de 24 individus par aquarium. Après plusieurs jours d'acclimatation, les animaux sont contaminés avec du TBT via le muscle adducteur. Les concentrations de TBT utilisées sont respectivement de 10, 25 et $50 \mu M$ (Fent et Stegeman, 1993); on utilise l'éthanol comme solvant et la dose est de $1 \mu l/g$ masse totale humide. L'expérience a duré 48 heures avec un échantillonnage de 6 individus toutes les 24 heures après injection. Les individus sont ensuite disséqués et les échantillons de gonade sont prélevés et entreposés à $-80^{\circ} C$ en attendant le dosage de l'ATCase.

Nos résultats ont démontré un effet inhibiteur du TBT sur l'activité de l'ATCase gonadique de *Mya arenaria* via une contamination du muscle adducteur (figure 8.10). Cet effet perturbateur de l'activité de l'enzyme est plus prononcé 48 heures après l'injection de concentrations plus élevées en TBT.

Les mécanismes d'action des métaux sur l'activité des enzymes sont rapportés dans la littérature (Viarengo, 1989 ; White *et al.*, 1999). La perturbation de l'activité des enzymes est due à un blocage des groupements fonctionnels des chaînes protéiques. Les chaînes protéiques de certaines enzymes sont coordonnées par un métal, comme c'est le cas pour l'ATCase (Le Maire *et al.*, 1990). Ainsi, la substitution de ce métal par un autre provoque un changement de la conformation de l'enzyme et est une des causes de la perte de son activité catalytique. Cette modification de la conformation de l'enzyme est souvent attribuée à une libération du métal stabilisant la conformation de la molécule protéique, qui disjoint l'enzyme en sous-unités régulatrices et catalytiques. À cause de la forte affinité des

Figure 8.10
Influence du TBT sur l'activité de l'ATCase gonadique de *Mya arenaria*



groupements thiols pour les métaux, 10 000 fois plus importante que pour les autres ligands cellulaires (Viarengo, 1989), l'inhibition de l'ATCase par le TBT pourrait donc être attribuée à la présence de groupements SH localisés sur le site actif de cette enzyme.

7.1.2. Les acquis

L'aspartate transcarbamylase (ATCase) est une enzyme qui joue un rôle important au cours des divisions cellulaires. Or, il est connu que l'activité de l'ATCase augmente de façon simultanée avec l'activité des enzymes comme la phosphatase alcaline, l'aldolase désoxyribosephosphate, la thymidine kinase et l'ADN polymérase au cours des divisions cellulaires. Or l'activité de l'ATCase associée aux mitoses (Koueta et Boucaud-Camou, 1991) est intimement corrélée à la maturation sexuelle chez *Mytilus edulis* (Mathieu *et al.*, 1982) et *Sepia officinalis* (Koueta et Boucaud-Camou, 1992). La modification de l'activité de cette enzyme par le TBT pourrait entraîner une perturbation du cycle de la reproduction chez ces invertébrés.

D'après les travaux de Koueta et Boucaud-Camou (1992), l'activité ATCase est sous un contrôle hormonal via un facteur localisé au niveau de la glande optique chez la seiche *Sepia officinalis*. Récemment, Pazos et Mathieu (1999) ont détecté dans les gonades de la moule des hormones stimulant la synthèse de l'ADN de la gonade, suggérant ainsi une action hormonale par l'intermédiaire des neuropeptides sur la maturation sexuelle (Motavkine et Varaskine, 1989). Des recherches devraient être entreprises afin de préciser si une perturbation de l'activité de l'ATCase par un perturbateur endocrinien comme le TBT n'était pas due à un dysfonctionnement hormonal contrôlant l'activité de cette enzyme.

Avant de proposer une perturbation de l'activité de l'ATCase comme signal cellulaire de stress attribué à la présence de TBT en milieu marin, une étude à long terme de l'effet de ce xénobiotique sur l'activité de l'ATCase doit être envisagée. Dans le cadre de notre étude, une mesure quantitative de cette enzyme est la bienvenue. Il s'agirait de tester une autre technique, soit la technique ELISA.

8. PERSPECTIVES

8.1. L'INTÉGRATION DE SIGNAUX MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES

Nous pouvons suggérer maintenant un premier ensemble de biomarqueurs au niveau moléculaire, comme la mesure du stress oxydant occasionné par la surproduction de radicaux libres de l'oxygène, en réponse aux stress du milieu, dont la présence de contaminants. Une nouvelle tendance émerge actuellement pour suggérer l'utilisation des différentes

capacités de défense antioxydantes comme signal intégrateur chez les bivalves (TOSC : *total oxyradical scavenging capacity*, développé par Regoli, 2000). De plus, les mesures des activités catalasiques et des glutathione-*S*-transférases seront utiles pour estimer avec exactitude les effets des variations des facteurs du milieu (température, hydrodynamisme, concentrations en phytoplancton lorsque ces conditions sont limitantes), et constituent un signal précoce de perturbations plus importantes, telles les diminutions de réserves énergétiques et, conséquemment, du processus de reproduction des bivalves. Les réponses moléculaires reliées aux processus oxydants peuvent être corrélées aux réponses cellulaires conduisant à la déstabilisation de la membrane lysosomale, lesquelles peuvent être indicatrices de dommages physiologiques plus fonctionnels, tels une cytophagie par protéolyse, et une utilisation rapide des réserves énergétiques pour contrer les effets chroniques d'un stress. Pour estimer des dommages potentiels au niveau de la population, des études de la croissance des individus et de paramètres fonctionnels reliés à la reproduction s'avèrent essentielles pour en déterminer la signification physiologique.

8.2. UTILISATION DE *MYA ARENARIA* COMME ORGANISME SENTINELLE DANS LE CAS D'EXPOSITION À DES XÉNO-ŒSTROGÈNES

Les relations entre l'activité œstrogénique chez les bivalves et l'induction de la vitellogenèse par le 17 α -œstradiol nous permettent de penser que les myes seraient exposées à des contaminants anti-œstrogéniques dans la partie amont du fjord du Saguenay (Gauthier-Clerc *et al.*, 2002). Des effets anti-œstrogéniques impliquant le potentiel reproducteur d'une espèce ont déjà été décrits *in situ* chez le meunier noir exposé aux effluents d'usine de pâtes et papiers (Munkittrick *et al.*, 1994). L'induction du cytochrome P450 était alors la cause d'un dérèglement de la stéroïdogénèse et des processus contrôlés par les stéroïdes. Chez *Mya arenaria*, l'implication des stéroïdes sur la maturation sexuelle semble effective, d'après la variation des concentrations en progestérone décrite dans la gonade par Siah *et al.* (2002). De plus, il est reconnu que la perturbation de l'activité du cytochrome P450 chez de nombreux mollusques exposés au TBT engendre un dysfonctionnement de la stéroïdogénèse responsable de l'effet « imposex » (Oberdörster et Cheek, 2001). Les myes de la partie amont du fjord étant soumises à une contamination diffuse mais toujours actuelles aux HAP (White *et al.*, 1998) et à des métaux, notamment le Cd (Desbos, 1999), la perturbation de la vitellogenèse en 1997 pourrait résulter de l'exposition à des contaminants anti-œstrogéniques tels que le Cd (Thomas, 1988).

Des dosages de protéines apparentées aux vitellines entrepris dans notre laboratoire avec un anticorps anti-vitelline de pétoncle décrivent la présence d'un précurseur de la vitelline dont les concentrations varient avec le degré de maturité des gamètes. Ce précurseur ne semble pas présent naturellement dans la gonade des mâles ni même après une exposition *in vivo* à différentes concentrations de 17β -œstradiol. Un certain manque de spécificité des anticorps anti-vitelline de pétoncle rappelle cependant la difficulté d'un dosage par ELISA inter-espèce et de plus amples investigations devront encore porter leurs fruits pour valider l'utilisation des protéines apparentées aux vitellines chez *Mya arenaria* comme biomarqueur d'exposition à des perturbateurs endocriniens de même que pour décrire ses limites d'utilisation sur le terrain. À l'heure actuelle, les efforts méthodologiques s'orientent d'ailleurs vers l'utilisation systématique d'anticorps antivitellogénine chez les organismes ovipares pour des dosages rapides par ELISA (Denslow *et al.*, 1999), voire vers la recherche d'un anticorps universel (Heppell *et al.*, 1995).

9. CONCLUSION

L'état d'avancement des travaux entrepris dans notre laboratoire démontre l'importance d'une meilleure compréhension des processus et des mécanismes de régulation de la stéroïdogénèse et de la vitellogénèse chez les bivalves marins. Nous avons maintenant démontré la présence de progestérone dans la gonade de myes et, tout récemment, de testostérone. La caractérisation de ces deux hormones par LC-MS montre l'homologie de structure avec les hormones de vertébrés. Par contre, leur rôle et la modulation de leurs actions sur la maturation sexuelle est loin d'être clair. Les stéroïdes semblent participer au contrôle de la maturation sexuelle avec une importance qui fut souvent sous-estimée chez les mollusques, jusqu'à l'observation de l'effet « imposex » chez les gastéropodes. Plusieurs travaux dans les années 1990 ont relaté l'importance des amines telles la sérotonine et la dopamine pour le contrôle de la ponte chez les invertébrés marins. D'autres amines et peptides sont situés dans les ganglions nerveux et la question reste ouverte quant à leur rôle comme modulateur de la synthèse, voire de la sécrétion des stéroïdes sexuels. Les protéines apparentées aux vitellines sont-elles la cible des amines, en assurent-elles la régulation? Même si cette question reste encore sans réponse, il nous semble que les vitellines peuvent présenter un potentiel comme biomarqueur d'exposition à des xéno-œstrogènes. Différents travaux ont démontré leur inductibilité par le 17β -œstradiol et le nonylphénol de même que leur capacité de discriminer deux sites d'échantillonnage dans le Saguenay (Blaise *et al.*, 1999), tout en corroborant l'évaluation de la maturation sexuelle des myes avec l'histologie (Gauthier-Clerc *et al.*, 2002).

La présence de contaminants à potentiel endocrine en milieu marin interpelle autant nos connaissances fondamentales sur la reproduction d'espèces constantes des écosystèmes côtiers marins que les connaissances des mécanismes d'actions de ces contaminants sur les systèmes enzymatiques, la gamétogenèse et la capacité de résistance au stress. Toutefois, avant de maîtriser tous ces mécanismes et effets des contaminations, l'utilisation de plusieurs mesures physiologiques et/ou biochimiques s'avère une position de repli de choix pour estimer les dommages cellulaires et moléculaires. L'utilisation des mesures de l'activité de l'ATCase associée aux profils hormonaux et de maturation sexuelle est donc requise actuellement, tout au moins pour identifier les dysfonctionnements de la reproduction.

RÉFÉRENCES

- ALLEN, Y., A.P. SCOTT, P. MATTHIESSEN, S. HAWORTH, J.E. THAIN et S. FEIST (1999). « Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder, *Platichthys flesus* », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 18, n° 8, p. 1791-1800.
- ALZIEU, C. (1991). « Environmental problems caused by TBT in France : Assessment, regulation prospects », *Marine Environmental Research*, vol. 32, p. 7-17.
- ASHFIELD, L., T.G. POTTINGER et J.P. SUMPTER (1998). « Exposure of female juvenile rainbow trout to alkylphenol compounds results in modifications to growth and ovosomatic index », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 17, n° 3, p. 679-686.
- BARBEAU, C., R. BOUGIE et J.E. CÔTÉ (1981). « Temporal and spatial variations of mercury, lead, zinc and copper in sediments of the Saguenay fjord », *Canadian Journal of Earth Sciences*, vol. 18, p. 1065-1074.
- BARNES, R.D. (1968). *Invertebrate Zoology*, Philadelphie, Saunders, p. 1-4.
- BENAHMED, M., C. DELLAMONICA, F. HAOUR et J.M. SAEZ (1981). « Specific low density lipoprotein receptors in pig Leydig cells. Role of this lipoprotein in cultured Leydig cells steroidogenesis », *Biochemistry and Biophysics Research Communication*, vol. 99, p. 1123-1130.
- BENNETT, E.R. et C.D. METCALFE (2000). « Distribution of degradation products of alkylphenol ethoxylates near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, North America », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 19, n° 4, p. 784-792.
- BENNIE, D.T., C.A. SULLIVAN, H.B. LEE, T.E. PEART et R.J. MAGUIRE (1997). « Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes and the upper St. Lawrence River », *The Science of the Total Environment*, vol. 193, p. 263-275.
- BERGERON, J.P. et A.M. ALAYSE-DANET (1981). « Aspartate transcarbamylase de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* L. (mollusque lamellibranche) : méthode de dosage et variations de l'activité dans le manteau et la gonade », *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 50, p. 99-117.
- BETTIN, C., J. OEHLMANN et E. STROBEN (1996). « TBT induced imposex in marine neogastropods is mediated by increasing androgen level », *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, vol. 50, p. 299-317.
- BIEGALA, I.C. et R.P. HARRIS (1999). « Sources of seasonal variability in mesozooplankton aspartate transcarbamylase activity in coastal waters off Plymouth, UK », *Journal of Plankton Research*, vol. 21, n° 11, p. 2085-2103.
- BIEGALA, I.C., R.P. HARRIS et J.P. BERGERON (1999). « ATCase activity, RNA:DNA, gonad development stage, and egg production in the female copepod *Calanus helgolandicus* », *Marine Biology*, vol. 135, p. 1-10.
- BILLIGHURST, Z., A.S. CLARE, K. MATSUMURA et M.H. DEPLEDGE (2000). « Induction of cypris major protein in barnacle larvae by exposure to 4-n-nonylphenol and 17 β -oestradiol », *Aquatic Toxicology*, vol. 47, p. 203-212.
- BLACKBURN, M.A., S.J. KIRBY et M.J. WAL (1999). « Concentrations of alkylphenol polyethoxylates entering UK », *Marine Pollution Bulletin*, vol. 38, n° 2, p. 109-118.
- BLAISE C., J. PELLERIN-MASSICOTTE et P.D. HANSEN (1996). « Molluscan shellfish biomarker study of the Saguenay fjord », *Secotox*, Metz, France, 27-28 août.
- BLAISE, C., F. GAGNÉ, J. PELLERIN et P.D. HANSEN (1999). « Determination of vitellogenin-like properties in *Mya arenaria* hemolymph (Saguenay Fjord, Canada) : A potential biomarker for endocrine disruption », *Environmental Toxicology*, vol. 14, n° 5, p. 455-465.
- BOUCHARD, N., É. PELLETIER et M. FOURNIER (1999). « Effects of butyltin compounds on phagocytic activity of hemocytes from three marine bivalves », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 18, p. 519-522.

- BOURASSA, L. (1990). *Variations de mesures physiologiques chez Mya arenaria (bivalve : Mollusca) en zone intertidale, dans l'estuaire maritime du Saint-Laurent*, mémoire de maîtrise en océanographie à l'Université du Québec à Rimouski, 85 p.
- BRADBURY, S.P., O.G. MEKENYAN et G.T. ANKLEY (1996). « Quantification structure-activity relationships for polychlorinated hydroxybiphenyl estrogen receptor binding affinity : An assessment of conformer flexibility », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 15, n° 11, p. 1945-1954.
- BRYAN, G.W., P.E. GIBBS, L.G. HUMMERSTONE et G.R. BURT (1986). « The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around south-west England : Evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints », *Journal of the Marine Biological Association (United Kingdom)*, vol. 66, p. 611-640.
- CHANG, C.F. et T.W. SHIH (1995). « Reproductive cycle of ovarian development and vitellogenin profiles in the freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* », *Invertebrate Reproduction and Development*, vol. 27, n° 1, p. 11-20.
- CHARNIAUX-COTTON, H. (1985). « Vitellogenesis and its control in malacostracan crustacean ». *American Zoology*, vol. 25, 197-206.
- CHENEY, M.A., R. FIORILLO et R.S. CRIDDLE (1997). « Herbicide and estrogen effects on the metabolic activity of *Ellipsio complanata* measured by calorespirometry », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 118C, n° 2, p. 159-164.
- CHRISTENSEN L.J., K.B. KORSGAARD et P. BJERREGAARD (1999). « The effect of 4-nonylphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder *Platichthys flesus*. », *Aquatic Toxicology*, vol. 46, p. 211-219.
- CLARK, B.J., J. WELL, S.R. KING et D.M. STOCO (1994). « The purification, cloning and expression of a novel LH-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells : Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, p. 28314-28322.
- COLBORN, T. et C. CLEMENT (1992). « Chemically-induced alterations in sexual and functional development : The wildlife/human connection », *Advances in Modern Environmental Toxicology*, vol. 21, Princeton, NJ, Princeton Scientific Publishing.
- COSSU, C., A. DOYOTTE, M.-C. JACQUIN et P. VASSEUR (1997). « Mécanismes de formation et effets des espèces réactives de l'oxygène », dans L. Lagadic et al. (dir.), *Biomarqueurs en écotoxicologie*, Paris, Masson, p. 125-148.
- COUILLARD, C.M. et P. NELLIS (1999). « Organochlorine contaminants in mummichog (*Fundulus heteroclitus*) living downstream from a bleached-kraft pulp mill in the Miramichi Estuary, New Brunswick, Canada », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 18, p. 2545-2556.
- CRAIN, D.A. et J.L. GUILLETTE JR. (1997). « Endocrine-disrupting contaminants and reproduction in vertebrate wildlife », *Reviews in Toxicology*, vol. 1, p. 47-90.
- CRAIN, D.A., A.A. ROONEY, E.F. ORLANDO et L.J.J. GUILLETTE (1999). « Endocrine disrupting contaminants and hormone dynamics : Lessons from wildlife », dans L.J.Jr. Guillette, et D.A. Crain (dir.), *Environmental Endocrine Disrupters : An Evolutionary Perspective*, New York, Taylor and Francis, p. 1-21.
- DE LONCAMP, D., P. LUBET et M. DROWSKI (1974). « The *in vitro* biosynthesis of steroids by the gonad of the mussel (*Mytilus edulis*) », *General and Comparative Endocrinology*, vol. 22, p. 116-127.
- DENSLow, D.D., M.C. CHOW, K.J. KROLL et L. GREEN (1999). « Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics », *Ecotoxicology*, vol. 8, p. 385-398.
- DEPLEDGE, M.H. (1994). « The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools », dans M.C. Fossi et C. Leonzio (dir.), *Nondestructive Biomarkers in Invertebrates*, Boca Raton, FL, Lewis, p. 261-285.
- DERIDOVITCH, I.I. et O.V. REUNOVA (1993). « Prostaglandins : Reproduction control in bivalve molluscs », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 104A, n° 1, p. 23-27.

- DESBOS, L. (1999). « Étude de la contamination par les métaux lourds (Cd, Cu, Zn) d'un mollusque bivalve estuarien (*Mya arenaria*) en fonction de paramètres naturels et anthropiques. Relation avec un biomarqueur d'exposition : la métallothionéine », mémoire de DEA, Université de Metz.
- DIN Z.B. et A. AHAMAD (1995). « Changes in the scope for growth of blood cockles (*Anadara granosa*) exposed to industrial discharge », *Marine Pollution*, vol. 43, n° 1, p. 406-410.
- DONOHUE, R.M. et L.R. CURTIS (1996). « Estrogenic activity of chlordecone, *o,p'*-DDT and *o,p'*-DDE in juvenile rainbow trout : Induction of vitellogenesis and interaction with the hepatic estrogen binding sites », *Aquatic Toxicology*, vol. 36, p. 31-52.
- DREZE, V., G. MONOD, J.-P. CRAVEDI, S. BIAGIANTI-RISBOURG et F. LE GAC (2000). « Effects of 4-nonylphenol on sex differentiation and puberty in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) », *Ecotoxicology*, vol. 9, p. 93-103.
- DUAX, W.L. et J.P. GRIFFIN (1985). « Structure-activity relationships of estrogenic chemicals », dans J.A. Mc Lachlan (dir.), *Estrogens in the Environment II. Influence on Development*, New York, Elsevier, p. 13-21.
- ECKELBARGER, K.J. et C.V. DAVIS (1996). « Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. I. Ovary and oogenesis », *Marine Biology*, vol. 127, p. 79-87.
- EKELUND, R., Å. BERGMAN, Å. GRANMO et M. BERGGREN (1990). « Bioaccumulation of 4-nonylphenol in marine animals: A re-evaluation », *Environmental Pollution*, vol. 64, p. 107-120.
- EMMERSEN, B.K. et I.M. PETERSEN (1976). « Natural occurrence, and experimental induction by estradiol-17 β of a lipophosphoprotein (vitellogenin) in flounder (*Platichthys flesus*, L.) », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 54B, p. 443-446.
- ERICKSON, M.C. et D.P. SELIVONCHICK (1987). « A comparison of aspartate transcarbamylase activity in juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 88B, n° 1, p. 369-373.
- FENT, K. et J.J. STEGEMAN (1993). « Effects of tributyltin in vivo on hepatic cytochrome P450 forms in marine fish », *Aquatic Toxicology*, vol. 24, n°s 3-4, p. 219-240.
- FINKEL, T. et N.J. HOLBROOK (2000). « Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing », *Nature*, vol. 408, p. 239-247.
- FLOURIOT, G., F. PAKDEL, B. DUCOURET et Y. VALOTAIRE (1995). « Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression », *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 15, p. 143-151.
- FOLMAR, L.C., N.D. DENSLOW, V. RAO, M. CHOW, D.A. CRAIN, J. ENBLUM, J. MARCINO et L.J. GUILLETTE JR (1996). « Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentration in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant », *Environmental Health Perspectives*, vol. 104, n° 10, p. 1096-1101.
- GAGNÉ, F. et C. BLAISE (1998). « Estrogenic properties of municipal and industrial wastewaters evaluated with a rapid and sensitive chemoluminescent *in situ* hybridization assay (CISH) in rainbow trout hepatocytes », *Aquatic Toxicology*, vol. 44, p. 83-91.
- GAGNÉ, F., C. BLAISE, J. PELLERIN et S. GAUTHIER-CLERC (2002). « Alteration of the biochemical properties of female gonads and vitellins in the clam *Mya arenaria* at contaminated sites in the Saguenay Fjord », *Marine Environmental Research*, vol. 53, p. 295-310.
- GASNIER, F. (1999). « Stéroïdogenèse dans les cellules de Leydig », dans S. Hamamah, E. Saliba, M. Benahmed et F. Gold (dir.), *Médecine et biologie de la reproduction*, Paris, Masson, p. 70-85.
- GAUTHIER-CLERC, S., J. PELLERIN et C. BLAISE (1998). « Étude diagnostique de la condition physiologique et du potentiel reproducteur de *Mya arenaria* (mollusque bivalve endobenthique) exposée à la contamination du fjord du Saguenay », *Canadian Technical Reports - Halieutic and Aquatic Sciences*, vol. 2260, p. 96-97.

- GAUTHIER-CLERC, S., J. PELLERIN, C. BLAISE et F. GAGNÉ (2002). « Delayed gametogenesis of *Mya arenaria* in the Saguenay fjord (Canada): A consequence of endocrine disruptors? », *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, vol. 131, n° 4, p. 457-467.
- GIBBS P.E., P.L. PASCOE et G.R. BURT (1988). « Sex change in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, induces by tributyltin from antifouling paints », *Journal Marine Biological Association (United Kingdom)*, vol. 68, p. 715-731.
- GILLESBY, B.E. et T.R. ZACHAREWSKI (1998). « Exoestrogens: Mechanisms of action and strategies for identification and assessment », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 17, n°s 1-2, p. 3-14.
- GINET A. (1996). « Corrélation entre différents biomarqueurs (immunocompétence et réserves énergétiques) pour évaluer le degré de sensibilité de *Mya arenaria* (Mollusca bivalvia) exposée à une pollution diffuse et multiple dans le fjord du Saguenay », mémoire de maîtrise, Université du Québec à Rimouski, 138 p.
- GRAY, M.A. et C.D. METCALFE (1997). « Induction of testis-ova in japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to *p*-nolnlylphenol », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 16, n° 5, p. 1082-1086.
- GUILLETTE, L.J. JR., A.D. CRAIN, S.A.E. GUNDERSON, M.R. KOOLS, E.F. MILNES, A.A. ROONEY et A.R. WOODWARD (2000). « Alligators and endocrine disrupting contaminants: A current perspective », *American Zoologist*, vol. 40, p. 438-452.
- HANSEN, P.D., H. DIZER, B. HOCK, A. MARX, J. SHERRY, M. MCMATER et C. BLAISE (1998). « Vitellogenin: A biomarker for endocrine disruptors », *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 17, n° 7, p. 448-451.
- HARRIES, J.E., D.A. SHEAHAN, S. JOBLING, P. MATTHIESSEN, P. NEALL, J.P. SUMPTER, T. TYLER et N. ZAMAN (1997). « Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 16, n° 3, p. 534-542.
- HARRIES, J.E., A. JANBAKHSH, S. JOBLING, P. MATTHIESSEN, J.P. SUMPTER et C.R. TYLER (1999). « Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the United Kingdom », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 18, n° 5, p. 932-937.
- HEPPELL, S.A., N.D. DENSLOW, L.C. FOLMAR et C.V. SULLIVAN (1995). « Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens », *Environmental Health Perspectives*, vol. 103, suppl. 7, p. 9-15.
- HONG, J., W.L. SALO et P.M. ANDERSON (1995). « Nucleotide sequence and tissue-specific expression of multifunctional protein carbamoyl-phosphate synthetase - aspartate transcarbamoylase - dihydroorotase (CAD) mRNA in *Squalus acanthias* », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, n° 23, p. 14130-14139.
- JEFCOATE, C.R., B.C. MCNAMARA et M.J. DiBARTOLOMEIS (1986). « Control of steroid synthesis in adrenal fasciculata cells », *Endocrinology Research*, vol. 12, p. 315-350.
- Ji, L.L., D. DILLON et E. WU (1990). « Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver », *Journal of American Physiology*, vol. 258, p. R918-R923.
- JOBLING, S., D. SHEAHAN, J.A. OSBORNE, P. MATTHIESSEN et J.P. SUMPTER (1996). « Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to oestrogenic alkylphenol chemicals », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 15, p. 194-202.
- JONES, M.E. (1980). « Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: Genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis », *Annual Review of Biochemistry*, vol. 49, p. 253-279.
- JUGAN, P. et F. VAN HERP (1989). « Introductory study of an oocyte membrane protein that specifically binds vitellogenin in the crayfish *Orconectes limosus* », *Invertebrate Reproduction and Development*, vol. 16, p. 149-154.
- KADAI, A.L. et S.S. KOIDE (1989). « Characterisation of a factor with oocyte maturation inducing activity in *Spisula* », *Biology Bulletin*, vol. 176, p. 8-13.
- KAPUR, K., K. KAMALDEEP et H.S. TOOR (1978). « The effect of fenitrothion on reproduction of the teleost fish, *Cyprinus carpio communis* Linn. A biochemical study », *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 20, p. 438-442.

- KIME, D.E., J.P. NASH et A.P. SCOTT (1999). « Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics », *Aquaculture*, vol. 177, p. 345-352.
- KIRCHHOFF, S., J.-M. SÉVIGNY et C.M. COUILLARD (1999). « Genetic and meristic variations in the mummichog *Fundulus heteroclitus*, living in polluted and reference estuaries », *Marine Environmental Research*, vol. 47, p. 261-283.
- KÖHLER, A. (1991). « Lysosomal perturbations in fish liver as indicators for toxic effects of environmental pollution », *Comparative Biochemistry Physiology*, vol. 100, partie C, p. 123-127.
- KOUETA, N., M. MATHIEU et E. BOUCAUD-CAMOU (1987). « Aspartate transcarbamylase activity in *Sepia officinalis* L. (Mollusca, cephalopoda) », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 87B, n° 2, p. 351-356.
- KOUETA, N. et E. BOUCAUD-CAMOU (1991). « *In vitro* bio-assay for the study of the mitosis-stimulating factor in the optic gland of *Sepia officinalis* », *Marine Biology*, vol. 108, n° 3, p. 419-427.
- KOUETA, N. et E. BOUCAUD-CAMOU (1992). « Changes of aspartate transcarbamylase activity in the gonad of *Sepia officinalis* L. during the sexual cycle », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 102B, n° 2, p. 413-418.
- KOUETA, N., B.G. CASTRO et E. BOUCAUD-CAMOU (1998). « Biochemical indices for instantaneous growth estimation in young cephalopod *Sepia officinalis* L. », *ICES Annual Conference in Cascais, Portugal*, 16-19 Septembre, 14 p.
- KRAMER, V.J., S. MILES-RICHARDSON, S.L. PIERENS et J.P. GIESY (1998). « Reproductive impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17 β -estradiol », *Aquatic Toxicology*, vol. 40, p. 335-360.
- LAGADIC, L., T. CAQUET et F. RAMADE (1994). « The role of biomarkers in environmental assessment: Invertebrate population and communities », *Ecotoxicology*, vol. 3, p. 193-208.
- LAGADIC, L., T. CAQUET, F. RAMADE et J.-C. AMIARD, dir. (1998). *Biomarqueurs en écotoxicologie*, Paris, Masson, coll. « Écologie », p. 33-51.
- LE MAIRE, M., R. CHABAUD et G. HERVÉ (1990). *Biochimie, un modèle d'étude: l'aspartate transcarbamylase, théories et guide d'expériences*, Paris, Masson, 192 p.
- LEE, C.Y. et D. WATSON (1995). « *In vitro* study of vitellogenesis in the blue crab (*Callinectes sapidus*): Site and control of vitellin synthesis », *The Journal of Experimental Zoology*, vol. 271, p. 364-372.
- LEE, R.F., M. SWEENEY et R. WALKER (1994). « Vitellogenesis in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*; Synthesis and utilization of vitellin », *Journal of Shellfish Research*, vol. 13, n° 1, p. 300.
- LEE, R.F. et T. NOONE (1995). « Effect of reproductive toxicants on lipovitellin in female blue crabs, *Callinectes sapidus* », *Marine Environmental Research*, vol. 39, p. 151-154.
- LEVINE, C. et M.A. CHENEY (2000). « Metabolic responses to acute toxicity of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates in *Elliptio complanata* by calorimetry », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 19, n° 7, p. 1906-1910.
- LI, Q., M. OSADA, T. SUZUKI et K. MORI (1998). « Changes in vitellin during oogenesis and effect of estradiol-17 β on vitellogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* », *Invertebrate Reproduction and Development*, vol. 33, n° 1, p. 87-93.
- LONGYANT, S., P. SITHIGORNGUL, N. THAMPALERD, W. SITHIGORNGUL et P. MENASVETA (1999). « Monoclonal antibodies production specific to vitellin and vitellogenin of giant tiger prawn *Penaeus monodon* », *Invertebrate Reproduction and Development*, vol. 35, n° 1, p. 9-17.
- LUBET, P. et M. MATHIEU (1990). « Les régulations endocriniennes chez les mollusques bivalves », *L'année biologique*, vol. 39, n° 4, p. 235-252.
- LYE, C.M., C.L.J. FRID, M.E. GILL, D.W. COOPER et D.M. JONES (1999). « Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediment, and waters from the U.K. Tyne and Tees estuaries », *Environmental Science and Technology*, vol. 33, p. 1009-1014.

- MARTEL, L., M.J. GAGNON, R. MASSÉ, A. LECLERC et L. TREMBLAY (1986). « Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from the Saguenay fjord, Canada », *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 37, p. 133-140.
- MATHIEU, M., J.P. BERGERON et A.M. ALAYSE-DANET (1982). « L'aspartate transcarbamylase, indice d'activité gamétogénétique chez la moule *Mytilus edulis* L. », *International Journal of Invertebrate Reproduction*, vol. 5, p. 337-343.
- MATHIEU, M. (1985). « Partial characterization of aspartate transcarbamylase from the mantle of the mussel *Mytilus edulis* », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 83B, n° 4, p. 667-674.
- MATHIEU, M. (1991). « Contrôle endocrinien de la reproduction chez les bivalves », *Océanis*, vol. 17, n° 3, p. 321.
- MATHIEU, M. (1994). « Endocrine control of carbohydrate metabolism in molluscs », dans K.G. Davey, R.E. Peter et S.S. Tobe (dir.), *Perspectives in Comparative Endocrinology*, Ottawa, NRCC, p. 471-474.
- MATSUMOTO, T., M. OSADA, Y. OSAWA et K. MORI (1997). « Gonadal estrogen profile and immunochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 118B, n° 4, p. 811-817.
- MATTER, J.M., D. ANDREW CRAIN, C. SILLS-MCMURRY, D.B. PICKFORD, T.R. RAINWATER, K.D. REYNOLDS, A.A. ROONEY, R.L. DICKERSON et L. J. GUILLETTE, JR. (1998). « Effects of endocrine-disrupting contaminants in reptiles: Alligators », dans C.H. Ward (dir.), *Endocrine Disruptors*, SETAC Technical Publications Series, p. 267-289.
- MATTHIESSEN, P. et P.E. GIBBS (1998). « Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 17, p. 37-43.
- MAYRAND, É., J. PELLERIN-MASSICOTTE et B. VINCENT (1994). « Small scale variability of biochemical indices of growth in *Mya arenaria* (L.) », *Journal of Shellfish Research*, vol. 13, n° 1, p. 199-205.
- MCLACHLAN, J.A. et S.F. ARNOLD (1996). « Environmental estrogens », *American Scientist*, vol. 84, p. 452-462.
- MCLEESE, D.W., V. ZITKO, D.B. SERGEANT, L. BURRIDGE et C.D. METCALFE (1981). « Lethality and accumulation of alkylphenols in aquatic fauna », *Chemosphere*, vol. 10, n° 7, p. 723-730.
- MCMASTER, M.E., G.J. VAN DER KRAAK, C.B. PORTT, K.R. MUNKITTRICK, P.K. SIBLEY, I.R. SMITH et D.G. DIXON (1991). « Changes in hepatic mixed function oxygenase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker (*Catostomus commersoni*) population exposed to bleached kraft pulp mill effluent », *Aquatic Toxicology*, vol. 21, p. 199-218.
- MOORE, R.W., C.R. JEFEOATE et E. PETERSON (1991). « 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin inhibits steroidogenesis in the rat testis by inhibiting the mobilization of cholesterol to cytochrome P450 », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 109, p. 85-97.
- MORCILLO, Y. et C. PORTE (1997). « Interaction of tributyl- and triphenyltin with the microsomal monooxygenase system of molluscs and fish from the Western Mediterranean », *Aquatic Toxicology*, vol. 38, p. 35-46.
- MORCILLO, Y., M.J.J. RONIS et C. PORTE (1998). « Effects of tributyltin on the phase I testosterone metabolism and steroid titres of the clam *Ruditapes decussata* », *Aquatic Toxicology*, vol. 42, p. 1-13.
- MORCILLO, Y. et C. PORTE (2000). « Evidence of endocrine disruption in clams - *Ruditapes decussata* - transplanted to a tributyltin-polluted environment », *Environmental Pollution*, vol. 107, p. 47-52.
- MORI, K. (1969). « Effect of steroid on oyster », *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, vol. 35, p. 1077-1079.

- MOTAVKINE, P.A. et A.A. VARAKSINE (1989). *Histophysiologie du système nerveux et contrôle de la reproduction chez les mollusques bivalves*, Rapport scientifique et technique de l'IFREMER, vol. 10, 250 p.
- MUNKITTRICK, K.R., M.E. MCMASTER, C.B. PORTT, G.J. VAN DER KRAAK, I.R. SMITH et D.G. DIXON (1992). « Changes in maturity, plasma sex steroid levels, hepatic mixed function oxygenase activity, and the presence of external lesions in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) exposed to beached kraft mill effluent », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 49, p. 1560-1569.
- MUNKITTRICK, K.R., G.V. VAN DER KRAAK, C.B. MCMASTER, C.B. PORTT, M.R. VAN DEN HEUDEL et M.R. SERVOS (1994). « Survey of receiving-water environmental impacts associated with discharges from pulp mills. 2-Gonad size, liver size, hepatic EROD activity and plasma sex steroid levels in the white sucker », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 13, n° 7, p. 1089-1101.
- NAVAS, J.M. et H. SEGNER (1998). « Antiestrogenic activity of anthropogenic and natural chemicals », *Environmental Sciences and Pollution Research*, vol. 5, n° 2, p. 75-82.
- NICE, H.E., M.C. THORNDYKE, D. MORRITT, S. STEELE et M. CRANE (2000). « Development of *Crassostrea gigas* larvae is affected by 4-nonylphenol », *Marine Pollution Bulletin*, vol. 40, n° 6, p. 491-496.
- NICOLAS, J.M. (1999). « Vitellogenesis in fish and effect of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants », *Aquatic Toxicology*, vol. 45, p. 77-90.
- NIMROD, A.C. et W.H. BENSON (1996). « Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates », *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 26, n° 3, p. 335-364.
- OBERDÖRSTER, E. et A.O. CHEEK (2001). « Gender blenders at the beach : Endocrine disruption in marine and estuarine organisms », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 20, n° 1, p. 23-36.
- OLSSON, P.E., P. KLING, C. PETTERSON et C. SILVERSAND (1995). « Interaction of cadmium and oestradiol-17 β on metallothionein and vitellogenin synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) », *Biochemistry*, vol. 307, p. 197-203.
- OSADA, M., T. UNUMA et K. MORI (1992). « Purification and characterization of a yolk-protein from the scallop ovary », *Nippon Suisan Gakkaishi*, vol. 58, n° 12, p. 2283-2289.
- PALMER, B.D., L.K. HUTH, D.L. PIETO et K.W. SELCER (1998). « Vitellogenin as a biomarker for xenobiotic estrogens in an amphibian model system », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 17, n° 1, p. 30-36.
- PAZOS, A.J., et M. MATHIEU (1999). « Effects of five natural gonadotropin-releasing hormones on cells suspensions of marine bivalve gonad : Stimulation of gonadal DNA synthesis », *General Comparative Endocrinology*, vol. 113, p. 112-120.
- PELLERIN-MASSICOTTE, J. (1994). « Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves », *Journal of Aquatic Ecosystems and Health*, vol. 3, p. 101-111.
- PELLERIN-MASSICOTTE, J. (1995). *Potential d'utilisation de paramètres écotoxicologiques à l'intérieur d'une démarche d'évaluation écotoxicologique*, Québec, Ministère de l'Environnement du Québec, 47 p.
- PELLERIN-MASSICOTTE, J. (1997). « Influence of elevated temperature and air-exposure on MDA levels and catalase activities in digestive glands of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) », *Journal de la recherche océanographique*, vol. 22, no 3, p. 91-98.
- PELLERIN-MASSICOTTE, J. et R. TREMBLAY (1997). « La fragilité lysosomiale en tant que biomarqueur cytologique », dans L. Lagadic, T. Caquet, J.-C. Amiard et F. Ramade (dir.), *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, Paris, Tec et Doc Lavoisier, p. 225-242.
- PELLERIN-MASSICOTTE, J., B. VINCENT et E. PELLETIER (1993). « Évaluation écotoxicologique de la qualité de la baie des Anglais (Québec) », *Water Pollution Research Journal of Canada*, vol. 28, p. 665-689.
- PIPE, R.K. (1987). « Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis*: An ultrastructural study », *Marine Biology*, vol. 95, p. 405-414.

- PORPACZY, Z., J.J. TOMASEK et D.A. FREEMAN (1997). « Internalized plasma membrane cholesterol passes through an endosome compartment that is distinct from the acid vesicle-lysosome compartment », *Experimental Cell Research*, vol. 234, p. 217-224.
- PRESCOTT, L.M. et M.E. JONES (1969). « Modified methods for the determination of carbamylaspartate », *Analytical Biochemistry*, vol. 32, p. 408-419.
- PRIVALLE, C.T., J. CRIVELLO et C.R. JEFCOATE (1983). « Regulation of intramitochondrial cholesterol transfer to side-chain cleavage cytochrome P450_{scc} in rat adrenal gland », *Proceedings of the National Academy of Sciences (United States of America)*, vol. 80, p. 702-706.
- PURDOM, C.E., P.A. HARDIMAN, V.J. BYE, N.C. ENO, C.R. TYLER et J.P. SUMPTER (1994). « Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works », *Chemical Ecology*, vol. 8, p. 275-285.
- REGOLI, F. (2000). « Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: A predictive biomarker of oxidative stress », *Aquatic Toxicology*, vol. 50, p. 351-361.
- REGOLI, F., M. NIGRO et E. ORLANDO (1998). « Lysosomal and antioxidant responses to metals in the antarctic scallop *Adamussium colbecki* », *Aquatic Toxicology*, vol. 40, p. 375-392.
- REGOLI, F. et G. PRINCIPIATO (1995). « Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metal under field and laboratory conditions: Implications for the use of biomarkers », *Aquatic Toxicology*, vol. 31, n° 2, p. 143-164.
- REGOLI, F., G.B. PRINCIPIATO, E. BERTOLI, M. NIGRO et E. ORLANDO (1995). « Biochemical characterization of the antioxidant system in the scallop *Adamussium colbecki*, a sentinel organism for monitoring the Antarctic environment », *Polar Biology*, vol. 17, p. 251-258.
- REIS-HENRIQUES, M.A. et J. COIMBRA (1990). « Variations in the levels of progesterone in *Mytilus edulis* during the annual reproductive cycle », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 95A, p. 343-348.
- REIS-HENRIQUES, M.A., D. LE GUELLEC, J.P. REMY-MARTIN et G.L. ADESSI (1990). « Studies of endogenous steroids from marine mollusc *Mytilus edulis* (L.) by gas chromatography and mass spectrometry », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 95B, p. 303-309.
- RIBERA D., J.F. NARBONNE, M. DAUBEZE et X. MICHEL (1989). « Characterisation, tissue distribution and sexual differences of some parameters related to lipid peroxidation in mussels », *Marine Environmental Research*, vol. 28, p. 279-283.
- RONIS, M.J.J. et A.Z. MASSON (1996). « The metabolism of testosterone by periwinkle (*Littorina littorea*) *in vitro* and *in vivo*: Effects of tributyltin », *Marine Environmental Research*, vol. 42, p. 161-166.
- ROPES, JOHN W. (1982). « Hermaphroditism, sexuality and sex ratio in the surf clam, *Spisula solidissima*, and the soft shell clam, *Mya arenaria* », *The Nautilus*, vol. 96, p. 141-146.
- ROUTLEDGE, E.J. et J.P. SUMPTER (1996). « Estrogenic activity of surfactant and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 15, n° 3, p. 241-248.
- RUIZ, C., D. MARTINEZ, G. MOSQUERA, M. ABAD et J.L. SANCHEZ (1992). « Seasonal variations in concentration, reproductive activity and biochemical composition of the flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain) », *Marine Biology*, vol. 112, p. 67-74.
- SAINT-LOUIS, R., C. GOBEIL et E. PELLETIER (1997). « Le tributylétain et ses produits de dégradation dans l'estuaire du Saint-Laurent (Canada) », *Environmental Technology*, vol. 18, p. 1209-1218.
- SAUVÉ, S., P. BROUSSEAU, J. PELLERIN, Y. MORIN, L. SÉNÉCAL, P. GOUDREAU et M. FOURNIER (2002). « Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: *In vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn) », *Aquatic Toxicology*, vol. 58, n°s 3-4, p. 189-200.

- SCHOENMAKERS, H.J.N., C.G. VAN BOHEMEN et S.J. DIELEMAN (1981). « Effects of oestradiol-17 β on the ovaries of the starfish *Asteria rubens* », *Development Growth and Differentiation*, vol. 23, n° 2, p. 125-135.
- SCHOLZ, S. et H.O. GUTZEIT (2000). « 17- α -ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*) », *Aquatic Toxicology*, vol. 50, p. 363-373.
- SERVOS, M.R. (1999). « Review of the aquatic toxicology, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenol and alkylphenol polyethoxylates », *Water Quality Research Journal of Canada*, vol. 39, n° 1, p. 123-177.
- SHERRY, J., A. GAMBLE, P. HODSON, K. SOLOMON, B. HOCK, A. MARX et P. HANSEN (1999). « Vitellogenin induction in fish as an indicator of exposure to environmental estrogens », dans S.S. Rao (dir.), *Impact Assessment of Hazardous Aquatic Contaminants: Concept and Approaches*, New York, Lewis, p. 123-160.
- SHIMIZU, K., W. SAIKAWA et N. FUSETANI (1996). « Identification and partial characterization of vitellin from the barnacle *Balanus amphitrite* », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 115B, n° 1, p. 111-119.
- SHYU, A.B., R.A. RAFF et T. BLUMENTHAL (1986). « Expression of VTG vitellogenin gene in female and male sea urchin », *Proceeding of the Naturalist Academy of Sciences*, vol. 83, p. 3865-3869.
- SIAH, A., A. BENOSMAN, J. PELLERIN, J.-P. GAGNÉ et J.-C. AMIARD (2002). « Seasonal gonad progesterone pattern in the soft-shell clam *Mya arenaria* », *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular and Integrative Physiology*, vol. 132, n° 2, p. 499-511.
- SINGH, P.B. et T.P. SINGH (1992). « Impact of malathion and γ BHC on steroidogenesis in the freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* », *Aquatic Toxicology*, vol. 22, p. 69-80.
- SIVARAJAH, K., C.S. FRANKLIN et W.P. WILLIAMS (1978). « The effects of polychlorinated biphenyls on plasma steroid levels and hepatic microsomal enzymes in fish », *Journal of Fish Biology*, vol. 13, p. 401-409.
- SOBRAL, P. et J. WIDDOWS (1997). « Effects of elevated temperatures on the scope for growth and resistance to air exposure of the clam *Ruditapes decussatus* (L.), from southern Portugal », *Scientia Marina*, vol. 61, n° 2, p. 163-171.
- SOKOŁOWSKI, A., M. WOŁOWICZ, H. HUMMEL et R. BOGGAARDS (1999). « Physiology responses of *Macoma balthica* to copper pollution in the Baltic », *Oceanologica Acta*, vol. 22, n° 4, p. 431-439.
- SPIES, R.B., D.W.J. RICE et J. FELTON (1988). « Effects of organic contaminants on reproduction of the starry flounder *Platichthys stellatus* in San Francisco Bay. I. Hepatic contamination and mixed-function oxidase (MFO) activity during the reproductive season », *Marine Biology*, vol. 98, p. 181-189.
- SPOONER, N., P.E. GIBBS, G.W. BRYAN et L.J. GOAD (1991). « The effects of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex », *Marine Environmental Research*, vol. 32, p. 37-49.
- ST-JEAN, S.D., S.C. COURTENAY, É. PELLETIER et R. ST-LOUIS (1999). « Tributyltin concentrations in sediments and blue mussels (*Mytilus edulis*) of the southern Gulf of St. Lawrence, Canada », *Environmental Technology*, vol. 20, p. 181-189.
- STOCCO, D.M. (2000). « Intramitochondrial cholesterol transfer », *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1486, p. 184-197.
- SUMPTER, J.P. et S. JOBLING (1995). « Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment », *Environmental Health Perspectives*, vol. 103, suppl. 7, p. 173-178.
- SUZUKI, T., A. HARA, K. YAMAGUCHI et K. MORI (1992). « Purification and immunolocalization of a vitellin-like protein from the pacific oyster *Crassostrea gigas* », *Marine Biology*, vol. 113, p. 239-245.

- TAVERA-MENDOZA, L., S. RUBY, P. BROUSSEAU, M. FOURNIER, D. CYR et D. MARCOGLIESE (2002). « Response of the amphibian tadpole *Xenopus laevis* to atrazine during sexual differentiation of the testis », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 21, p. 527-531.
- THOMAS, P. (1988). « Reproductive endocrine function in female Atlantic croaker exposed to pollutants », *Marine Environmental Research*, vol. 24, p. 179-183.
- TOM, M., M. GOREN et M. OVADIA (1987). « Purification and partial characterization of vitellin from the ovaries of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea, decapoda, Penaeidae) », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 87B, n° 1, p. 17-23.
- TONG, W., R. PERKINS, R. STRELITZ, E.R. COLLANTES, S. KEENAN, W.J. WELSH, W.S. BRANHAM et D.M. SHEEHAN (1997). « Quantitative structure-reactivity relationships (QSARs) for estrogen binding to the estrogen receptor : Prediction across species », *Environmental Health Perspectives*, vol. 105, n° 10, p. 1116-1124.
- TOTTER, J.R. (1980). « Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism », *Proceeding of The National Academy of Science*, vol. 77, p. 1763-1767.
- TREMBLAY, R. et J. PELLERIN-MASSICOTTE (1997). « Effects of the tidal cycle on lysosomal membrane stability in the digestive gland of *Mya arenaria* and *Mytilus edulis* L. », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 117A, n° 1, p. 99-104.
- TSENG, R.K. et J.J. COONEY (1995). « Action of tributyltin on enzymes of four bacteria », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 14, n° 7, p. 1113-1121.
- TYLER, C.R., S. JOBLING et J.P. SUMPTER (1998). « Endocrine disruption in wildlife : A critical review of the evidence », *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 28, n° 4, p. 319-361.
- VIARENGO, A. (1989). « Heavy metals in marine invertebrates : Mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level », *Critical Reviews in Aquatic Science*, vol. 1, n° 2, p. 295-317.
- VIARENGO, A., L. CANESI, M. PERTICA et D.R. LIVINGSTONE (1991). « Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 100C, n°s 1-2, p. 187-190.
- VOOGT, P.A., J.J.S. BROERTJES et R.C.H.M. OUDEJANS (1985). « Vitellogenesis in sea star : Physiological and metabolic implications », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 80A, n° 2, p. 141-147.
- WADE, M.G., W.G. FOSTER, E.V. YONGLAI, A. MCMAHON, K. LEINGARTNER, A. YAGAMINAS, K. SOUMANO, D. BLAKLEY, M. FOURNIER, D. DESAULNIERS et C.L. HUGUES (2002). « Subchronic exposure to a complex mixture of persistent contaminants on male rats : Systemic, immune and reproductive effects », *Toxicological Sciences*, vol. 67, p. 131-143.
- WAXMAN, D.J. (1996). « Steroid hormones and other physiologic regulators of liver cytochromes P450 : Metabolic reactions and regulatory pathways », *Advances in Molecular and Cell Biology*, vol. 14, p. 341-374.
- WHITE, J.S., J.M. TOBIN et J.J. COONEY (1999). « Organisms compounds and their interactions with microorganisms », *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 45, n° 7, p. 541-554.
- WHITE, P.A., J.B. RASMUSSEN et C. BLAISE (1998). « Genotoxicity substances in the St Lawrence system. II : Extracts of fish and invertebrates from the St Lawrence and Saguenay rivers, Canada », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 17, n° 2, p. 304-316.
- WHITE, R., S. JOBLING, S.A. HOARE, J.S. SUMPTER et M.G. PARKER (1994). « Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic », *Endocrinology*, vol. 135, n° 1, p. 175-182.
- WIDDOWS, J. (1985). « Physiological responses to pollution », *Marine Pollution Bulletin*, vol. 16A, p.129-134.
- WIDDOWS, J., T. BAKKE, B.L. BAYNE, P. DONKIN, D.R. LIVINGSTONE, D.M. LOWE, M.N. MOORE, S.V. EVANS et S.L. MOORE (1982). « Responses of *Mytilus edulis* on exposure to the water-accommodated fraction of North Sea oil », *Marine Biology*, vol. 67, p. 15-31.

- WIDDOWS, J., P. DONKIN, M.D. BRINSLEY, S.V. EVANS, P.N. SALKELD, A. FRANKLIN, R.J. LAW et M.J. WALDOCK (1995). « Scope for growth and contaminants levels in North Sea mussels *Mytilus edulis* », *Marine Ecology Progress Series*, vol. 127, p. 131-148.
- WIDDOWS, J., C. NASCI et V. FOSSATO (1996). « Effects of pollution on the scope for growth of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon, Italy », *Marine Environmental Research*, vol. 43, p. 69-79.
- YANO, I. et Y. CHINZEI (1987). « Ovary is the site of vitellogenin synthesis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus* », *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 86B, n° 2, p. 213-218.
- ZABA, B.N. (1981). « Glycogenolytic pathways in the mantle tissue of *Mytilus edulis* L. », *Marine Biology Letters*, vol. 2, p. 67-74.

BIOMARQUEURS IMMUNOLOGIQUES APPLIQUÉS À L'ÉCOTOXICOLOGIE

MICHEL FOURNIER*

*Université du Québec à Montréal (UQAM),
INRS-Institut Armand-Frappier*

ANNIE LALANCETTE*

*Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR),
Université du Québec à Montréal (UQAM),
INRS-Institut Armand-Frappier*

LUCIE MÉNARD*

*Université du Québec à Montréal (UQAM),
INRS-Institut Armand-Frappier*

MARIE-SOLEIL CHRISTIN-PICHÉ*

Étudiante au doctorat à l'Université de Montréal

SYLVAIN DE GUISE*

*University of Connecticut
Department of Pathobiology and Veterinary Science*

PAULINE BROUSSEAU*

Division de la recherche contractuelle, Biophage

* Les auteurs tiennent à exprimer leur gratitude à Madame Jocelyne Ash qui a courageusement revu ce chapitre et suggéré de nombreuses améliorations au texte.

RÉSUMÉ

L'immunotoxicologie est une discipline récente et l'analyse des atteintes immunologiques induites par une exposition chimique ne fait que commencer. Généralement, les effets immunotoxiques des xénobiotiques sont classés comme les atteintes à l'immunité humorale, à l'immunité cellulaire et à la réponse non spécifique ayant pour conséquences l'immunodépression, l'immunostimulation, l'hypersensibilité et l'autoimmunité. Dans le présent chapitre nous concentrerons notre attention sur les invertébrés et les amphibiens et les indices d'immunotoxicité qui s'y rattachent.

Malgré que le système immunitaire des invertébrés ne semble pas aussi complexe que celui des vertébrés, ils possèdent une immunité naturelle efficace comprenant des éléments cellulaires et humoraux. À cause de la grande diversité de ces organismes, il est trop tôt actuellement pour pouvoir conceptualiser et uniformiser un schéma de réponse immunitaire des invertébrés en rassemblant des observations faites à partir de différents phylums.

En ce qui concerne les méthodes de détection des différentes réponses immunitaires, les tests couramment utilisés avec les espèces classiques comme les rongeurs peuvent être adaptés relativement facilement aux invertébrés et en particulier aux vers de terre et aux mollusques bivalves. Les biomarqueurs immunologiques utilisés chez ces espèces sont : le compte et la caractérisation des leucocytes, la détermination de l'activité des lysozymes, la phagocytose et la production de dérivés oxygénés. Les biomarqueurs utilisés chez les vers seulement sont : le potentiel de différenciation des nouveaux coelomocytes, la formation de rosettes et l'activité des cellules NK. En combinant le fait que la phagocytose est une réponse sensible face aux xénobiotiques de l'environnement avec le rôle critique qu'elle joue dans l'élaboration de plusieurs réponses immunitaires, ceci en fait actuellement un bioindicateur de choix chez les invertébrés. Il n'en demeure pas moins que les autres réponses semblent avoir beaucoup de potentiel, sauf qu'il est encore trop tôt pour conclure sur leur sensibilité.

Les amphibiens possèdent une immunité naturelle efficace ainsi qu'une bonne réponse immunitaire acquise, bien qu'elle soit moins rapide et moins spécifique que celle des mammifères. Bien que les têtards aient un système immunitaire compétent capable de les protéger d'éventuels pathogènes, il est moins développé que chez les grenouilles adultes. Lors de la métamorphose, les têtards acquièrent plusieurs antigènes adultes suite à l'apparition de nouvelles structures et fonctions. Afin d'éviter une réponse auto-immune contre ces antigènes, le système immunitaire des têtards est supprimé lorsqu'ils arrivent à la métamorphose, ce qui peut rendre les animaux plus sensibles à différents pathogènes. Dans des conditions normales, le système immunitaire des animaux serait capable de les protéger pendant cette période. Cependant, il est possible que la perte de lymphocytes soit accentuée dans de mauvaises conditions environnementales, ce qui augmente la sensibilité à différentes maladies.

Les résultats des différentes études immunotoxicologiques faites sur des amphibiens démontrent clairement que ce groupe d'animaux peut être affecté par différents polluants environnementaux. Il est important de poursuivre ces recherches puisque les amphibiens peuvent être des organismes bioindicateurs représentant la santé globale de l'environnement. De plus, ces études pourraient nous aider à comprendre comment les polluants peuvent entraîner la disparition de certaines espèces.

1. CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

1.1. INTRODUCTION

Le système immunitaire utilise ses mécanismes effecteurs, développés au cours de l'évolution par interactions hôtes-agents infectieux, contre tous les agents pathogènes potentiels : les virus et autres micro-organismes, les parasites et les cellules néoplasiques (Roitt *et al.*, 1993). Par conséquent, plusieurs bio-indicateurs de la réponse immunitaire peuvent être communs à tous les vertébrés (Kouassi *et al.*, 2001 ; Fournier *et al.*, 1999). D'autre part, il est connu que divers médicaments, substances chimiques et polluants industriels, appelés généralement xénobiotiques, peuvent affecter les fonctions immunitaires (Brousseau *et al.*, 1997 ; Fournier *et al.*, 2000a ; 2000b). Cependant, il ne suffit pas qu'une exposition chimique s'accompagne d'altérations immunologiques pour que le xénobiotique en cause soit immunotoxique dans les conditions naturelles d'exposition dans l'environnement. En effet, des questions de doses, de voies d'exposition et d'ampleur des effets potentiels entrent en jeu. Les effets doivent être suffisamment importants pour se traduire en pathologies immédiates ou retardées. Les effets immunotoxiques des substances chimiques sont étudiés dans une sous-discipline du domaine de la toxicologie : l'immunotoxicologie. Cette discipline est récente et l'analyse des atteintes immunologiques induites par une exposition chimique ne fait que commencer.

De nombreuses revues récentes ont fait le bilan des diverses manifestations d'immunotoxicité chez l'humain ou l'animal de laboratoire (Kouassi *et al.*, 2003). Pour les animaux de la faune, un ouvrage récemment publié en toxicologie marine fait la synthèse des travaux portant sur les phoques et les bélugas (Vos *et al.*, 2002). Dans le présent chapitre, nous concentrerons donc notre attention sur les autres espèces fauniques, en particulier les invertébrés et les amphibiens, et les indices d'immunotoxicité qui s'y rattachent.

1.2. DIVERSITÉ DES EFFETS IMMUNOTOXIQUES

Les effets immunotoxiques des xénobiotiques, chez les vertébrés supérieurs, sont signalés au niveau d'organes incluant la moëlle osseuse, le thymus, la rate et les ganglions lymphatiques, et au niveau des cellules. On sait que les xénobiotiques suppriment le fonctionnement des différentes sous-populations de lymphocytes T et B ou des cellules ayant des fonctions immunes diverses, comme les macrophages et les monocytes. Généralement, ces effets immunotoxiques sont classés comme les atteintes à l'immunité humorale, à l'immunité cellulaire et à la réponse non spécifique (Kouassi *et al.*, 2003 ; Fournier *et al.*, 2000a ; Brousseau *et al.*, 1997).

Les conséquences classiques d'actions toxiques sur le système immunitaire peuvent prendre des formes variées comme l'immunodépression, l'immunostimulation, l'hypersensibilité et l'auto-immunité. Il est important de noter à ce niveau que les phénomènes d'hypersensibilité et d'auto-immunité ont principalement été caractérisés chez l'humain ou par l'emploi de modèles de laboratoires tels que la souris ou le rat. Ces phénomènes, n'ayant pratiquement pas été documentés pour la faune, ne seront donc pas retenus pour les besoins de ce chapitre.

L'immunodépression chimique est généralement mise en évidence par une baisse de la résistance aux infections microbiennes, virales et parasitaires. L'épidémie d'origine virale qui a décimé plus des deux tiers des phoques de la mer du Nord à la fin du siècle dernier s'explique probablement par le fort degré de pollution chimique des eaux marines (Revillard, 1994). Il est relativement facile d'identifier une immunodépression aiguë par l'histologie des organes lymphoïdes, l'analyse des sous-populations lymphocytaires et des tests *in vitro* de fonctionnement des cellules immuno-compétentes. Par contre, l'immunodépression à long terme entraîne une incidence accrue de certains cancers. Parmi les polluants chimiques de l'environnement, les biphényles polybromés (BPB), les biphényles polychlorés (BPC), les dioxines, les furannes, les substances alkylantes et les insecticides organochlorés sont cités comme étant des xénobiotiques immunodépressifs (Voccia *et al.*, 1999). Les métaux lourds (mercure, cadmium, plomb, etc.) sont également considérés immunodépressifs/immunotoxiques (Omara *et al.*, 1998 ; Zelikoff *et al.*, 1998). Ces xénobiotiques provoquent généralement une baisse de la résistance aux infections bactériennes et virales. Cependant, il est recommandé de procéder à plusieurs tests de résistance de l'hôte à différents pathogènes à cause de la complexité des composantes de la réponse antivirale et antibactérienne.

L'immunostimulation se caractérise généralement par l'induction d'une réponse qualitativement anormale. Certains agents chimiques peuvent avoir un potentiel stimulateur et servir d'agents modificateurs des réponses biologiques. Les propriétés immunostimulantes des interférons, des interleukines, du levamisole et des dérivés du dithiocarbamate sont relativement bien connues (Holcombe *et al.*, 2001 ; Haller, 2001). De plus, certains médicaments capables de raccourcir la durée de la maladie, comme l'isoprinosine, le muramyl dipeptide, l'azimexon, le bestatin, le tuftsin et les pyrimidinoles, sont de puissants immunostimulants (Hadden, 1987). Cependant, les effets bénéfiques de ces agents sont souvent contrebalancés par des effets secondaires indésirables tels que l'induction d'auto-immunité (Krzystyniak *et al.*, 1992 ; 1994 ; Kimber, 2002). Les conséquences toxiques d'une immunostimulation sont toutefois encore peu définies. Plus spécifiquement, pour les xénobiotiques environnementaux, certains

métaux semblent dotés du potentiel de stimuler des fonctions immunitaires pour des expositions à faibles doses. C'est notamment le cas du mercure (Bernier *et al.*, 1995).

1.3. PROCÉDURES D'ÉVALUATION TOXICOLOGIQUE ET PRÉVISION D'IMMUNOTOXICITÉ

Les études de toxicologie de routine, exposant des animaux de laboratoire à différentes doses et selon des protocoles d'exposition variés, permettent de révéler un certain nombre d'effets sur le système immunitaire (Kociba *et al.*, 1982). Des observations telles qu'une diminution de poids ou une modification histologique des organes lymphoïdes, ou encore un changement au niveau des cellules sanguines représentent toutes de bons éléments de base pour soupçonner une immunotoxicité potentielle. Toutefois, en écotoxicologie, la démarche est tout à fait différente. En effet, depuis plusieurs années, nous avons pu observer des épidémies ou encore des pandémies qui ont amené des milliers de cas de mortalité chez des dizaines d'espèces d'animaux sauvages. Ce n'est qu'après plusieurs années de recherche que nous nous sommes rendu compte que beaucoup de ces animaux avaient été soumis à un stress toxicologique. Comme conséquence à ce stress, nous avons pu conclure, à partir de plusieurs des cohortes restantes, que le système immunitaire de ces animaux avait été suffisamment perturber pour les empêcher de se défendre efficacement contre des infections opportunistes.

1.4. PRINCIPES D'UNE EXPLORATION IMMUNOTOXICOLOGIQUE

Le nouvel intérêt accordé à l'immunotoxicologie a fait en sorte qu'il y a eu beaucoup de travail effectué afin de normaliser les approches et d'harmoniser les méthodologies. La valeur prédictive des tests immunologiques en a d'ailleurs beaucoup bénéficié (Luster *et al.*, 1992 ; 1993 ; 1994). En écotoxicologie, l'approche classique consiste tout d'abord à explorer *in vitro* les effets potentiellement immunotoxiques de xénobiotiques sur les cellules lymphoïdes de l'espèce faunique d'intérêt. Les xénobiotiques peuvent être considérés seul ou en mélange. Les tests classiques sont en général une mesure de la cytotoxicité en parallèle avec l'activité phagocytaire, la prolifération des lymphocytes ou encore la flambée oxydative. Cette approche nous permet d'identifier les xénobiotiques qui ont la capacité de moduler le système immunitaire, dans l'espèce cible, et d'établir un éventail de concentrations pour lesquelles le xénobiotique est immunotoxique sans être cytotoxique. Cette information importante se

répercute dans les études avec les animaux. En effet, lors d'études *in vivo*, nous nous devons toujours d'étudier l'immunotoxicité potentielle des xénobiotiques en dehors d'un contexte de toxicité systémique.

La deuxième étape consiste à exposer des animaux de l'espèce faunique d'intérêt à des expositions contrôlées, en laboratoire. Nous devons utiliser un protocole d'exposition qui imite le plus possible les conditions d'exposition réelle dans l'environnement de cette espèce. Encore une fois, les xénobiotiques peuvent être considérés seuls ou en mélange. Nous devons aussi utiliser plusieurs concentrations (généralement 3) du ou des xénobiotiques à l'étude, afin de générer des courbes dose-réponse. Ces courbes représentent un élément clé lors de la sélection du ou des biomarqueurs que nous voulons utiliser dans les études sur le terrain. Les tests les plus souvent sélectionnés par ces études sont l'activité des cellules NK en combinaison avec l'analyse de sous-populations cellulaires par phénotypage, la synthèse des anticorps mesurée par la technique des plages de lyse ou encore la phagocytose (Luster *et al.*, 1992; Fournier *et al.*, 2000a, 2000b; US Food and Drug Administration, 2001). De plus, selon l'état des connaissances sur le ou les xénobiotiques à l'étude, d'autres tests peuvent être très pertinents, notamment la mesure de certaines cytokines dont celles qui sont impliquées dans les processus d'inflammation (IL-1, TNF- α , IFN γ).

1.5. ÉVALUATION DU RISQUE EN IMMUNOTOXICOLOGIE

L'immunotoxicologie étant un domaine de recherche relativement nouveau, les chercheurs ne disposent pas d'un aussi grand volume d'informations qu'en toxicologie. Néanmoins, depuis une dizaine d'années, de nombreux travaux ont porté sur l'analyse du risque en immunotoxicologie. Les premières études de l'évaluation du risque ont été faites par Luster *et al.* (1994). Cette équipe avait proposé d'utiliser une batterie de tests pour faire le criblage de composés potentiellement immunotoxiques. La banque de données générée avec une cinquantaine de composés a par la suite permis d'identifier les outils immunologiques qui pourraient donner la meilleure valeur prédictive du risque. L'étape suivante est actuellement en progrès. Il s'agit d'études d'immunotoxicité détaillées qui doivent fournir des informations sur les relations dose-effet et dose-réponse afin de constituer la base de la détermination de la dose sans effet néfaste observé (*no observable adverse effect level*; NOAEL). La détermination de la NOAEL est compliquée par les différentes sensibilités des tests d'immunotoxicité (Luster *et al.*, 1994). Quand ces données seront disponibles pour un grand nombre de xénobiotiques, le défi en écotoxicologie sera alors d'effectuer des analyses sur le terrain ou d'appliquer des modèles

mathématiques qui fourniront les données sur les concentrations environnementales du xénobiotique en cause et, par conséquent, les estimations sur l'exposition et la charge corporelle des espèces fauniques. Il serait aussi souhaitable d'utiliser des modèles basés sur les voies d'exposition, de pénétration, de métabolisation et d'élimination spécifiques de l'espèce faunique à l'étude.

2. IMMUNOTOXICOLOGIE DES INVERTÉBRÉS

2.1. INTRODUCTION

Les invertébrés, tout comme les vertébrés, sont continuellement exposés à des antigènes. Malgré le fait que leur système immunitaire ne semble pas, du moins selon les données actuelles, aussi complexe que celui des vertébrés, il n'en demeure pas moins qu'ils sont dotés de mécanismes de défense leur permettant de maintenir leur homéostasie. Les immunoglobulines et les réponses de l'immunité acquise caractéristiques des vertébrés font défaut aux invertébrés, mais ils possèdent cependant une immunité naturelle efficace comprenant des éléments cellulaires et humoraux.

La première ligne de défense des invertébrés contre des organismes potentiellement envahissants a fréquemment lieu au niveau du tégument ou de l'intestin et implique différentes protéines cytotoxiques et peptides antimicrobiens synthétisés par les cellules de l'épiderme et transportés au site de la blessure (Ashida et Brey, 1995). Les organismes étrangers qui traversent la barrière du tégument ou qui passent à travers la paroi intestinale rencontrent des cellules sanguines réactives (hémocytes ou coelomocytes) et une variété de molécules cytotoxiques spécifiques et non spécifiques (Nappi et Ottaviani, 2000).

Les défenses cellulaires sont un point important de la protection des invertébrés et comprennent la réparation des blessures, la coagulation, l'agglutination, l'opsonisation, l'inflammation, la phagocytose, l'encapsulation et la production d'intermédiaires réactifs d'oxygène (ROI) et d'azote (RNI) cytotoxiques, ainsi que leurs enzymes associées (Cooper *et al.*, 2002 ; Beschin *et al.*, 2001 ; Nappi et Ottaviani, 2000). Des formes de cytotoxicité efficaces sont présentes chez les éponges, les cœlentérés, les sipunculides, les annélides, les mollusques, les arthropodes, les échinodermes et les protochordés (Quesada *et al.*, 1996 ; Hubert *et al.*, 1997 ; Sheu *et al.*, 1998 ; Smith *et al.*, 1999). Les réponses cellulaires prédominantes chez les insectes sont la phagocytose et l'encapsulation. Cette dernière est dirigée contre les organismes eucaryotes et implique la participation de plusieurs hémocytes dans une sorte de phagocytose en commun qui séquestre les

parasites à l'intérieur de plusieurs couches cellulaires. Chez les insectes et les arthropodes, les composantes cellulaires de la capsule sont typiquement mélanisés (Nappi et Ottaviani, 2000).

Quant aux réponses humores des invertébrés, elles comprennent toute une gamme de facteurs antimicrobiens (Beschin *et al.*, 2001 ; Nappi et Ottaviani, 2000), comme les lysozymes, les protéases, les agglutinines, les peptides antimicrobiens, des composés lytiques et les métabolites de l'activation de la cascade de la prophénoloxydase (Cooper *et al.*, 2002 ; Beschin *et al.*, 2001). Malgré le fait que l'immunologie des invertébrés représente un domaine de recherche important, il n'en demeure pas moins qu'à cause de la grande diversité de ces organismes, il est trop tôt actuellement pour pouvoir conceptualiser et uniformiser un schéma de réponse immunitaire en rassemblant des observations faites à partir de différents phylums.

2.2. RÉPONSES IMMUNITAIRES NON SPÉCIFIQUES

2.2.1. La phagocytose

La phagocytose est le mécanisme de défense prédominant chez les invertébrés (Beck *et al.*, 1993). Classiquement, la phagocytose peut être décrite comme étant un mécanisme qui permet à certains types de cellules de capter et de détruire des corps étrangers. Chez les acéломates, la phagocytose est effectuée par des cellules mobiles, les amibocytes ; tandis que chez les céломates il existe des phagocytes dans le sang (les hémocytes) et dans la cavité célomique « les célomocytes ».

Chez les vertébrés, la phagocytose se divise en quatre étapes principales qui sont : la chémotaxie, l'adhérence, l'ingestion et la digestion. Qu'en est-il chez les invertébrés ? En ce qui concerne la chémotaxie, très peu d'informations sont disponibles à propos de cette fonction. Les travaux de Schneeweiss et Renwranz (1993) ont démontré que les hémocytes de la moule *Mytilus edulis* possèdent la capacité de migrer dans une chambre de Boyden sous l'influence de certains lipopolysaccharides. Cependant, en constatant la nature du système circulatoire de ces organismes, nous pouvons facilement comprendre pourquoi cette fonction ne semble pas très importante. En effet, le système circulatoire de certains invertébrés comme celui des arthropodes n'est pas clos. Le sang provenant des artères est donc libéré directement dans les cavités périviscérales dans lesquelles baignent les divers organes. Conséquemment, les phagocytes peuvent très facilement entrer en contact avec les antigènes.

En ce qui concerne maintenant la reconnaissance et l'adhérence, des travaux ont démontré chez les invertébrés la présence d'une variété de molécules jouant le rôle d'opsonines en se fixant sur le matériel à éliminer,

le rendant ainsi plus vulnérable face à l'action des phagocytes. Un système du complément primitif ainsi que des analogues du facteur C3 du complément des vertébrés ont été identifiés chez l'oursin de mer (Smith, 2002 ; Smith *et al.*, 2001), des tuniciers (Sekine *et al.*, 2001 ; Nonaka et Azumi, 1999 ; Nonaka *et al.*, 1999), des mollusques bivalves comme par exemple l'huître (Hardy *et al.*, 1977), la moule (Renwrantz et Stahmer, 1983) et la palourde (Yang et Yoshino, 1990), ainsi que chez des gastéropodes comme les escargots (Sminia *et al.*, 1979). D'autres opsonines ont été identifiées comme des lectines chez les tuniciers (Pearce *et al.*, 2001 ; Ballarin *et al.*, 1999) et les bivalves (Yang et Yoshino, 1990), des produits du système d'activation de la prophénoloxydase chez les crustacés (Cerenius *et al.*, 1994 ; Thornqvist *et al.*, 1994) et des analogues de l'interleukine-1 chez les échinodermes et les tuniciers (Beck *et al.*, 1993).

Des expériences faites avec des vers de terre (*Lumbricus terrestris*, *Eisenia foetida*) montrent que la phagocytose de particules inertes par des cœlomocytes est augmentée si les billes sont préalablement incubées dans le liquide cœlomique (Bilej *et al.*, 1990a). Plusieurs de ces opsonines ont été identifiées comme le CCF-1 et les fétidines chez les vers de terre (revue dans Beschin *et al.*, 2001 ; Cooper *et al.*, 2002 ; Nappi et Ottoviani, 2000). Cependant, le rôle de ces opsonines dans la phagocytose n'est toujours pas totalement élucidé (Bayne et Fryer, 1994).

L'ingestion des antigènes se fait d'une manière similaire aux vertébrés, c'est-à-dire que la cellule phagocyte entoure l'antigène de pseudopodes et l'internalise dans un phagosome. Les phagocytes des invertébrés possèdent des lysosomes qui, fusionnés avec les phagosomes, relarguent leur contenu enzymatique qui amorce la dégradation (McKerrow *et al.*, 1985 ; Kroschinski et Renwrantz, 1988). De plus, la production de peroxydes via la flambée oxydative a été démontrée chez plusieurs organismes, dont les limnées (Dikkeboom *et al.*, 1988) et les crevettes (Song et Hsieh, 1994). Certains produits de la digestion peuvent servir d'éléments nutritifs, tel que démontré chez les éponges (van der Vyner, 1981) et les mollusques (Cheng, 1977) et migrer vers un site de la cellule où ils deviendront métaboliquement inactifs ou pourront être relargués dans le milieu extérieur (Bayne, 1990).

2.2.2. L'activité des cellules NK

Les cellules tueuses naturelles (NK) peuvent être définies comme étant des cellules qui possèdent la capacité d'induire la lyse de certains types de cellules cibles, et ce, sans l'intervention des antigènes d'histocompatibilité ni d'anticorps. De plus, la rapidité et l'amplitude de la réponse des cellules NK contre les cellules cibles n'augmente pas à la suite d'exposition subséquente. Il n'y a donc pas de phénomène de mémoire immunologique chez ces cellules. Malgré le fait que les cellules NK classiques

que l'on retrouve chez les mammifères ne sont pas présentes chez les invertébrés, une activité similaire à celle-ci a été démontrée chez plusieurs de ces espèces. En effet, une forme primitive d'activité cytotoxique spontanée a été démontrée chez des escargots d'eau douce (Franceschi *et al.*, 1991), des écrevisses (Söderhäll *et al.*, 1985) et des vers (Porchet-Hennere, 1992 ; Cooper *et al.*, 1995).

2.3. RÉPONSES IMMUNITAIRES SPÉCIFIQUES

2.3.1. Réponse à médiation cellulaire

Une des premières manifestations de réponses immunitaires spécifiques chez les invertébrés a été observée par Bancroft (1903), en étudiant des colonies de tuniciers à partir desquelles il a décrit des réactions de fusion et de rejet d'individus envers la colonie, qui s'apparentent beaucoup à la reconnaissance allogénique des vertébrés. Aujourd'hui nous connaissons, du moins chez ces organismes, les bases moléculaires qui déterminent l'alloantigénicité. En effet, les règles d'histocompatibilité sont orchestrées par un seul locus à allèles multiples (Raftos et Briscoe, 1990). Conséquemment, pour qu'un individu soit accepté dans la colonie, il doit posséder le même phénotype. Plusieurs autres manifestations d'immunité cellulaire, quelque peu différentes de celle décrite pour les tuniciers, ont été observées à partir d'autres phylums, où on a observé une incompatibilité allogénique très rapide, déclenchant une réponse presque immédiate. Des expériences faites avec une éponge (*Microcina prolifera*) dans lesquelles deux morceaux provenant de deux individus étaient juxtaposés et maintenus ensembles, montrent que dès que les deux pièces semblent se fusionner, une réaction de reconnaissance allogénique commence à se manifester et ce, deux à trois heures seulement après le début de l'expérience. Des cellules d'un type particulier s'accumulent rapidement tout au long de la zone de contact et subséquemment, une barrière de collagène apparaît au niveau de cette zone, séparant ainsi les deux individus (Humphreys et Reinherz, 1994).

Des expériences de greffe classiquement utilisées chez les vertébrés afin d'étudier l'immunité cellulaire ont aussi été réalisées avec des invertébrés. L'ensemble des résultats démontre que des allogreffes et/ou des xénogreffes sont aussi rejetées. Les données macroscopiques et microscopiques décrivent un phénomène de destruction cellulaire très similaire à celui observé chez les vertébrés, quoique plus lent. Ce type d'expérience a été fait entre autres avec des étoiles de mer (Karp et Hildemann, 1976), des anémones de mer (Bigger, 1980 ; Lubbock, 1980), des insectes (Thomas et Ratcliffe, 1982 ; Lackie, 1983 ; Karp, 1990) et des vers de terre (Cooper, 1968 ; 1969). Des expériences ont démontré que le transfert adoptif d'une

mémoire immunologique pouvait être effectué entre autres chez les porifères (Hildeman *et al.*, 1979), les cnidaires (Salter-Cid et Bigger, 1991), les némerthes (Langlet et Bierne, 1984), les échinodermes (Smith et Davidson, 1992 ; Smith *et al.*, 1992), les annélides (Cooper, 1994) et la coquerelle (Karp *et al.*, 1994).

2.3.2. Réponse à médiation humorale

Des travaux de Schluter et collaborateurs (1994), en utilisant un *Western blot*, démontrent que l'hémolymphe des tuniciers (*Pyura hausteria*, *Boltenia ovipera*) contient une protéine de 30 kDa qui est reconnue par un anticorps de lapin dirigé spécifiquement contre les IgM du requin des Galapagos. Une approche semblable a été adoptée par Eyambe (1993), qui a ainsi identifié, à partir du liquide coelomique de *Lumbricus terrestris*, des molécules reconnues par des anticorps dirigés contre des IgG et des IgA humaines. De plus, il avait été démontré antérieurement à ces travaux que des vers pouvaient produire des agglutinines, soit d'une façon naturelle ou induite par une immunisation (Bilej *et al.*, 1990).

2.3.3. Les cytokines

Chez les vertébrés, les cytokines sont des substances relarguées par des cellules activées et qui sont très importantes dans la régulation des réponses immunitaires. Chez les invertébrés, plusieurs de ces cytokines ont déjà été caractérisées. Nous pouvons citer entre autre l'interleukine-1, le TNF, l'interleukine-6 et le TGF- β qui ont été identifiés chez plusieurs espèces (Beschinn *et al.*, 2001). Chez le ver de terre, un nombre croissant de cytokines sont identifiées. On retrouve les fétidines, les lumbricines, le CCF-1 et les lysénines, pour n'en nommer que quelques-unes (revue dans Beschinn *et al.*, 2001 ; Cooper *et al.*, 2002 ; Nappi et Ottoviani, 2000).

2.4. LES BIOMARQUEURS IMMUNOLOGIQUES CHEZ LES INVERTÉBRÉS

2.4.1. Les marqueurs immunologiques chez les annélides oligochètes

Les vers de terre jouent un rôle écologique essentiel dans le maintien de la qualité et du développement du profil du sol. Ils ont un effet sur les propriétés physicochimiques, sur l'amélioration de la structure et sur l'agrégation des sols (Edwards et Shipitalo, 1998), et ils augmentent les processus microbiens et le cycle des nutriments (Lavelle *et al.*, 1998). Lors d'études écotoxicologiques, les protocoles standards utilisant des vers de terre sont fréquemment retenus (Fitzpatrick *et al.*, 1990 ; Reinecke, 1992 ; Furst *et al.*, 1993 ; Callahan *et al.*, 1994). Les vers de terre peuvent accumuler une quantité significative de métal dans les tissus sans effets apparents sur leur survie. Ceci suggère des effets potentiels sublétaux dus

à l'exposition chronique via une hausse de la charge corporelle (Sauvé *et al.*, 2002). Comme les réponses du système immunitaire de ces derniers sont mieux connues que celles d'autres invertébrés, des efforts considérables ont déjà été faits afin d'adapter le protocole d'immunotoxicologie par étapes proposé par Luster et collaborateurs (1988) aux vers de terre (Venables *et al.*, 1992 ; Goven *et al.*, 1994b). Aussi, il est important de noter que les groupes antivivisectionnistes sont moins réfractaires à l'utilisation des vers de terre qu'à celle des espèces courantes d'animaux de laboratoire. Enfin, les vers de terre demandent peu d'entretien et sont peu coûteux. Ces caractéristiques ainsi que les contributions écologiques majeures de ces organismes en font un bon modèle pour la recherche de biomarqueurs en immunotoxicologie.

Les effets de plusieurs contaminants environnementaux sur le système immunitaire des vers de terre ont été étudiés essentiellement sur deux espèces, soit *Eisenia foetida* et *Lumbricus terrestris*. Deux approches complémentaires ont été utilisées, les tests *in vitro* sur les cœlomocytes isolés et les tests *in vivo* sur les vers entiers. La collecte de cœlomocytes de vers de terre par des méthodes d'extrusion (Eyambe *et al.*, 1991) présente un avantage de plus pour l'utilisation de ce modèle. En effet, les vers de terre récupèrent aisément de l'extrusion et une seconde extrusion de cellules sur les mêmes vers un mois plus tard donne une quantité de cellules semblable à la première extrusion (Sauvé *et al.*, 2002a). De plus, la simplicité relative de l'extrusion de cellules par ultrasons permet son application à de très petits vers (Sauvé *et al.*, 2002a).

Les biomarqueurs immunologiques chez les vers de terre sont :

- le compte et la caractérisation des cœlomocytes et le potentiel de différenciation des nouveaux cœlomocytes (Eyambe *et al.*, 1991 ; Goven *et al.*, 1993 ; 1994b) ;
- la détermination de l'activité des lysozymes dans le liquide cœlomique (Goven *et al.*, 1993 ; 1994b) ;
- la phagocytose (Eyambe, 1991 ; Fitzpatrick *et al.*, 1992 ; Goven *et al.*, 1994a) ;
- la production de dérivés oxygénés (Chen *et al.*, 1991 ; Goven *et al.*, 1994a) ;
- la formation de rosettes avec des lectines agglutinantes (Rodriguez-Grau *et al.*, 1989).
- l'activité des cellules NK (Cooper *et al.*, 1999 ; Suzuki *et al.*, 1995).

Les cœlomocytes sont une population hétérogène pouvant être catégorisée en différentes sous-populations selon leur coloration respective (Eyambe *et al.*, 1991 ; Goven *et al.*, 1994), selon leur capacité phagocytaire (Bilej *et al.*, 1990a) ou selon leurs différences morphologiques

(Jamieson, 1992). Deux sous-populations cellulaires différentes sont identifiables par cytométrie de flux (Fugère *et al.*, 1996). Les cellules de type I sont de petits cœlomocytes d'environ 12 μm comprenant 60 % de la population, tandis que les cellules de types II sont de plus gros cœlomocytes d'environ 23 μm comprenant 40 % de la population (Fugère *et al.*, 1996). Des expériences supplémentaires sont requises afin d'établir une corrélation entre les types cellulaires distincts par cytométrie de flux et les caractéristiques morphologiques connues des cœlomocytes. Les populations cellulaires des vers sont spécifiques à l'espèce. Sauvé *et al.* (2002a) ont démontré par cytométrie de flux chez quatre espèces de vers que les distributions cellulaires différaient et que l'importance relative des différents groupes cellulaires variait énormément entre espèces.

La toxicité de plusieurs métaux (MoCl_4 , NiCl_2 , AgNO_3 , CdCl_2 , CuCl_2 , HgCl_2 , CH_3HgCl , ZnCl_2 et PbCl_2) induit des changements drastiques dans le patron de la distribution cellulaire tel qu'observé par cytométrie de flux chez les espèces *Eisenia foetida*, *Lumbricus terrestris*, *Tubifex tubifex* et *Aporrectodea turgida* (Sauvé *et al.*, 2002a). De plus, une incubation de 18 heures des cœlomocytes à des doses de 10^{-7} à 10^{-4} M de HgCl_2 et de CH_3HgCl modifie le ratio des deux sous-populations cellulaires repérables par cytométrie de flux, sans toutefois modifier l'activité phagocytaire relative de chacune des sous-populations. Par conséquent, il semblerait qu'une portion des cœlomocytes de type II ayant une phagocytose faible ou absente soit plus sensible à la cytotoxicité induite par le mercure (Fugère *et al.*, 1996). Une exposition *in vivo* du polychète *Eurythoe complanata* à des concentrations sublétales de cuivre a fait varier les paramètres cytologiques, la viabilité cellulaire et les comptes différentiels des cœlomocytes (Nusetti *et al.*, 1998). Des changements qualitatifs et quantitatifs ont aussi été mesurés chez des cœlomocytes de vers de terre exposés à un mélange de BPC ou d'Aroclor 1254 (Goven *et al.*, 1993 ; 1994b ; Burch *et al.*, 1999).

Comparée aux bioessais létaux ou aigus, la mesure de la phagocytose par cytométrie de flux chez les invertébrés représente un biomarqueur sensible permettant d'évaluer les effets des métaux lourds à des concentrations sublétales. En effet, la phagocytose des cœlomocytes suite à une exposition aux métaux lourds est généralement altérée avant la mort cellulaire (tableau 9.1). Une exception notable est le cas de *T. tubifex* où la réponse de la phagocytose en fonction de la dose de CH_3HgCl est presque identique à la viabilité cellulaire (Sauvé *et al.*, 2002a). La sensibilité moyenne de la phagocytose des cœlomocytes de vers aux métaux lourds peut être classée selon l'ordre suivant d'après l'étude de Sauvé *et al.* (2002a) : $\text{MoCl}_4 < \text{NiCl}_2 < \text{AgNO}_3 \sim \text{CdCl}_2 \sim \text{CuCl}_2 \ll \text{HgCl}_2 < \text{CH}_3\text{HgCl}$. Le ZnCl_2 et le PbCl_2 n'ont pas démontré une toxicité constante parmi les espèces étudiées. Une diminution de la phagocytose des cœlomocytes de vers exposés au mercure, au cadmium ou au zinc a aussi été notée par

Fugère *et al.* (1996). Les recherches sur l'effet des BPC menées par Fitzpatrick *et al.* (1992) et Ville *et al.* (1995) ont permis d'observer une réduction de l'activité phagocytaire. Plusieurs métaux diminuent la production de dérivés oxygénés (Chen *et al.*, 1991 ; Goven *et al.*, 1994a) lors d'expositions *in vivo*. Par exemple, le cuivre interfère avec une cascade enzymatique des coelomocytes menant à la production de superoxyde, responsable de la mort des micro-organismes phagocytés (Chen *et al.*, 1991).

Tableau 9.1

Concentrations inhibant de 50 % la phagocytose effectuée par des hémocytes de myes (*Mya arenaria*) et des coelomocytes de vers (*Lumbricus terrestris*) exposés à divers métaux

Métal	CI 50 (10 ⁻⁵ M)	
	Myes	Vers
CH ₃ HgCl	0,25	0,03
HgCl ₂	3,9	1,8
AgNO ₃	7,0	–
CdCl ₂	8,5	3,0
ZnCl ₂	11,5	10

Il est intéressant de noter que, tel que démontré chez plusieurs autres espèces (Flipo *et al.*, 1992 ; Fournier *et al.*, 1992 ; Voccia *et al.*, 1994), la phagocytose chez les vers de terre semble être affectée lors d'expositions *in vivo* et *in vitro* à des xénobiotiques. Ce paramètre s'est révélé 200 fois plus sensible que la viabilité des coelomocytes chez des vers exposés *in vitro* à l'Aroclor 1254 (Burch *et al.*, 1999). Ceci est en accord avec des études portant sur l'exposition *in vivo* des vers de terre à l'Aroclor 1254 qui ont démontré que la phagocytose est un biomarqueur plus stable et plus sensible que la viabilité des coelomocytes (Goven *et al.*, 1994b). Étant donné la sensibilité de ce biomarqueur immunologique et son rôle critique dans le développement de multiples réponses immunes, la mesure de l'activité phagocytaire semble un paramètre de choix chez ces organismes lors d'évaluations immunotoxicologiques.

Nusetti *et al.* (1999) ont démontré que l'activité des lysozymes du fluide coelomique d'*Amyntas hawayanus* était doublement supérieure suite à une exposition au cuivre, alors que la phagocytose était diminuée. Des résultats similaires ont été obtenus chez d'autres espèces de vers exposés aux BPC (Ville *et al.*, 1992 ; 1995). Une exposition sublétales aux BPC a diminué la phagocytose tout en augmentant l'activité antibactérienne. Cette hausse dans l'activité des lysozymes pourrait représenter une

réponse immunitaire compensatoire pour faciliter la survie lorsque des stress chimiques inhibent les réponses immunitaires cellulaires (Nusetti *et al.*, 1999). Par contre, une exposition au cuivre (Goven *et al.*, 1993 ; 1994b) ainsi qu'une exposition au carbaryl (Ville *et al.*, 1997) ont provoqué une diminution de l'activité des lysozymes chez les vers de terre dans d'autres études.

L'Aroclor 1254 inhibe également l'activité des cellules tueuses chez les cœlomocytes (Suzuki *et al.*, 1995).

L'exposition de vers au BPC à des concentrations non létales et à des niveaux mesurés chez les vertébrés vivant dans un environnement naturel inhibe la formation de rosettes avec des lectines agglutinantes (Fitzpatrick *et al.*, 1990). Une contamination au cuivre caractérisée par une augmentation du double de la concentration de ce métal dans les tissus a aussi fortement diminué la formation de rosettes (Nusetti *et al.*, 1998).

La sensibilité des vers varie selon les espèces et même ces variations sont chimiquement spécifiques ; ainsi, l'espèce la plus sensible à un contaminant donné peut se révéler très résistante à un autre contaminant (Sauvé *et al.*, 2002a). L'espèce *Eisenia foetida* tend à être favorisée dans les tests écotoxicologiques du sol à cause de la grande facilité à cultiver cette espèce en laboratoire. En comparant différentes espèces de vers, Edwards et Coulson (1992) ont remarqué qu'*E. foetida* était l'espèce la plus résistante pour plusieurs produits chimiques et bioessais, tandis qu'*Aporrectodea caliginosa* (ou un autre *Ap. spp*) était l'espèce la plus sensible. Cependant, des contradictions ont été relevées et pas une espèce en particulier n'a démontré un ordre constant de sensibilité aux toxiques. Dans l'étude de Sauvé *et al.* (2002a), aucune espèce n'est de façon constante toujours la plus ou la moins sensible. Cependant, *Aporrectodea turgida* et *Tubifex tubifex* semblent démontrer occasionnellement une plus grande excentricité (avec des sensibilités beaucoup plus fortes ou beaucoup plus faibles). L'utilisation d'un facteur de sécurité de 10 pour extrapoler à d'autres espèces des résultats obtenus à partir des espèces communément utilisées *E. foetida* et *L. terrestris* nous semble recommandée et certainement pas excessive.

2.4.2. Biomarqueurs immunologiques chez les mollusques bivalves

Un nombre croissant de données proviennent d'expérimentations utilisant les bivalves comme modèle. Les adultes bivalves sont capables d'accumuler dans leurs tissus des concentrations de métaux supérieures de plusieurs ordres de grandeur aux concentrations retrouvées dans l'eau et dans les sédiments (Philips, 1995). Les bivalves étant des organismes se nourrissant par filtration, la plupart des seuils de toxicité observés sont similaires ou inférieurs aux niveaux de métaux reportés dans des régions contaminées.

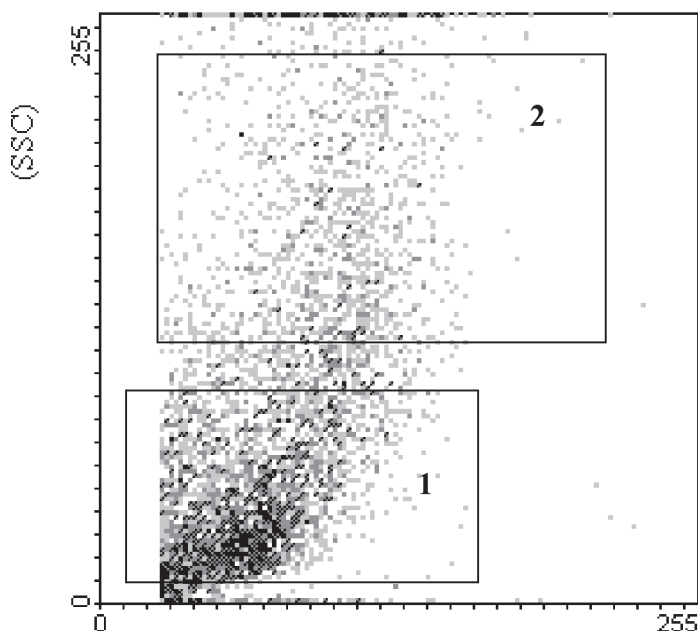
Chez ces organismes, les hémocytes circulant dans l'hémolymphe représentent la composante principale du système immunitaire. Il existe plusieurs types d'hémocytes identifiés par leur taille ou leurs colorations respectives. Ceux-ci représentent une population morphologiquement hétérogène constituée d'au moins deux sous-populations tel que déterminé par caractérisation enzymatique et morphologique chez la palourde *Chamelea gallina* (Pampanin *et al.*, 2002) et chez l'huître *Crassostrea virginica* (Bachere *et al.*, 1988). Les granulocytes représentent entre 80 et 85 % des hémocytes ; sont de petites cellules granulaires avec un petit noyau. Quant aux hyalinocytes, ils sont agranulaires, avec un noyau central entouré par peu de cytoplasme (Pampanin *et al.*, 2002). Deux sous-populations d'hémocytes sont repérables par cytométrie de flux chez plusieurs autres espèces de bivalves (Brousseau *et al.*, 2000 ; Fournier *et al.*, 2001). La première sous-population représente environ 85 % des hémocytes. Elle se compose de cellules morphologiquement semblables en termes de taille et de complexité qui correspondent probablement aux granulocytes. La seconde représente une sous-population hétérogène correspondant probablement aux hyalinocytes (Brousseau *et al.*, 2000 ; Fournier *et al.*, 2001) (figure 9.1). En effet, les hyalinocytes sont relativement hétérogènes en termes de taille, ayant des diamètres variant de 4 à 17 μm (Bachere *et al.*, 1988).

Une évaluation parallèle du compte leucocytaire et du phénotypage a été considérée comme étant un bon indicateur pour des immunotoxiques potentiels (Luster *et al.*, 1992 ; 1993). En effet, une augmentation du nombre d'hémocytes a été notée suite à une exposition *in vivo* à un stress thermique (Renwraantz, 1990), à un pathogène (Anderson *et al.*, 1992 ; Oubella *et al.*, 1993) ou à des xénobiotiques (Renwraantz, 1990 ; Anderson *et al.*, 1992 ; Coles *et al.*, 1994). Cependant, les études de Suresh et Mohandas (1990) témoignent du phénomène inverse. Le nombre d'hémocytes circulant diminuerait suite à une exposition à des concentrations élevées de contaminants. Ces niveaux de contaminants ne sont, par contre, pas rencontrés dans l'environnement. Sami *et al.* (1992) ont aussi démontré que le pourcentage et la taille relative des petits hémocytes de l'huître *Crassostrea virginica* pouvaient être modulés par une exposition *in situ* aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Nous croyons que le profil des hémocytes par cytométrie de flux a un bon potentiel pour être utilisé comme biomarqueur efficace d'exposition.

Chez les coelomates métazoaires comme les mollusques, les hémocytes représentent la première ligne de défense. Ces cellules sont capables d'exécuter plusieurs fonctions immunes comme la phagocytose (Lopez *et al.*, 1997 ; Beaven et Paynter, 1999) et la cytotoxicité par le biais de la production d'intermédiaires de réactifs d'oxygène (Anderson *et al.*, 1992 ; Pipe, 1992).

Figure 9.1

Diagramme de points de la dispersion en taille (FSC) et en complexité (SSC) d'une population d'hémocytes de myes (*Mya arenaria*)



Il a été observé que des expositions du mollusque bivalve (*Mercenaria mercenaria*) au phénol réduisaient l'activité phagocytaire des hémocytes (Fries et Tripp, 1980) quoique des expositions à long terme au benzo(a) pyrène, au pentachlorophénol et à l'hexachlorobenzène stimuleraient faiblement la phagocytose (Anderson, 2001). Bouchard *et al.* (1999) ainsi que l'équipe du D^r Fournier (tableau 9.2) ont démontré que la phagocytose diminuait avec des doses croissantes de tributylétain (TBT) et dedibutylétain (DBT). La toxicité du butylétain sur les hémocytes des quatre espèces *Mytilus edulis*, *Mya arenaria*, *Spisula polynima* et *Mactromeris polynyma* était la suivante : MBT < TBT < DBT. La comparaison de la sensibilité relative des espèces a démontré que la moule bleue (*Mytilus edulis*) était plus tolérante que les autres espèces étudiées aux composés de butylétain .

Des recherches effectuées sur la phagocytose de plusieurs espèces de bivalves marins et d'eau douce ont démontré pour les hémocytes de toutes les espèces étudiées une courbe classique de la toxicité *in vitro* du mercure : 1) absence de cytotoxicité et stimulation de la phagocytose ;

2) absence de cytotoxicité et phagocytose normale ; 3) cytotoxicité due au métal relativement faible et inhibition dramatique de la phagocytose ; 4) cytotoxicité relativement élevée accompagnée d'une inhibition drastique de la phagocytose (Sauvé *et al.*, 2002b ; Brousseau *et al.*, 2000). Il semblerait que le cadmium et le zinc aient, comme le mercure organique et inorganique, le potentiel d'induire une stimulation de la phagocytose chez certaines espèces de bivalves (Sauvé *et al.*, 2002b ; Brousseau *et al.*, 2000). La stimulation de la phagocytose à de basses concentrations de métaux a déjà été observée chez des rongeurs, reptiles, oiseaux, poissons, bovins, baleines et primates (Dieter *et al.*, 1983 ; Voccia *et al.*, 1994 ; De Guise *et al.*, 1996). Cependant, aucune stimulation de la phagocytose n'a été observée chez la palourde (*Mya arenaria*) exposée *in vivo* à de faibles doses des deux formes de mercure (Fournier *et al.*, 2001).

Tableau 9.2

Concentrations inhibant de 50 % la phagocytose effectuée par des hémocytes de myes (*Mya arenaria*), de moules bleues (*Mytilus edulis*) et de mactres (*Spisula polynima*) exposés à divers composés de butylétain

Substance	CI 50 (10 ⁻⁵ M)		
	Mye	Moule	Mactre
MBT	n.d.	100	n.d.
DBT	0,08	5,00	0,23
TBT	0,45	5,00	0,38

Il est très intéressant de noter que la toxicité *in vitro* du MeHgCl et du HgCl₂ est très similaire pour certaines espèces (*C. siliqua*, *M. truncata*, *E. complanata* et *D. polymorpha*) (Sauvé *et al.*, 2002b). Le mercure organique est beaucoup plus toxique que la forme inorganique pour plusieurs espèces sauvages (Fournier *et al.*, 2000b), incluant les bivalves (Brousseau *et al.*, 2000). Par exemple, une étude exposant *Mya arenaria* à différentes concentrations de mercure *in vivo* a démontré que des doses de 10⁻⁶ M de HgCl₂ n'induisaient aucune différence dans la viabilité cellulaire avant le 28^e jour d'exposition, tandis que le CH₃HgCl s'est révélé cytotoxique à 10⁻⁶ M à partir du 14^e jour d'exposition (Fournier *et al.*, 2001). De plus, la phagocytose a été diminuée de façon significative seulement après 28 jours d'exposition à 10⁻⁶ M de HgCl₂, alors qu'une suppression de la phagocytose a été induite par le méthylmercure à 10⁻⁶ M après sept jours d'exposition. L'expérience a dû être arrêtée au jour 21 car les organismes démontraient des signes évidents de maladie. Des résultats démontrent clairement une prépondérance de la bioaccumulation du CH₃HgCl *vs* le HgCl₂ (Watras et Bloom, 1992 ; Inza *et al.*, 1997). La comparaison des seuils

de toxicité *in vitro* du mercure organique et inorganique suggère que certaines espèces de bivalves pourraient métaboliser ou assimiler le mercure par différents processus et conséquemment ne pas démontrer la même réponse ou sensibilité relative pour chaque forme de mercure (Sauvé *et al.*, 2002b).

Les concentrations requises pour obtenir 50 % et 10 % d'inhibition (CI50 et CI10) sont de bons indicateurs des concentrations dans l'hémolymphe représentant un risque potentiel pour les bivalves (Sauvé *et al.*, 2002b). Des travaux subséquents sont requis pour déterminer si la sensibilité exceptionnelle au méthylmercure *in vitro* (tableau 9.1), démontrée par la très faible valeur du CI chez des hémocytes d'une dizaine d'espèces de bivalves, peut être reliée à la maturation cellulaire, à la spécialisation fonctionnelle et/ou à d'autres caractéristiques (Sauvé *et al.*, 2002b ; Brousseau *et al.*, 2000). Les valeurs des IC ont varié de presque de deux ordres de grandeur entre ces différentes espèces (Sauvé *et al.*, 2002b). Cette variation ne peut être attribuable aux différents milieux dont proviennent les espèces, soit l'environnement marin ou d'eau douce. En effet, les deux espèces d'eau douce étudiées représentaient parfois l'espèce la plus et la moins sensible à un métal donné. Par exemple, *E. complanata* est une des espèces étudiées les moins sensibles au méthylmercure, tandis que *D. polymorpha* est une des plus sensibles. Aussi, la sensibilité des hémocytes aux différents métaux varie considérablement. Par exemple, la sensibilité moyenne pour les bivalves peut être classée en toxicité croissante selon : $\text{ZnCl}_2 < \text{CdCl}_2 < \text{AgNO}_3 < \text{HgCl}_2 < \text{CH}_3\text{HgCl}$. Ceci met l'accent sur le besoin d'utiliser des organismes appropriés et pertinents dans l'évaluation du risque écotoxicologique et prône la prudence lors d'utilisation d'espèces de remplacement (Sauvé *et al.*, 2002b).

Des comparaisons des effets *in vitro* et *in vivo* de HgCl_2 , CH_3HgCl et CdCl_2 sur les fonctions des hémocytes ont été effectuées dans notre laboratoire (Fournier *et al.*, en préparation). Les courbes dose-réponse *in vitro* et *in vivo* étaient similaires, mais les valeurs des CI de la phagocytose différaient de plusieurs ordres de grandeur. Toutefois, les ratios des CI *in vivo*/*in vitro* obtenus pour chaque métal étaient presque identiques, laissant supposer que le modèle d'exposition *in vitro* est représentatif de l'exposition *in vivo*.

Le contenu en lipides et en protéines des glandes digestives a été mesuré chez des palourdes (*Mya arenaria*) exposées *in vivo* à différentes concentrations de mercure organique et inorganique. Aucune différence dans le contenu des lipides et des protéines n'a été notée pour les différents traitements sauf pour les animaux morts exposés aux plus fortes concentrations (Fournier *et al.*, 2001). Le fait qu'aucun effet significatif sur la condition physiologique et sur les réserves emmagasinées dans les

glandes digestives et dans le manteau n'ait été observé alors que la phagocytose était diminuée indique que les paramètres immunologiques telle la phagocytose pourraient être annonciateurs d'un effet délétère suite à une exposition *in vivo* à différents composés de mercure.

La production de dérivés oxygénés (principalement des radicaux superoxydes) par les hémocytes joue un rôle important dans la destruction d'agents étrangers chez les invertébrés (Adema *et al.*, 1991). L'exposition d'invertébrés à des concentrations élevées de métaux lourds inhibe cette production (Anderson *et al.*, 1992). Cependant, à des concentrations mesurées dans l'environnement il n'y aurait pas d'effet sur ce paramètre (Anderson *et al.*, 1992; Coles *et al.*, 1995). Il est intéressant de noter qu'une exposition à des concentrations élevées de fluoreanthène stimulerait la production de radicaux superoxydes chez la moule bleue (Coles *et al.*, 1994). Ces résultats inverses peuvent être dus à une interaction spécifique entre le contaminant impliqué (un métal ou un composé organique) et le patron de production de dérivés oxygénés, ou encore aux mécanismes de défenses induits contre le stress oxydatif (Pipe et Coles, 1995).

Plusieurs contaminants ou produits chimiques affectent le relargage et l'activité des enzymes lysosomales. Les résultats obtenus varient en fonction du type d'enzyme et du niveau d'exposition considéré. Le stress toxique subi par l'organisme suite à une exposition peut conduire dans plusieurs cas à une augmentation du relargage et de l'activité de certaines enzymes et/ou réduire ces activités pour d'autres (Pickwell et Steinert, 1984; Cheng et Dougherty, 1989).

Pipe et Cole (1995) ont tenté d'établir une corrélation entre la réponse de différents biomarqueurs immunologiques et la présence de plusieurs contaminants chez les moules méditerranéennes (*Mytilus galloprovincialis*) vivant dans différentes sections de la lagune de Venise. Les biomarqueurs retenus sont : le compte des différents hémocytes, la phagocytose, le niveau d'enzymes lysosomales et la production de dérivés oxygénés. Les contaminants mesurés incluent dix métaux et trois formes de molécules organochlorées dont des BPC. Tous les paramètres mesurés présentent des fluctuations saisonnières. Dans plusieurs cas, une corrélation a été observée entre la réponse immunologique des différents biomarqueurs et la concentration de contaminants mesurée dans les tissus des moules. De plus, les hémocytes éosinophiles semblent plus abondants à de faibles concentrations de métaux alors que le nombre total d'hémocytes circulants augmente fréquemment aux sites fortement contaminés. Une tendance à l'inhibition de l'activité phagocytaire a été observée chez des mollusques exposés à des concentrations élevées de métaux, un phénomène également rencontré lors d'expositions aux HAP. Une corrélation entre la production de dérivés oxygénés et de faibles concentrations de contaminants organiques a également été notée.

Plusieurs résultats indiquent clairement que des facteurs autres que le niveau de contamination, particulièrement les saisons, modulent les fonctions du système immunitaire chez les organismes vivant dans un milieu naturel. Cette situation complique d'autant plus l'interprétation des résultats.

2.5. CONCLUSION

En nous basant sur les données de la littérature évoquées jusqu'à présent, nous pouvons dire que l'information disponible sur l'immunologie des invertébrés est difficile à intégrer afin d'en extraire un schéma global de réponse immunitaire, à cause de la très grande diversité de ces organismes. En second lieu, nous pouvons affirmer qu'en ce qui concerne les méthodes de détection des différentes réponses immunitaires, les tests couramment utilisés avec les espèces classiques, comme les rongeurs, peuvent être adaptés relativement facilement aux invertébrés et en particulier aux vers de terre et aux mollusques bivalves. Finalement, malgré le fait que peu de travaux concernant les bio-indicateurs d'immunotoxicité chez les invertébrés ont été publiés, il est intéressant de constater que la phagocytose, chez les vers de terre du moins, semble beaucoup moins efficace suite à des expositions *in vivo* et/ou *in vitro* à plusieurs xénobiotiques, comme c'est le cas chez beaucoup d'autres espèces (Flipo *et al.*, 1992 ; Fournier *et al.*, 1992 ; Voccia *et al.*, 1994). En combinant le fait que la phagocytose se révèle une réponse sensible face aux xénobiotiques de l'environnement avec le rôle critique que joue cette fonction dans l'élaboration de plusieurs réponses immunitaires, ceci en fait actuellement un bio-indicateur de choix chez les invertébrés. Il n'en demeure pas moins que les autres réponses semblent avoir beaucoup de potentiel, sauf qu'il est encore trop tôt pour conclure sur leur sensibilité, étant donné le peu d'information disponible sur chacune d'elles.

3. IMMUNOTOXICOLOGIE DES AMPHIBIENS

3.1. INTRODUCTION

Les amphibiens sont considérés comme les premiers vertébrés à avoir effectué la transition d'une vie aquatique à une vie terrestre. Le système immunitaire est un des systèmes ayant évolué pendant cette transition. En effet, les mammifères et les amphibiens ont des systèmes d'immuno-régulation qui leur sont propres même s'ils sont relativement proches dans l'arbre phylogénétique. La majorité des études portant sur le système immunitaire des amphibiens ont été effectuées avec l'espèce *Xenopus laevis*. Les éléments décrits dans la section suivante résumeront les connaissances actuelles propre à cette espèce.

3.2. LA STRUCTURE DU SYSTÈME IMMUNITAIRE

3.2.1. Le thymus et les lymphocytes T

Le rôle principal du thymus est de produire des lymphocytes T. Toutefois chez les têtards, les lymphocytes T sont fabriqués dans d'autres organes lymphoïdes pour ensuite migrer vers le thymus et le coloniser. En effet, les cellules souches lymphocytaires sont produites dans un îlot ventral et dans la plaque dorsale du mésoderme. Pour le moment, il est encore difficile de comprendre les fonctions exactes des cellules produites dans ces organes lymphoïdes. Elles sont probablement une population de cellules transitoires migrant vers le thymus et se différenciant ensuite en cellules accessoires ou en thymocytes (Du Pasquier *et al.*, 1989).

Tout comme chez les mammifères, il existe deux types de lymphocytes T chez les Anoures : les CD4, qui activent d'autres cellules via leur récepteur T, et les CD8, qui tuent les cellules infectées par des virus. Toutefois, il existe des différences entre les lymphocytes T de grenouilles adultes et ceux de têtards. Premièrement, les lymphocytes T de têtards ne possèdent pas de complexes d'histocompatibilités majeurs de classe II (CMH-II) à leur surface, contrairement à ceux des grenouilles adultes. Ce n'est qu'après la métamorphose que le thymus est repeuplé avec une deuxième vague de lymphocytes possédant des CMH-II (Rollins-Smith, 1998). Deuxièmement, les lymphocytes de têtards ne fabriquent pas l'équivalent de l'interleukine-2 retrouvée chez les mammifères (Rollins-Smith, 1998). Cette molécule est surtout importante dans le développement d'une réponse immunitaire acquise, ce qui laisserait suggérer que les têtards ne sont pas capables de bâtir une réponse immunitaire acquise aussi efficace que celle des grenouilles adultes.

3.2.2. La rate et les lymphocytes B

Chez les grenouilles, la rate possède à la fois des caractéristiques d'organes lymphoïdes primaires et secondaires (Manning, 1991). Elle assure l'activation des lymphocytes et d'hématopoïèse pour les lymphocytes, les granulocytes et les érythrocytes (Manning, 1991). Toutefois, les lymphocytes n'y prolifèrent pas en agglomérations serrées comme dans les centres germinaux des mammifères (Manning, 1991). Il est donc probable que la sélection des lymphocytes B, possédant des immunoglobulines de haute affinité, ne se fait pas aussi facilement que chez les mammifères possédant des centres germinaux (voir ci-après).

3.2.3. Autres organes lymphoïdes

Il existe certains organes lymphoïdes chez les grenouilles qui ne sont pas présents chez les mammifères. Ces organes peuvent être des sites d'hémostase ou d'activation des lymphocytes. En effet, il existe des nodules lymphoïdes dans les intestins des Anoures adultes. Ces nodules sont très riches en lymphocytes B et en plasmocytes produisant les anticorps IgM et IgX (Du Pasquier *et al.*, 1989). De plus, le foie semble jouer un rôle très important dans la production des lymphocytes B et dans la séquestration des antigènes (Hansen et Zapata, 1998 ; Du Pasquier *et al.*, 1989).

3.3. L'IMMUNITÉ INNÉE

La réponse immunitaire innée procure à l'organisme une protection rapide et non spécifique. La capacité de fabriquer des peptides antimicrobiens est une des composantes de cette réponse immunitaire (Mor *et al.*, 1991). Le mécanisme d'action de ces molécules n'a toutefois pas été bien étudié. Nous savons seulement que les amphibiens ont la capacité, après la métamorphose, de fabriquer de petits peptides antimicrobiens, comme les magainines, à la surface de leur peau et dans leur voie gastrointestinale (Mor *et al.*, 1991). Ces peptides sont utilisés comme une des premières barrières de résistance contre différents pathogènes retrouvés dans l'environnement (Mor *et al.*, 1991).

Tout comme les autres vertébrés, les amphibiens possèdent des cellules phagocytaires (macrophages et neutrophiles), capables d'ingérer des pathogènes (Carey *et al.*, 1999). Ils possèdent aussi un système du complément pouvant attaquer des bactéries indirectement, via l'activation de la voie alternative, ou directement avec l'action des anticorps via la voie classique (Carey *et al.*, 1999).

Les cellules NK sont une autre composante importante de la réponse immunitaire innée. Ces cellules reconnaissent et tuent les cellules cancéreuses et celles infectées par des virus et des pathogènes intracellulaires. Elles reconnaissent plus spécifiquement les cellules déficientes dans la présentation des CMH-I à leur surface. Les cellules NK semblent n'apparaître qu'après la métamorphose chez les Anoures (Robert et Cohen, 1998). L'absence de ces cellules chez les têtards n'est pas surprenante puisque les molécules de CMH-I ne sont présentes que chez les grenouilles adultes. En effet, si les NK étaient présentes chez les animaux ne possédant pas de CMH-I, les têtards pourraient subir une réponse auto-immune (Horton *et al.*, 1998). Ainsi, même si les têtards ont une forme de résistance aux tumeurs, l'absence de cellules NK les rend probablement beaucoup plus sensibles à différents types de cancers et d'infections virales que les grenouilles adultes (Horton *et al.*, 1998).

3.4. L'IMMUNITÉ ACQUISE

La réponse immunitaire acquise apparaît quelque temps après la détection d'antigènes étrangers. Elle est hautement spécifique pour un pathogène en particulier et permet la formation de cellules mémoires, capables de reconnaître rapidement l'antigène auquel le corps avait été préalablement exposé. Les amphibiens possèdent une bonne réponse immunitaire acquise, bien qu'elle soit moins rapide et moins spécifique que celle observée chez les mammifères.

3.4.1. Le complexe majeur d'histocompatibilité

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité sont présentes sur les cellules présentatrices d'antigènes et sont très importantes dans l'activation des lymphocytes T. Les CMH-I présentent les antigènes aux cellules CD8 alors que les CMH-II présentent les antigènes aux cellules CD4. La distribution des CMH-I et II change lors de la métamorphose (Kaufman *et al.*, 1990). En effet, chez les têtards les CMH-II sont présents sur les cellules du stroma, les lymphocytes B, les macrophages et certaines cellules de la peau. Après la métamorphose, ils apparaissent sur les thymocytes et les lymphocytes T (Kaufman *et al.*, 1990). Quant aux CMH-I, ils sont absents lors du stade larvaire et apparaissent à la surface de la plupart des cellules après la métamorphose (Kaufman *et al.*, 1990). Puisque ces molécules sont absentes chez les têtards, il est peu probable que les lymphocytes T cytotoxiques (CD8), spécifiques aux CMH-I, soient présents chez ces animaux. On ne comprend pas encore très bien pourquoi les têtards ne possèdent pas de CMH-I. Certains croient qu'elles sont absentes chez les têtards parce que le nombre de lymphocytes présents est trop petit, alors que d'autres postulent que l'absence de ces molécules empêcherait la destruction de cellules adultes, étrangères aux lymphocytes larvaires, lors de la métamorphose (Du Pasquier *et al.*, 1998).

3.4.2. Les immunoglobulines

Les grenouilles possèdent seulement trois types d'immunoglobulines : IgM, IgY et IgX (Rollins-Smith, 1998). Les IgM sont présents à de fortes concentrations dans le plasma et sont les premiers anticorps fabriqués lors d'une réponse immunitaire (Du Pasquier *et al.*, 1998). Ils sont nombreux mais ont peu d'affinités. Les IgY, quant à eux, sont l'équivalent des IgG retrouvés chez les mammifères (Du Pasquier *et al.*, 1998). Ils constituent la deuxième vague d'anticorps fabriqués, ont beaucoup d'affinités pour leurs antigènes et sont impliqués dans les réponses immunitaires acquises (Du Pasquier *et al.*, 1998). Finalement, on retrouve les IgX sur les lymphocytes B présents dans les voies gastrointestinales (Du Pasquier *et al.*, 1998). Leur rôle n'est pas encore très bien compris, mais ils correspondent probablement aux IgA retrouvés dans les muqueuses des mammifères.

3.4.3. La diversité des anticorps dans la réponse humorale

Chez les amphibiens, la réponse humorale est moins efficace que celle qu'on observe chez les mammifères. Les anticorps fabriqués suite à une exposition à différents antigènes semblent avoir moins d'affinités que les anticorps de mammifères (Hsu, 1998). De plus, cette affinité ne semble pas augmenter avec le temps ou lors d'une seconde exposition au même antigène (Mor *et al.*, 1991). Le répertoire d'anticorps des amphibiens semble donc moins diversifié que celui des mammifères. Toutefois, la diversité des anticorps créée par la recombinaison des régions V, D, J et C des gènes d'immunoglobulines est aussi efficace que chez les mammifères (Mor *et al.*, 1991). De plus, les amphibiens possèdent les enzymes de recombinaison RAG (*recombination activating genes enzymes*) et transférase-terminale ou TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*), contribuant à la diversité des anticorps (Flajnik, 1996). Le manque de diversité des anticorps et d'efficacité de la réponse humorale n'est donc pas dû au manque d'hypermutations et de recombinaisons. Il semble plutôt qu'une mauvaise sélection des anticorps ayant une haute affinité soit l'explication de ce phénomène (Hsu, 1998). Chez les mammifères, la sélection des anticorps de haute affinité est effectuée dans les centres germinaux. Cependant, les Anoures ne possèdent pas ces structures particulières. Il est donc probable qu'il n'existe pas de région spécifique chez les Anoures pour effectuer une telle sélection. Ainsi, même si des anticorps de haute affinité sont créés, ils ne peuvent pas être adéquatement sélectionnés pour ensuite proliférer et développer une défense humorale efficace (Hsu, 1998).

3.5. LA TOLÉRANCE

La tolérance est l'absence de réponse contre un antigène. La tolérance aux antigènes du soi est une caractéristique essentielle du système immunitaire ; lorsque la tolérance est perdue, le système immunitaire peut détruire l'organisme. Le processus de tolérance est bien contrôlé chez les Anoures. Avant la métamorphose, le système immunitaire des têtards est très tolérant. Il est d'ailleurs assez facile d'effectuer des greffes chez les têtards sans conséquences désastreuses, puisque le système immunitaire des têtards ne peut pas faire la différence entre les CMH du soi et du non-soi lorsque ceux-ci sont très peu différents (Du Pasquier *et al.*, 1998). Toutefois après la métamorphose, lorsque la deuxième vague de lymphocytes T envahit le thymus, une tolérance beaucoup plus efficace se développe (Du Pasquier *et al.*, 1998). Le système immunitaire est alors capable de reconnaître spécifiquement les antigènes du soi et du non-soi afin de mettre en place une réponse immunitaire efficace.

3.6. LES CHANGEMENTS DANS LE SYSTÈME IMMUNITAIRE LORS DE LA MÉTAMORPHOSE

Pour survivre de façon autonome dans un environnement aquatique, les têtards doivent accélérer le développement de chacun de leurs organes afin qu'ils soient fonctionnels le plus rapidement possible (Flajnik *et al.*, 1987). La rapidité, privilégiée au détriment de la complexité, fait en sorte que certains organes et systèmes ne se développent pas complètement (Flajnik *et al.*, 1987). Le système immunitaire est un de ces systèmes. En effet, bien que les têtards aient un système immunitaire compétent capable de les protéger contre d'éventuels pathogènes (Rollins-Smith, 1998), il est moins développé que chez les grenouilles adultes.

Contrairement à l'embryogenèse, la métamorphose implique la perte et le remplacement subséquent de différents organes et fonctions. Lors de cette période, les têtards acquièrent donc plusieurs antigènes adultes suite à l'apparition de nouvelles structures (Just *et al.*, 1977 ; Morris, 1987 ; Ellison *et al.*, 1985 ; Wahli *et al.*, 1981). Toutefois, leur système immunitaire ne reconnaît pas ces antigènes comme faisant partie du soi. Il serait donc théoriquement possible qu'une réponse auto-immune contre ces antigènes se développe. Afin d'éviter une telle réponse, le développement du système immunitaire des Anoures se produit en deux étapes (Rollins-Smith, 1998). Lorsque les têtards arrivent à la métamorphose, leur système immunitaire est supprimé afin d'empêcher une réponse auto-immune contre les nouveaux antigènes adultes. En fait, le nombre de lymphocytes dans la rate, le thymus et le foie diminue d'environ 40 % lors de la métamorphose (Rollins-Smith, 1998). Cette baisse semble causée par une augmentation dans l'organisme de la concentration d'hormones cortico-stéroïdes, induisant l'apoptose (Rollins-Smith, 1998). Suite à cette perte de lymphocytes T, le thymus est ensuite recolonisé par une seconde vague de lymphocytes qui, cette fois, persistent et sont tolérants aux antigènes adultes (Rollins-Smith, 1998).

3.7. SENSIBILITÉ DES AMPHIBIENS À DIFFÉRENTS PATHOGÈNES LORS DE LA MÉTAMORPHOSE

Le système immunitaire des Anoures se réorganise donc complètement lors de la métamorphose. Il y a une perte importante de lymphocytes ainsi que l'apparition de plusieurs nouvelles cellules et structures. La perte temporaire de lymphocytes pendant cette période peut rendre les animaux plus sensibles à différents pathogènes. Dans des conditions normales, le système immunitaire des animaux serait capable de les protéger pendant cette période et il est possible que la perte de lymphocytes soit accentuée dans de mauvaises conditions environnementales. Dans un tel cas, les

animaux deviendraient plus sensibles à différentes maladies. Il est donc important d'étudier l'effet de différents stress environnementaux sur le système immunitaire des amphibiens pendant cette période critique de leur existence.

3.8. EFFETS TOXIQUES DES PRODUITS CHIMIQUES SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE DES AMPHIBIENS

Plusieurs disparitions locales d'amphibiens ont été associées à différents types d'infections par des pathogènes opportunistes (Worthylake et Hovingh, 1989; Carey, 1993; Cunningham *et al.*, 1996; Berger *et al.*, 1998; Carey, 2000). Une suppression directe ou indirecte du système immunitaire par des contaminants environnementaux pourrait expliquer en partie ce phénomène. Certains polluants pourraient empêcher les amphibiens de développer une réponse immunitaire adéquate contre différents pathogènes, en supprimant leur système immunitaire. Il est déjà connu que certains agents stressants, comme les rayons ultraviolets (Kiesecker *et al.*, 1995; 2001) et le froid (Cooper *et al.*, 1992; Maniero et Carey, 1997), peuvent causer une telle immunodépression. Toutefois, les effets immunotoxiques des pesticides à des concentrations retrouvées dans l'environnement ne sont pas encore très bien connus. En effet, la majorité des études immunotoxicologiques ont été faites avec d'autres types d'animaux comme les rongeurs (Sharma et Reddy, 1987) ou les poissons (Karen *et al.*, 1996; O'Halloran *et al.*, 1996). Seulement quelques études ont été effectuées afin d'essayer de déterminer les effets des contaminants environnementaux sur le système immunitaire des amphibiens.

Certaines études ont déjà démontré que les pesticides organochlorés ont la capacité d'inhiber, chez les mammifères, la chémotaxie des neutrophiles (Hermanoswicz et Kassman, 1984) ainsi que certaines fonctions immunitaires des macrophages et des lymphocytes en culture (WHO, 1986). Les effets de ces polluants sur le système immunitaire des amphibiens n'ont pas encore été étudiés en détail. Cependant, Gromysz-Kalkowaska et Szubartowska (1993) ont démontré qu'un pesticide appartenant aux organochlorés, le tetrachlorinfos, avait la propriété de moduler la concentration de leucocytes dans le sang des amphibiens. Des grenouilles *Rana temporaria* exposées à des concentrations de 12,5 mg/kg et plus subissaient une baisse importante du nombre de lymphocytes et de basophiles, ainsi qu'une hausse du nombre de neutrophiles. On ne comprend pas très bien le mécanisme par lequel ce pesticide abaisse les niveaux de certains leucocytes. Il est possible qu'il attaque les cellules directement, en lysant leurs membranes, ou indirectement, en induisant la sécrétion d'hormones corticostéroïdes, qui elles-mêmes pourraient activer des nucléases plasmatiques (Gromysz-Kalkowaska et Szubartowska,

1993). Le mécanisme par lequel cet organochloré pourrait accroître le nombre de neutrophiles est toutefois plus clair. Il a été observé chez des grenouilles provenant de sites contaminés que cette augmentation s'accompagnait souvent de l'apparition d'un grand nombre de neutrophiles immatures (Chernyskova et Starostin, 1994). Il est donc fortement probable que ce pesticide, ainsi que d'autres, a la propriété de perturber le cycle de différenciation des neutrophiles et même d'endommager les cellules souches (Chernyskova et Starostin, 1994). Ceci impliquerait alors que le nombre de neutrophiles dans le sang serait plus élevé, mais que ces cellules seraient moins matures et moins efficaces contre les pathogènes.

Lorsque les lymphocytes, les éosinophiles et les neutrophiles sont affectés, il y a une augmentation des risques d'infection par différents parasites, bactéries ou même virus. Sharon *et al.* (1999) ont démontré qu'un autre pesticide faisant partie de la classe des organophosphorés, le malathion, avait la propriété de diminuer la résistance de certains crapauds à une bactérie, *Aeromonas hydrophila*, responsable de la maladie des jambes rouges. Cette maladie a été la cause d'une importante mortalité chez les amphibiens. Le groupe de Sharon a exposé les animaux à deux concentrations de pesticides et leur a par la suite injecté la bactérie. Cette équipe a constaté que les animaux exposés aux pesticides (forte et faible dose) mouraient plus facilement et développaient plus souvent les signes cliniques de la maladie, comme l'hépatomégalie, que les animaux non exposés. De plus, la bactérie ne pouvait être isolée que chez les animaux exposés (Sharon *et al.*, 1999). Il semble donc que l'exposition aux pesticides a affecté le système immunitaire de ces animaux et les a rendus ainsi plus sensibles à une infection par un pathogène.

Les métaux lourds sont aussi des polluants retrouvés fréquemment dans l'environnement et susceptibles de diminuer la qualité des écosystèmes aquatiques. Le mercure est considéré comme un des polluants les plus toxiques à travers le monde. Il peut causer différents troubles au niveau du développement et du système nerveux chez plusieurs espèces d'animaux. Les effets délétères de ce contaminant sur le système immunitaire des amphibiens n'ont pas encore été beaucoup étudiés. Jelason *et al.* (1997) ont démontré que le mercure pouvait moduler les niveaux d'expression de l'interleukine-1b (IL-1b), une cytokine activant plusieurs réponses immunitaires. Cette molécule est aussi présente dans le système nerveux lors du développement embryonnaire des amphibiens et des mammifères. Il a été observé que chez les embryons de *Xenopus laevis* il y avait une diminution des niveaux d'IL-1b dans les ganglions crâniens, suite à une exposition au méthylmercure. Il est possible que le méthylmercure diminue l'expression de cette molécule en empêchant la synthèse des protéines. Il est aussi probable que ce métal affecte la physiologie des membranes cellulaires et empêche ainsi le transport de l'IL-1b dans les

cellules des ganglions (Jelaso *et al.*, 1997). Dans un cas comme dans l'autre, la diminution des niveaux d'IL-1b peut avoir d'importantes répercussions sur le développement d'une réponse immunitaire adéquate et ainsi rendre les animaux plus sensibles aux pathogènes de l'environnement.

Tout comme le méthylmercure, le cadmium est un métal lourd pouvant moduler la réponse immunitaire. À de faibles concentrations, le cadmium semble avoir des propriétés immunostimulantes chez les têtards : il a la propriété d'accroître spontanément le nombre de lymphocytes B (Zettergren *et al.*, 1991). De plus, ce métal semble augmenter la réponse humorale des têtards. En effet, il a été observé que les animaux exposés au cadmium et sensibilisés par la suite avec des érythrocytes de mouton avaient un taux plus élevé d'anticorps contre les antigènes d'érythrocytes de mouton (Zettergren *et al.*, 1991). La raison pour laquelle le cadmium a la propriété de stimuler le système immunitaire est encore peu comprise. Il est possible que ce métal soit capturé et associé à une protéine semblable aux métallothionéines des mammifères.

Les résultats des différentes études immunotoxicologiques faites sur des amphibiens démontrent clairement que ce groupe d'animaux peut être affecté par différents polluants environnementaux. Il est important de poursuivre ces recherches puisque les amphibiens peuvent être des organismes bio-indicateurs représentant la santé globale de l'environnement.

3.9. EFFETS IMMUNOTOXIQUES D'UN MÉLANGE DE PESTICIDES SUR LES GRENOUILLES

Les résultats des études de laboratoire décrites dans la section précédente peuvent être difficiles à corrélérer avec ce qui se produit dans l'environnement. En effet, les contaminants ont majoritairement été testés individuellement et non en mélange. Le laboratoire du D^r M. Fournier (INRS-Institut Armand-Frappier, Québec, Canada) a donc vérifié si l'effet d'un mélange de pesticides (atrazine, métribuzine, endosulfane, lindane, dieldrine, aldicarb) retrouvé dans l'environnement pouvait avoir un effet sur le système immunitaire de deux espèces de grenouilles : *Rana pipiens* et *Xenopus laevis*.

Lors de cette étude, cette équipe a noté une différence de sensibilité entre les systèmes immunitaires des deux espèces étudiées. En effet, les *Rana pipiens* semblent moins sensibles aux pesticides étudiés que les *Xenopus laevis*. Deux hypothèses peuvent être émises pour tenter d'expliquer ces différences, mais les causes exactes demeurent incomprises. La première hypothèse est que les grenouilles *R. pipiens* n'ont été exposées aux pesticides que 16 heures par jour comparativement aux 24 heures d'exposition auxquelles les *X. laevis* étaient soumises. La deuxième

hypothèse est, étant donné que l'espèce *R. pipiens* est indigène, qu'il est possible que les grenouilles aient développé une certaine tolérance aux pesticides à la suite d'expositions répétées dans l'environnement. Des études plus approfondies seraient toutefois requises afin de déterminer si les *R. pipiens* sont vraiment moins sensibles aux pesticides que les *X. laevis*.

Les résultats obtenus démontrent que certains pesticides utilisés en agriculture peuvent avoir un effet immunosuppresseur sur le système immunitaire des grenouilles. En effet, à des concentrations élevées, les pesticides avaient un effet sur le nombre de cellules présentes dans certains organes lymphoïdes, comme la rate. Pour le moment, nous ne savons pas si les pesticides influencent la production de ces cellules ou s'ils les tuent une fois qu'elles ont été fabriquées. Cette diminution du nombre de cellules dans la rate pourrait éventuellement mener à une réduction de l'efficacité du système immunitaire, ce qui rendrait les animaux plus sensibles à différents pathogènes. Le thème récurrent des épidémies chez les amphibiens pourrait donc s'expliquer en partie par le fait que le système immunitaire des animaux est affecté par la pollution.

Les résultats démontrent également dans les deux cas que les pesticides peuvent diminuer des compétences immunitaires de base comme la phagocytose et la prolifération des lymphocytes. Ces deux réponses sont très importantes lors d'une défense immunitaire et leur inhibition ou leur ralentissement peuvent avoir de graves conséquences. En effet, si les phagocytes ne sont pas capables d'ingérer des pathogènes, la destruction des corps étrangers ne pourra pas avoir lieu. Les pathogènes seront donc capables de se propager dans l'organisme, causant ainsi une septicémie. De plus, une diminution de la phagocytose réduira la présentation d'antigènes étrangers aux lymphocytes. Ceux-ci ne pourront pas être activés adéquatement et rapidement, ce qui ralentira le développement de la réponse immunitaire acquise. D'autre part, une suppression de la prolifération des lymphocytes empêchera leur division suite à un contact avec un antigène spécifique. Ainsi, l'expansion clonale ne pourra pas avoir lieu, et le nombre de lymphocytes se différenciant en cellules effectrices ne sera pas suffisant pour combattre l'infection de façon efficace. Donc, la diminution de ces deux réponses suite à une exposition à des pesticides aura comme conséquence finale de rendre les animaux plus sensibles à des infections par des pathogènes retrouvés dans l'environnement. Ce fait a été démontré par Gendron *et al.* (2003), qui ont observé chez des *Rana pipiens* exposées au même mélange de pesticides une augmentation de la virulence du ver pulmonaire *Rhabdias ranae*, illustrée par une altération des caractéristiques du cycle de vie et de la dynamique d'infection de ce parasite. Taylor *et al.* (1999) ont obtenu des résultats similaires avec des

crapauds (*Bufo woodhousi*) exposés à des doses sub-létales de malathion avant d'être infectés par la bactérie *Aeromonas hydrophila*, qui cause la maladie des jambes rouges chez les amphibiens.

Ces recherches démontrent à quel point il est important d'étudier les effets de la pollution environnementale sur le système immunitaire afin d'être en mesure de comprendre comment les polluants peuvent entraîner la disparition de certaines espèces. En effet, nos résultats indiquent que les pesticides peuvent accroître indirectement la sensibilité des amphibiens à différents pathogènes, en supprimant leur système immunitaire. Il est donc clair que la relation entre les polluants et le système immunitaire doit être étudiée plus en détail si nous voulons comprendre l'impact des pratiques agricoles sur les écosystèmes aquatiques.

4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Malgré la diversité des groupes, il y a un certain nombre d'analogies entre les systèmes immunitaires des animaux, tant vertébrés qu'invertébrés. En fonction de l'espèce ou du groupe considéré, les biomarqueurs immunologiques permettent de révéler les effets nuisibles liés aux expositions chroniques. Tout comme d'autres biomarqueurs, ils détectent les effets d'expositions simultanées à une multitude de contaminants. Cependant, comme il est impossible d'identifier le contaminant responsable de l'effet observé, il n'y a donc pas de réponse immune spécifique à un contaminant qui a été déterminé lors d'exposition mixte (en laboratoire ou dans l'environnement).

Les réponses immunologiques peuvent varier beaucoup. Des effets d'immunodépression ou d'immunostimulation peuvent être mesurés lors d'un essai ou d'essais différents. Les réponses sont souvent dépendantes du contaminant et des concentrations testées (faibles ou élevées). Par exemple, un contaminant peut stimuler la phagocytose à de faibles concentrations et l'inhiber aux concentrations élevées. Les réponses varient également selon les voies et le temps d'exposition, les saisons, l'âge et le sexe des animaux, le protocole utilisé, le stress des organismes, la complexité du système immunitaire en fonction des espèces étudiées, etc. (Brousseau *et al.*, 1998 ; Koller et Exon, 1985 ; Weeks *et al.*, 1992). Il apparaît donc important de bien standardiser les protocoles expérimentaux à l'aide de toxiques de référence si possible. Une attention particulière doit être portée aux sources de stress (capture, transport, collecte des échantillons, etc.) afin d'éviter d'induire des changements dans la réponse immunitaire chez les organismes manipulés ou les échantillons (tissus, cellules, etc.) utilisés pour les essais immunologiques. Une approche utilisant plusieurs biomarqueurs immunologiques devrait être privilégiée.

De plus, des méthodes de prélèvement non invasif sont préférables afin de diminuer le stress de l'intervention. L'emploi de biomarqueurs tels que les comptes et la caractérisation cellulaires, l'histologie, l'activité des cellules tueuses (NK), la phagocytose, sont quelques exemples figurant parmi plusieurs essais immunologiques qui permettent un diagnostic rapide des dysfonctionnements du système immunitaire. D'autres biomarqueurs tels que l'hypersensibilité retardée, l'activité des lymphocytes T, etc., sont plus précis pour mesurer les mécanismes impliqués dans la réponse immunitaire (Weeks *et al.*, 1992). Ces derniers cependant, semblent être sous-utilisés pour observer les effets des contaminants environnementaux. À plus long terme, la sensibilité aux pathogènes des organismes exposés aux contaminants devrait être intégrée à l'approche expérimentale. Les pathogènes utilisés dans cette approche devraient présenter une spécificité en fonction de l'espèce étudiée. Par ailleurs, il est souhaitable d'avoir des contaminants de référence produisant une réponse positive (immunodépression) pour chaque classe d'organisme.

L'utilisation de biomarqueurs immunologiques non spécifiques semble *a priori* plus prometteuse pour les application *in situ*. En effet, les biomarqueurs de l'immunité spécifique, quoique plus sensibles, ne sont pas bien adaptés aux imprévus rencontrés lors d'études sur le terrain. Par exemple, l'exposition d'une espèce à un antigène spécifique requiert un travail d'au moins une semaine avant qu'on puisse mesurer l'effet sur l'immunité spécifique.

Il y a un urgent besoin de développer des biomarqueurs pour évaluer les effets de la contamination sur l'environnement marin. Dans une perspective de conservation des mammifères marins, il est d'une importance critique de bien connaître les effets de la contamination de leur environnement. La possibilité que des contaminants soient immunosuppresseurs, tel qu'observé chez les phoques par De Swart *et al.* (1994), démontre l'importance d'étendre les recherches dans ce domaine afin de mieux protéger la santé des mammifères marins. L'évaluation des effets potentiels des contaminants sur le système immunitaire des mammifères marins, soit directement, soit par des expositions *in vitro*, devrait être une priorité lors de l'établissement des programmes de surveillance de la santé de l'écosystème aquatique.

5. CONCLUSION

Le système immunitaire est une cible principale de plusieurs contaminants environnementaux. Les tissus, les cellules et les composantes du système immunitaire ont une sensibilité élevée pour beaucoup de substances toxiques par rapport à d'autres systèmes physiologiques. Conséquemment, choisir les paramètres immunologiques comme marqueurs de toxicité est très prometteur. Bien connus et relativement faciles à mesurer chez les organismes en laboratoire, ces biomarqueurs pourraient être validés pour des études *in situ*. Des études récentes menées sur les invertébrés et les vertébrés ont démontré l'intérêt de favoriser une approche utilisant des marqueurs multiples puisqu'il a déjà été observé que certains facteurs, autres que les contaminants environnementaux, pouvaient moduler la réponse immunitaire rendant ainsi l'interprétation plus complexe (Brousseau *et al.*, 1999a ; Fournier *et al.*, 2000a). Les probabilités de certifier les liens entre ces biomarqueurs et les effets écotoxicologiques observés semblent très faibles, même si un certain nombre de données indique une corrélation entre plusieurs effets de modulations des paramètres du système immunitaire et les contaminants environnementaux. De plus, des découvertes récentes ont démontré l'implication des modulateurs endocriniens dans l'établissement d'une plus grande sensibilité immuno-logique. Il apparaît donc important et nécessaire d'intégrer une approche de suivi écotoxicologique.

RÉFÉRENCES

- ADEMA, C.M., W.P.W. VAN DER KNAPP et T. SMINIA (1991). « Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity : The role of reactive oxygen intermediates », *Review of Aquatic Science*, vol. 4, p. 201-223.
- ANDERSON, D.P. (1990). « Immunological indicators : Effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks », *American Fisheries Society Symposium*, vol. 8, p. 38-50.
- ANDERSON, D.P., K.T. PAYNTER et E.M. BURRESON (1992). « Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus* », *Biology Bulletin*, vol. 183, p. 476-481.
- ANDERSON, J., O. SJOBERG et G. MOLLER (1972). « Introduction of immunoglobulin and antibody synthesis *in vitro* by lipopolysaccharides », *European Journal of Immunology*, vol. 2, p. 349-353.
- ANDERSON, R.S. (2001). « Reactive oxygen species and antimicrobial defenses of invertebrates : A bivalve model », *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 484, p. 131-139.
- ASHIDA, M. et P.T. BREY (1995). « Role of the integument in insect defense - Pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix », *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 92, p. 10698-10702.
- BACHERE, E., D. CHAGOT et H. GRIZEI (1988). « Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation », *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 12, p. 549-559.
- BALLARIN, L. *et al.* (1999). « Purification and characterization of a humoral opsonin, with specificity for D-galactose, in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri* », *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 123, p. 115-123.
- BANCROFT, F.W. (1903). « Variation and fusion of colonies in compound ascidians », *Proceedings of California Academy of Sciences*, vol. 3, p. 137-186.
- BAYNE, C.J. (1990). « Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates », *Bioscience*, vol. 40, p. 723-731.
- BAYNE, C.J. et S.E. FRYER (1994). « Phagocytosis and invertebrate opsonins in relation to parasitism », *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 172, p. 162-177.
- BEAVEN, A.E. et K.T. PAYNTER (1999). « Acidification of the phagosome in *Crassostrea virginica* hemocytes following engulfment of zymosan », *Biology Bulletin*, vol. 196, p. 26-33.
- BECK, G. *et al.* (1993). « Invertebrate cytokines. III : Invertebrate interleukin-1-like molecules stimulate phagocytosis by tunicate and echinoderm cells », *Cellular Immunology*, vol. 146, p. 284-299.
- BECK, G. et G.S. HABICHT (1994). « Invertebrate cytokines », *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 712, p. 206-212.
- BERGER, L. *et al.* (1998). « Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95, p. 9031-9036.
- BERNIER, J. *et al.* (1988). « Immunotoxicology of aminocarb. I. Comparative studies of sublethal exposure to aminocarb and dieldrin in mice », *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 30, p. 238-250.
- BERNIER, J. *et al.* (1995) « Immunotoxicity of selected heavy metals in relation to Great Lakes », *Environmental Health Perspectives*, vol. 103, n° 9, p. 23-34.
- BESCHIN, A. *et al.* (2001). « On the existence of cytokines in invertebrates », *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 58, p. 801-814.
- BIGGER, C.H. (1980). « Interspecific and intraspecific acrorhagial aggressive-behavior among sea anemones - A recognition of self and not-self », *Biology Bulletin*, vol. 159, p. 117-134.

- BILEJ, M. *et al.* (1990a). « The flow cytometric analysis of *in vitro* phagocytic activity of earthworm coelomocytes (*Eisenia foetida*; Annelida) », *Cell Biology International Reports*, vol. 14, p. 831-837.
- BILEJ, M. *et al.* (1990b). « *In vitro* antigen-binding properties of coelomocytes of *Eisenia foetida* (Annelida) », *Immunology Letters*, vol. 26, p. 183-187.
- BOUCHARD, N., M. FOURNIER et E. PELLETIER (1999). « Effects of butyltin compounds on hemocytes phagocytosis activity of three marine bivalves », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 18, n° 3, p. 519-522.
- BROUSSEAU, P. *et al.* (1997a). « Marqueurs immunologiques », dans L. Lagadic *et al.* (dir.), *Utilisation des biomarqueurs en écotoxicologie*, Paris, Masson, p. 288-314.
- BROUSSEAU, P. *et al.* (1997b). « Evaluation of earthworm exposure to contaminated soil by cytometric assay of coelomocyte phagocytosis in *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta) », *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 29, p. 681-684.
- BROUSSEAU, P. *et al.* (1997c). « Immune parameters in growing pigs under continuous and intermittent administration of growth hormone-releasing factor (GRF) », *Livestock Production Science*, vol. 51, p. 63-72.
- BROUSSEAU, P. *et al.* (1998). *Manual of Immunological Methods*, Boston, CRC Press.
- BROUSSEAU, P. *et al.* (2000). « Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following *in vitro* exposure to heavy metals », *Toxicology*, vol. 142, p. 145-156.
- BURCH, S.W. *et al.* (1999). « *In vitro* earthworm *Lumbricus terrestris* coelomocyte assay for use in terrestrial toxicity identification evaluation », *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 62, n° 5, p. 547-554.
- CALLAHAN, C.A., M.A. SHIRAZI et E.F. NEUHAUSER (1994). « Comparative toxicity of chemicals to earthworms », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 13, n° 2, p. 291-298.
- CAREY, C. (1993). « Hypothesis concerning the causes of disappearance of boreal toads from the mountains of Colorado », *Conservative Biology*, vol. 7, p. 355-362.
- CAREY, C. (2000). « Infectious disease and worldwide declines of amphibian populations, with comments on emerging diseases in coral reef organisms and in humans », *Environmental Health Perspectives*, vol. 108, suppl. 1, p. 143-150.
- CAREY, C., N. COHEN et L. ROLLINS-SMITH (1999). « Amphibian declines : An immunological perspective », *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 23, p. 459-472.
- CHEN, S.C. *et al.* (1991). « Nitroblue tetrazolium dye reduction by earthworm *Lumbricus terrestris* coelomocytes : An enzyme assay for non-specific immunotoxicity of xenobiotics », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 10, p. 1037-1043.
- CHENG, T.C. (1977). « Biochemical and ultrastructural evidence for the double role of phagocytosis in molluscs : Defense and nutrition », *Comparative Pathobiology*, vol. 3, p. 21-30.
- CHENG, T.C. et W.J. DOUGHERTY (1989). « Ultrastructural evidence for the destruction of *Schistosoma mansoni* sporocysts associated with elevated lysosomal enzyme levels in *Biomphalaria glabrata* », *Journal of Parasitology*, vol. 75, p. 928-941.
- CHERNYSKOVA, E.V. et V.J. STAROSTIN (1994). « The peripheral blood of frogs in the genus *Rana* as a test system for assessing environmental pollution », *Izvestiya Akademii Nauk Seriya Biologicheskaya*, vol. 4, p. 656-660.
- CHRISTIN, M.S. *et al.* (2002a). « Effects of agricultural pesticides on the immune and reproductive systems of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens* », soumis à *Aquatic Toxicology*.
- CHRISTIN, M.S. *et al.* (2002b). « Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on their resistance parasitic infection », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 22, n° 5 (sous presse).
- COLES, J.A., S.R. FAIRLY et R.K. PIPE (1994). « The effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel, *Mytilus edulis* », *Journal of Aquatic Toxicology*, vol. 30, p. 367-379.

- COLES, J.A., S.R. FAIRLY et R.K. PIPE (1995). « Alteration of the immune response of the common marine mussel, *Mytilus edulis*, resulting from exposure to cadmium », *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 22, p. 59-65.
- COOPER, E.L. (1968). « Transplantation immunity in annelids. I. Rejection of xenografts exchanged between *Lumbricus terrestris* and *Eisenia foetida* », *Transplantation*, vol. 6, p. 322-337.
- COOPER, E.L. (1969). « Specific tissue graft rejection in earthworms », *Science*, vol. 66, p. 1414.
- COOPER, E.L. (1994). « Specificity and memory in invertebrates », *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 712, p. 245-259.
- COOPER, E.L. *et al.* (1992). « Hibernation alters the frog immune system », *Cryobiology*, vol. 29, p. 616-631.
- COOPER, E.L. *et al.* (1995). « Autogeneic but allogeneic earthworm effector coelomocytes kill the mammalian tumor cell target K-562 », *Cellular Immunology*, vol. 166, p. 113-122.
- COOPER, E.L., E. KAUSCHKE et A. COSSARIZZA (2002). « Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff », *Bioessays*, vol. 24, p. 319-333.
- COOPER, E.L. et P. ROCH (1992). « The capacities of earthworms to heal wounds and to destroy allografts are modified by polychlorinated biphenyls (PCB) », *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 60, p. 59-63.
- COSSA, D. et J.G. RONDEAU (1985). « Seasonal, geographical and size-induced variability in mercury content of *Mytilus edulis* in an estuarine environment: A re-assessment of mercury pollution level in the Estuary and Gulf of St. Lawrence », *Marine Biology*, vol. 88, p. 43-49.
- CUNNINGHAM, A.A. *et al.* (1996). « Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*) », *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, vol. 351, p. 1539-1557.
- DE GUISE, S. *et al.* (1996). « Effects of *in vitro* exposure of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) lymphocytes to heavy metals », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 15, p. 1357-1364.
- DE SWART, R.L. *et al.* (1994). « Impairment of immune function in harbour seals (*Phoca vitulina*) feeding on fish from polluted waters », *Ambio*, vol. 23, p. 155-159.
- DIETER, M.P. *et al.* (1983). « Immunological and biochemical responses in mice treated with mercuric chloride », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 68, p. 218-228.
- DIKKEBOOM, R. *et al.* (1988). « Possible role of reactive forms of oxygen in *in vitro* killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes of *Lymnaea stagnalis* », *Parasitology Research*, vol. 75, p. 148-154.
- DU PASQUIER, L. *et al.* (1998). « Somatic mutation in ectothermic vertebrates: Musings on selection and origins », *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 229, p. 199-216.
- DU PASQUIER, L., J. SCHWAGER et M.F. FLAJNIK (1989). « The immune system of *Xenopus* », *Annual Review of Immunology*, vol. 7, p. 251-275.
- EDWARDS, P. et M. SHIPITALO (1998). « Consequences of earthworms in agricultural soils: Aggregation and porosity », dans C.A. Edwards (dir.), *Earthworm Ecology*, Boca Raton, FL, St. Lucie Press, p. 147-161.
- EDWARDS, P.J. et J.M. COULSON (1992). « Choice of earthworm species for laboratory tests », dans P.W. Greig-Smith, H. Becker, P.J. Edwards et F. Heimbach (dir.), *Ecotoxicology of Earthworms*, Andover, Intercept Ltd, p. 36-43.
- ELLISON, T.R., P.M. MATHISEN et L. MILLER (1985). « Developmental changes in keratin patterns during epidermal maturation », *Developmental Biology*, vol. 112, p. 329-337.
- EXON, J.H. (1985). « Effect of lead, polychlorinated biphenyls and cyclophosphamide on rat natural killer cells, interleukin 2, and antibody synthesis », *Fundamental and Applied Toxicology*, vol. 5, p. 158-164.

- EYAMBE, G.S. (1991). « Development of an extrusion model for analysing immunotoxicity of xenobiotics », Thèse de doctorat, Denton, TX, University of North Texas, 117 p.
- EYAMBE, G.S. (1993). « Molecules in earthworm coelomic fluid that bind anti-IgA and anti-IgG, but not anti-IgM », *Immunology Letters*, vol. 35, p. 135-140.
- EYAMBE, G.S. *et al.* (1991). « A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies », *Laboratory Animals*, vol. 25, p. 61-67.
- FITZPATRICK, L.C. *et al.* (1990). « Earthworm immunoassays for evaluating biological effects of exposure to hazardous materials », dans S.S. Sandhu (dir.), *In Situ Evaluation of Biological Hazards of Environmental Pollutants*, New York, Plenum Press, p. 119-129.
- FITZPATRICK, L.C. *et al.* (1992). « Comparative toxicity of polychlorinated biphenyls to earthworms *Eisenia foetida* and *Lumbricus terrestris* », *Environmental Pollution*, vol. 77, p. 65-69.
- FLAJNIK, M.F. (1996). « The immune system of ectothermic vertebrates », *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 54, p. 145-150.
- FLAJNIK, M.F. *et al.* (1987). « Changes in the immune system during metamorphosis », *Immunology Today*, vol. 8, n° 2, p. 58-64.
- FLIPO, D. *et al.* (1992). « Simultaneous effect of selected insecticides on humoral immune response in mice », *International Journal of Immunopharmacology*, vol. 14, p. 747-752.
- FOURNIER, M. *et al.* (1986). « Evaluation of pesticide effects on humoral immune response to sheep erythrocytes and mouse hepatitis virus 3 by immunosorbent analysis », *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 26, p. 353-364.
- FOURNIER, M. *et al.* (1988). « Virus-pesticide interaction with murine cellular immunity after sublethal exposure to dieldrin and aminocarb », *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 1, p. 103-118.
- FOURNIER, M. *et al.* (1992). « Limited immunotoxic potential of technical formulation of the herbicide atrazine, Aatrex, in mice », *Toxicology Letters*, vol. 60, p. 263-274.
- FOURNIER, M. *et al.* (1998). « Phagocytic and metabolic activities of macrophages from mummichog naturally exposed to pulp mill effluents in Miramichi River », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 40, p. 177-183.
- FOURNIER, M. *et al.* (2000a). « Biomarkers in immunotoxicology : Evolutionary perspective », dans L. Guillette et D. Crain, *Environmental Endocrine Disruptors*, New York, Taylor and Francis.
- FOURNIER, M. *et al.* (2000b). « Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics », *American Zoologist*, vol. 40, p. 412-420.
- FOURNIER, M. *et al.* (2000c). « Immunosuppression in mice fed on diets containing beluga whale blubber from the St. Lawrence Estuary and the Arctic populations », *Toxicology Letters*, vol. 112-113, n° 8, p. 311-317.
- FOURNIER, M. *et al.* (2001). « Effects of *in vivo* exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes », *Toxicology*, vol. 161, n° 3, p. 201-211.
- FOURNIER, M. *et al.* (2002). « Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes », *Aquatic Toxicology*, vol. 59, p. 83-92.
- FRANCESCHI, C. *et al.* (1991). « Cytotoxicity and immunocyte markers in cells from the freshwater snail *Planorbis corneus* (Gastropoda pulmonata) : Implications for the evolution of natural killer cells », *European Journal of Immunology*, vol. 21, p. 489-493.
- FRIES, C.R. et M.R. TRIPP (1980). « Depression of phagocytosis in *Mercenaria* following chemical stress », *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 4, p. 233-244.
- FUGERE, N. *et al.* (1996). « Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different *in vitro* sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* », *Toxicology*, vol. 109, p. 157-166.

- FURST, A., Y. CHIEN et P.K. CHIEN (1993). « Worms as a substitute for rodents in toxicology : Acute toxicity of three nickel compounds », *Toxicology Methods*, vol. 3, n° 1, p. 19-23.
- GOVEN, A.J. *et al.* (1993). « Cellular biomarkers for measuring toxicity of xenobiotics. Effects of polychlorinated biphenyls on earthworm *Lumbricus terrestris* coelomocytes », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 12, p. 863-870.
- GOVEN, A.J. *et al.* (1994a). « Lysozyme activity in earthworm (*Lumbricus terrestris*) coelomic fluid and coelomocytes : Enzyme assay for immunotoxicity of xenobiotics », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 13, p. 607-613.
- GOVEN, A.J., L.C. FITZPATRICK et B.J. VENABLES (1994b). « Chemical toxicity and host defense in earthworms : An invertebrate model », *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 712, p. 280-300.
- GROMYSZ-KALKOWSKA, K. et E. SZUBARTOWSKA (1993). « Toxicity of tetrachloro-winfos to *Rana temporaria* », *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, vol. 105, n° 2, p. 285-290.
- GUIDANCE FOR INDUSTRY. « Immunotoxicology evaluation of investigational new drugs », <www.fda.gov/cder/guidance>.
- HADDEN, J.W. (1987). « Immunorestitution in secondary immunodeficiency », dans A. Berlin *et al.*, *Immunotoxicology*, Dordrecht, Boston, Lancaster, Martinus Nijhoff Publishers, p. 104-124.
- HALLER, D.G. (2001). « Adjuvant chemotherapy for colon cancer : The US experience », *Tumori*, vol. 87, p. S86-88.
- HANSEN, J.D. et A.G. ZAPATA (1998). « Lymphocyte development in fish and amphibians », *Immunological Reviews*, vol. 166, p. 199-220.
- HARDY, S.W., T.C. FLETCHER et J.A. OLAFSEN (1977). « Aspects of cellular and humoral defense mechanisms in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* », dans J.B. Solomon et J.D. Horton, *Developmental Immunobiology*, Amsterdam, Elsevier, p. 59-66.
- HARTMAN, R.S. et R.D. KARP (1989). « Short-term immunologic memory in the allograft response of the American cockroach, *Periplaneta americana* », *Transplantation*, vol. 47, p. 920-922.
- HERMANOSWICZ, A. et S. KASSMAN (1984). « Neutrophil function and infectious disease in workers occupationally exposed to phospho-organic pesticides : Role of mononuclear-derived chemotactic factor for neutrophils », *Clinical Immunology and Immunopathology*, vol. 33, p. 13-22.
- HILDEMAN, W.H., I.S. JOHNSON et P.L. JOKIEL (1979). « Immunocompetence in the lower metazoan phylum : Transplantation immunity in sponges », *Science*, vol. 204, p. 420-422.
- HOLCOMBE, R.F. *et al.* (2001). « Investigating the role of immunomodulation for colon cancer prevention : Results of an *in vivo* dose escalation trial of levamisole with immunologic endpoints », *Cancer Detection and Prevention*, vol. 25, p. 183-191.
- HORTON, J.D. *et al.* (1998). « T-cell and natural killer cell development in thymectomized *Xenopus* », *Immunological Reviews*, vol. 166, p. 245-258.
- HSU, E. (1998) « Mutation, selection and memory in B lymphocytes of exothermic vertebrates », *Immunological Reviews*, vol. 162, p. 25-36.
- HUBERT, F., E.L. COOPER et P. ROCH (1997). « Structure and differential target sensitivity of the stimutable cytotoxic complex from hemolymph of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* », *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Basis of Disease*, vol. 1361, p. 29-41.
- HUMPHREYS, T. et E.L. REINHERZ (1994). « Invertebrate immune recognition, natural immunity and the evolution of positive selection », *Immunology Today*, vol. 15, p. 316-320.
- INZA, B. *et al.* (1997). « Tissue distribution of inorganic mercury, methylmercury and cadmium in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in relation to the contamination levels of the water column and sediment », *Chemosphere*, vol. 35, p. 2817-2836.

- JAMIESON, B.G.M. (1992). « Oligochaeta », dans Harrison et Ed Gardner, *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, New York, Wiley-Liss, p. 217-322.
- JELASO, A.M., D. MACKAY et C.F. IDE (1997). « Methylmercury decreases IL-1 immunore activity in the nervous system of the developing frog *Xenopus laevis* », *Neurotoxicology*, vol. 18, n° 3, p. 841-850.
- JUST, J.J., J. SCHWAGER et R. WEBER (1977). « Hemoglobin transition in relation to metamorphosis in normal and isogenic *Xenopus* », *Wilhem Roux's Archives of Developmental Biology*, vol. 183, p. 307-323.
- KAREN, G., K.C. MACDOUGAL et P. MERICKO (1996). « Signal transduction in teleost lymphocytes as a target for the action of environmental metals », dans *Ecotoxicology: Responses, Biomarkers and Risk Assessment*, Fair Haven, SOS, p. 407-415.
- KARP, R.D. (1990). « Cell-mediated immunity in invertebrates: The enigma of the insect », *Bioscience*, vol. 40, p. 732-737.
- KARP, R.D. *et al.* (1994). « Evolution of adaptive immunity: Inducible responses in the American cockroach », *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 712, p. 82-91.
- KARP, R.D. et W.H. HILDEMAN (1976). « Specific allograft reactivity in the sea star *Dermasterias imbricata* », *Transplantation*, vol. 22, p. 434-439.
- KAUFMAN, J., K. SKJOEDT et J. SALOMONSEN (1990). « The MHC molecules of nonmammalian vertebrates », *Immunological Reviews*, vol. 133, p. 83.
- KIESECKER, J.M. et A.R. BLAUSTEIN (1995). « Synergism between UV-B radiation and a pathogen magnifies amphibian embryo mortality in nature », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 92, p. 11049-11052.
- KIESECKER, J.M., A.R. BLAUSTEIN et L.K. BELDEN (2001). « Complex causes of amphibian population declines », *Nature*, vol. 410, p. 681-684.
- KIMBER, I. (2002). « Reduction, refinement and replacement: Putting the immune system to work – The FRAME Annual Lecture », *Alternative to Laboratory Animals*, vol. 30, n° 6, p. 569-579.
- KOCIBA, R.J. (1982). « Morphologic considerations in the detection of immune suppression in routine toxicity studies », dans R.P. Sharma (dir.), *Immunologic Considerations in Toxicology*, Boca Raton, FL, CRC Press, p. 124-131.
- KOLLER, L.D. (2001). « A 2001 perspective on the progression of immunotoxicology », *Toxicology*, vol. 160, n°s 1-3, p. 105-110.
- KOLLER, L.D. et J.H. EXON (1985). « The rat as a model for immunotoxicity assessment », dans J.H. Dean *et al.* (dir.), *Immunotoxicology and Immunopharmacology*, New York, Raven Press, p. 99-111.
- KOUASSI, E. *et al.* (2003). « Système immunitaire », dans M. Gérin *et al.*, *Environnement et santé publique: fondements et pratiques*, Saint-Hyacinthe, Edisem.
- KROSCINSKI, J. et L. RENWRANTZ (1988). « Determination of pH values inside the digestive vacuoles of hemocytes from *Mytilus edulis* », *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 51, p. 73-79.
- KRZYSZYŃIAK, K., H. TRYPHONAS et M. FOURNIER (1995). « Approaches to the evaluation of chemical-induced immunotoxicity », *Environmental Health Perspectives*, vol. 103, n° 9, p. 17-22.
- LACKIE, A.M. (1983). « Effect of substratum wettability and charge on adhesion *in vitro* and encapsulation *in vivo* by insect haemocytes », *Journal of Cellular Science*, vol. 63, p. 181-190.
- LANGLET, C. et J. BIERNE (1984). « Immunocompetent cells requisite for graft rejection in *Lineus* (Invertebrata, Nemertea) », *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 8, p. 547-557.
- LAVELLE, P. *et al.* (1998). « Large-scale effect of earthworms on soil organic matter and nutrient dynamics », dans C.A. Edwards (dir.), *Earthworm Ecology*, Boca Raton, FL, St. Lucie Press.

- LOPEZ, C., M.J. CARBALLAL, C. AZEVEDO et A. VILLALBA (1997). « Differential phagocytic ability of the circulating haemocytes types of the carpet shell clam *Ruditapes decussates* (mollusca : Bivalva) », *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 30, p. 209-215.
- LUBBOCK, R. (1980). « Clone-specific cellular recognition in a sea anemone », *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, vol. 77, p. 6667-6669.
- LUSTER, M.I. *et al.* (1988). « Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity : National Toxicology Program's guidelines for immunotoxicity evaluation in mice », *Fundamental and Applied Toxicology*, vol. 10, p. 2-9.
- LUSTER, M.I. *et al.* (1992). « Risk assessment in immunotoxicology. I. Sensitivity and predictability of immune tests », *Fundamental and Applied Toxicology*, vol. 18, p. 200-210.
- LUSTER, M.I. *et al.* (1993). « Risk assessment in immunotoxicity : II. Relationships between immune and host resistance tests », *Fundamental and Applied Toxicology*, vol. 21, p. 771-782.
- LUSTER, M.I. *et al.* (1994). « Use of animal studies in risk assessment for immunotoxicology », *Toxicology*, vol. 92, p. 229-243.
- MA, W.C. (1982). « The influence of soil properties and worm-related factors on the concentration of heavy metals in earthworms », *Pedobiologia*, vol. 24, p. 109-119.
- MANIERO, G.D. et C. CAREY (1997). « Changes in selected aspects of immune function in the leopard frog, *Rana pipiens*, associated with exposure to cold », *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 167, p. 256-263.
- MANNING, M.J. (1991). « Histological organization of the spleen : Implication for immune function in amphibian », *Research in Immunology*, vol. 142, n° 4, p. 355-359.
- MCKERROW, J.H., K.H. JEONG et J.H. BECKSTEAD (1985). « Enzyme histochemical comparison of *Biomphalaria glabrata* amoebocytes with human granuloma macrophages », *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 37, p. 341-348.
- MOR, A. *et al.* (1991). « Isolation, amino acid sequence and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin », *Biochemistry*, vol. 30, p. 8824-8830.
- MORRIS, S.M. Jr. (1987). « Thyroxine elicits divergent changes in mRNA levels of two urea cycle enzymes and one gluconeogenic enzyme in tadpole liver », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 259, p. 144-148.
- NAPPI, A.J. et E. OTTOVIANI (2000). « Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates », *Bioessays*, vol. 22, p. 469-480.
- NONAKA, M. *et al.* (1999). « Opsonic complement component C3 in the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi* », *Journal of Immunology*, vol. 162, p. 387-391.
- NONAKA, M. et K. AZUMI (1999). « Opsonic complement system of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi* », *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 23, p. 421-427.
- NUSETTI, O. *et al.* (1998). « Immune and biochemical responses of the polychaete *Eurythoe complanata* exposed to sublethal concentration of copper », *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, vol. 119, n° 2, p. 177-183.
- NUSETTI, O. *et al.* (1999). « Acute-sublethal copper effects on phagocytosis and lysozyme activity in the earthworm *Amyntas hawayanus* », *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 63, p. 350-356.
- O'HALLORAN, K., J.T. AHOKAS et P.F.A. WRIGHT (1996). « *In vitro* responses of fish immune cells to three classes of pesticides », dans *Ecotoxicology : Responses, Biomarkers and Risk Assessment*, Fair Haven, SOS, p. 535-538.
- OLAFSEN, J.A. (1988). « Role of lectins in invertebrate humoral defense », dans W.S. Fisher (dir.), *Disease Processes*, American Fisheries Society Special Publications, vol. 18, p. 189-205.
- OMARA, F. *et al.* (1998). « Immunotoxicity of essential elements », dans J. Zelikoff et T. Thomas Peter (dir.), *Immunotoxicology of Environmental and Occupational Metals*, Padstow, UK, Taylor and Francis, p. 231-262.

- OUBELLA, R. *et al.* (1993). « Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca bivalvia) », *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 15, p. 193-197.
- PAMPANIN, D.M. *et al.* (2002). « Air exposure and functionality of *Chamelea gallina* haemocytes : Effects on haematocrit, adhesion, phagocytosis and enzyme contents », *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Molecular and Integrative Physiology*, vol. 131, p. 605-614.
- PEARCE, S *et al.* (2001). « Humoral opsonins of the tunicate, *Pyura stolonifera* », *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 25, p. 377-385.
- PHILIPS, D.J.H. (1995). « The chemistries and environmental fates of trace metals and organochlorines in aquatic ecosystem », *Marine Pollution Bulletin*, vol. 31, p. 193-200.
- PICKWELL, G.V. *et* S.A. STEINERT (1984). « Serum biochemical and cellular responses to experimental cupric ion challenge in mussels », *Marine Environmental Research*, vol. 14, p. 245-265.
- PIPE, R.K. (1992). « Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis* », *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 16, n^{os} 2-3, p. 111-122.
- PIPE, R.K. *et* J.A. COLES (1995). « Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs », *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 5, p. 581-595.
- PORCHET-HENNERE, E., T. DUGIMONT *et* A. FISCHER (1992). « Natural killer cells in a lower invertebrate, *Nereis diversicolor* », *European Journal of Cellular Biology*, vol. 58, p. 99-107.
- QUESADA, A.R., M.D.G. GRAVALOS *et* J.L.F. PUENTES (1996). « Polyaromatic alkaloids from marine invertebrates as cytotoxic compounds and inhibitors of multidrug resistance caused by P-glycoprotein », *British Journal of Cancer*, vol. 74, p. 677-682.
- RAFTOS, D.A. *et* D.A. BRISCOE (1990). *Journal of Heredity*, vol. 81, p. 160-166.
- REINECKE, A.J. (1992). « A review of ecotoxicological test methods using earthworms », dans P.W. Greig-Smith *et al.* (dir.), *Phylogeny of Earthworms*, Andover, UK, Intercept Ltd., p. 7-19.
- RENWRANTZ, L. (1990). « Internal defence system of *Mytilus edulis* », dans G.B. Stefano (dir.), *Studies in Neuroscience, Neurobiology of Mytilus edulis*, Manchester, Manchester University Press, p. 256-275.
- RENWRANTZ, L.R. *et* E.H. RICHARDS (1992). « Recognition of beta-glucuronidase by the calcium-independent phosphomannosyl surface receptor of haemocytes from the gastropod mollusc, *Helix pomatia* », *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 16, n^{os} 2-3, p. 251-256.
- RENWRANTZ, L. *et* A. STAHLER (1983). « Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis* », *Journal of Comparative Physiology*, vol. 149, p. 535-546.
- REVILLARD, J.P. (1994). « Immunotoxicité des xénobiotiques », dans *Immunologie*, Bruxelles, De Boeck-Wesmael, p. 289-296.
- ROBERT, J. *et* N. COHEN (1998). « Evolution of immune surveillance and tumor immunity : Studies in *Xenopus* », *Immunological Reviews*, vol. 166, p. 231-243.
- RODRIGUEZ-GRAU *et al.* (1989). « Suppression of secretory rosette formation by PCBs in *Lumbricus terrestris* : An earthworm immunoassay for humoral immunotoxicity of xenobiotics », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 8, p. 1201-1207.
- ROITT, I.M., J. BROSTOFF *et* D.K. MALE (1993). *Immunology*, 3^e édition, Londres, Gower Medical Publ.
- ROLLINS-SMITH, L.A. (1998). « Metamorphosis and the amphibian immune system », *Immunological Reviews*, vol. 166, p. 221-230.
- SALTER-CID, L. *et* C.H. BIGGER (1991). « Alloimmunity in the gorgonian coral *Swiftia exserta* », *Biology Bulletin*, vol. 181, p. 127-134.

- SAMI, S., M. FAISAL et R.J. HUGGETT (1992). « Alterations in cytometry characteristics of hemocytes from the American oyster *Crassostrea virginica* exposed to a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contaminated environment », *Marine Biology*, vol. 113, p. 247-252.
- SAUVÉ, S. *et al.* (2002a). « Phagocytic activity of coelomocytes from terrestrial and aquatic invertebrates following *in vitro* exposure to trace elements », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 52, p. 21-29.
- SAUVÉ, S. *et al.* (2002b). « Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: *In vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn) », *Aquatic Toxicology*, vol. 58, p. 189-200.
- SCHLUTER, S. *et al.* (1994). « Recognition molecules and immunoglobulin domains in invertebrates », dans G. Beck *et al.* (dir.), *Primordial Immunity: Foundations for the Vertebrate Immune System*, Annals of New York Academy of Sciences, vol. 712, p. 74-81.
- SCHNEEWEISS, H. et L. RENWRANTZ (1993). « Analysis of the attraction of haemocytes from *Mytilus edulis* by molecules of bacterial origin », *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 17, n° 5, p. 377-387.
- SEKINE, H. *et al.* (2001). « An ancient lectin-dependent complement system in an ascidian: Novel lectin isolated from the plasma of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi* », *Journal of Immunology*, vol. 167, p. 4504-4510.
- SHARMA, R.P. et V. REDDY. (1987). « Toxic effects of chemicals on the immune system », dans *Toxicology*, Washington, Hemisphere, p. 555-591.
- SHARON, N. (1984). « Surface carbohydrates and surface lectins are recognition determinants in phagocytosis », *Immunology Today*, vol. 5, p. 143-146.
- SHARON, K.T., E.S. WILLIAMS et K.W. MILLS (1999). « Effects of malathion on disease susceptibility in Woodhouse's toads », *Journal of Wildlife Disease*, vol. 35, n° 3, p. 536-541.
- SHEU, J.H. *et al.* (1998). « Novel cytotoxic diterpenes, excavatolides A-E, isolated from the Formosan gorgonian *Briareum excavatum* », *Journal of Natural Products*, vol. 61, p. 602-608.
- SMINIA, T., W.P.W VANDERKNAPP et P. EDELENBOSCH (1979). « The role of serum factors in phagocytosis of foreign particles by blood cells of the freshwater snail (*Lymnaea stagnalis*) », *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 3, p. 37-44.
- SMITH, L.C. (2002). « Thioester function is conserved in SpC3, the sea urchin homologue of the complement component C3 », *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 26, p. 603-614.
- SMITH, L.C., K. AZUMI et M. NONAKA (1999). « The ancient alternative and lectin pathways », *Immunopharmacology*, vol. 42, p. 107-120.
- SMITH, L.C., R.J. BRITTEN et E.H. DAVIDSON (1992). « SpCoell: A sea urchin profilin gene expressed specifically in coelomocytes in response to injury », *Molecular Biology of the Cell*, vol. 3, p. 403-414.
- SMITH, L.C., L.A. CLOW et D.P. TERWILLIGER (2001). « The ancestral complement system in sea urchins », *Immunology Review*, vol. 180, p. 16-34.
- SMITH, L.C. et E.H. DAVIDSON (1992). « The echinoid immune system and the phylogenetic occurrence of immune mechanisms in deuterostomes », *Immunology Today*, vol. 13, p. 356-361.
- SÖDERHÄLL, K. *et al.* (1985). « The cytotoxic reaction of hemocytes from the freshwater crayfish, *Astacus astacus* », *Cellular Immunology*, vol. 7, p. 427-443.
- SONG, Y.L. et Y.T. HSIEH (1994). « Immunostimulation of Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: Analysis of reactive oxygen species », *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 18, p. 201-209.
- SURESH, K. et A. MOHANDAS (1990). « Effect of sublethal concentrations of cooper on hemocyte number in bivalves », *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 55, p. 325-331.

- SUZUKI, M.M., E.L. COOPER, G.S. EYAMBE, A.J. GOVEN, L.C. FITZPARTICK et B.J. VENABLES (1995). « Polychlorinated biphenyls (PCBs) depress allogeneic natural cytotoxicity by earthworm coelomocytes », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 14, p. 1697-1700.
- TAYLOR, S.K. *et al.* (1999). « Effects of malathion on disease susceptibility in Woodhouse's toads », *Journal of Wildlife Disease*, vol. 35, p. 541-635.
- THOMAS, I.G. et N.A. RATCLIFFE (1982). « Integumental grafting and immunorecognition in insects », *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 6, p. 643-654.
- THORNVIST, P.O., M.W. JOHANSSON et K. SODERHALL (1994). « Opsonic activity of cell adhesion proteins and beta-1,3-glucan binding proteins from two crustaceans », *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 18, p. 3-12.
- US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (1993). « Draft toxicological principles for the safety assessment of direct food additives and color additives used in food », *Redbook II*, Washington, US FDA, Center for Food Safety and Applied Nutrition, p. 235.
- VAN DER VYNER, E. (1981). « Organisms without special circulatory systems », dans N.A. Ratcliffe et A.F. Rowley (dir.), *Invertebrate blood cells*, vol. 1, Londres, Academic Press, p. 19-32.
- VENABLES, B.J., L.C. FITZPATRICK et A.J. GOVEN (1992). « Earthworms as indicators of ecotoxicity », dans P.W. Greig-Smith *et al.* (dir.), *Ecotoxicology of Earthworms*, Andover, UK, Intercept Ltd., p. 197-206.
- VILLE, P. *et al.* (1995). « PCBs increase molecular-related activities (lysozyme, antibacterial, hemolysis, proteases) but inhibit macrophage-related functions (phagocytosis, wound healing) in earthworms », *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 65, n° 3, p. 217-224.
- VILLE, P. *et al.* (1997). « Immuno-modulator effects of carbaryl and 2,4 D in the earthworm *Eisenia fetida andrei* », *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 32, n° 2, p. 291-297.
- VOCCIA, I. *et al.* (1994). « *In vitro* mercury-related cytotoxicity and functional assay of immune cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) », *Aquatic Toxicology*, vol. 29, p. 37-48.
- VOCCIA, I. *et al.* (1999). « Immunotoxicity of pesticides : A review », *Toxicology and Industrial Health*, vol. 15, n°s 1-2, p. 119-132.
- VOS, J. *et al.* (2002). *Toxicology of Marine Mammals*, Londres, Taylor and Francis.
- WAHLI, W. *et al.* (1981). « Vitellogenesis and vitellogenin gene family », *Science*, vol. 212, p. 298-304.
- WATRAS, C.J. et N.S. BLOOM (1992). « Mercury and methylmercury species : The role of aqueous-phase chemical speciation », *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 11, p. 1373-1376.
- WEEKS, B.A. *et al.* (1992). « Immunological biomarkers to assess environmental stress », dans R.J. Huggett *et al.* (dir.), *Biomarkers*, Boca Raton, FL, Lewis Publishers, p. 211-234.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1986). *Organophosphorus Insecticides : A General Introduction*, Environmental Health Criteria 63, Genève, World Health Organization.
- WORTHYLAKE, K.M. et P. HOVINGH (1989). « Mass mortality of salamanders (*Ambystoma tigrinum*) by bacteria (*Acinetobacter*) in an oligotrophic seepage mountain lake », *Great Basin Naturalist*, vol. 49, p. 364-371.
- YANG, R. et T.P. YOSHINO (1990). « Immunorecognition in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea*. II. Isolation and characterization of a plasma opsonin with hemagglutinating activity », *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 14, p. 397-404.
- ZELIKOFF, J. et P.T. THOMAS (1998). *Immunotoxicology of Environmental and Occupational Metals*, Padstow, UK, Taylor and Francis.
- ZETTERGREN, L.D. *et al.* (1991). « Effects of prolonged low-level cadmium exposure on the tadpole immune system », *Toxicology Letters*, vol. 55, p. 11-19.

GLOSSAIRE

Additivisme ou toxicité additive : Cas où la toxicité d'un mélange de composés chimiques est simplement égale à la somme des effets individuels de chacun des composés présents dans le mélange.

Adduit : Métabolite électrophile lié de façon covalente à un centre nucléophile d'une macromolécule biologique comme une protéine ou l'ADN.

Anoxie : Diminution de la quantité d'oxygène dissous dans le milieu.

Antagonisme : Cas où la toxicité d'un mélange de composés chimiques est moindre que celle qu'elle aurait dû être par la simple addition des toxicités des composés individuels présents dans le mélange.

Bioaccumulation : Rétention nette d'un contaminant au cours du temps.

Bioactivation : Métabolisation ou biotransformation d'un composé inactif en un ou plusieurs métabolites électrophiles très réactifs et capables de former des adduits.

Biodisponibilité : Proportion du contaminant présent dans l'environnement sous une ou plusieurs formes assimilables par un organisme.

Biomarqueur : 1. Changement avant-coureur d'effet néfaste détectable dans un organisme suite à une exposition aux substances toxiques. 2. Changement (souvent de type biochimique) qui indique une exposition aux substances toxiques sans nécessairement être associé à un effet néfaste. 3. Réactions biologiques d'organismes exposés à des polluants et dont la mesure permet d'évaluer la toxicité du ou des polluants en question.

Bioréacteur : Enceinte dans laquelle est pratiquée la fermentation aérobie des boues et ordures ménagères en vue de les transformer en compost biologiquement sain.

Cadhérine : Protéine transmembranaire impliquée dans l'adhésion cellulaire.

Catalase : Une des principales enzymes cytosoliques capables de détruire le peroxyde d'hydrogène et qui permet la régénération de l'oxygène et de l'eau.

Caténine : Protéine cytoplasmique impliquée dans les jonctions adhérentes et la signalisation intracellulaire.

CE50: Concentration efficace à 50 %. Concentration d'un polluant qui cause un effet toxique donné chez 50 % des individus exposés après un temps d'exposition normalisé, par exemple 24 heures.

Cellule étoilée: Cellule hépatique en forme d'étoile, site connu de dépôt des lipides.

Cellule NK: Cellule qui possède la capacité d'induire la lyse spontanée de certains types de cellules cibles. Ces cellules sont importantes dans l'immunité naturelle contre les virus et autres pathogènes intracellulaires ainsi que dans la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC).

Chimiotaxie: Réaction de locomotion orientée et obligatoire d'organismes mobiles, déclenchée et entretenue par une substance chimique diffusant dans le milieu.

Chylomicron: Complexe de lipoprotéines formé au niveau de l'intestin et transporté dans le système lymphatique et dans le sang. Élément important dans l'absorption et le métabolisme des lipoprotéines.

CI50: Concentration d'inhibition à 50 %. Concentration d'un toxique qui, après un temps donné d'action, provoque une inhibition d'activité (motrice ou autre) chez 50 % des individus faisant l'objet du bioessai.

CL50: Concentration létale à 50 %. Concentration d'un polluant toxique dans l'air ou l'eau provoquant 50 % de mortalité dans une population exposée à ce dernier.

Connexine: Protéine qui forme la connexion de la jonction lacunaire.

Crête neurale: Cellules embryonnaires d'origine ectodermique qui apparaissent au moment de la formation du tube neural (neurulation). Certaines cellules de la crête neurale forment des ganglions associés au tube neural et d'autres entreprennent des migrations afin de former plusieurs structures de l'embryon.

Cytochrome P-450: Terme générique désignant les membres d'une vaste famille d'hémoprotéines qui catalysent le métabolisme oxydatif des substrats lipophiles en métabolites plus polaires.

Cytokine: Protéine produite et relarguée par des cellules activées et modifiant le comportement d'autres cellules. Les cytokines sont très importantes dans la régulation des réponses immunitaires.

Cytométrie de flux: Méthode utilisant un appareil permettant la caractérisation de cellules individuelles. Les cellules passent une à une dans un flux croisant un rayon laser. La lumière émise ou réfléchie par les cellules détermine la taille, la granulosité ainsi que la fluorescence émise par des produits ingérés ou couplés à la cellule.

Cytotoxicité: Toxicité ayant pour effet la mort cellulaire.

Débordement cellulaire (*spillover*): Tendance d'un métal, une fois bioaccumulé et présent dans le cytosol, à se lier à des biomolécules inappropriées, provoquant des effets délétères.

Défaillance cortisolique: Diminution de la capacité de sécréter les hormones corticostéroïdes (cortisol chez les poissons téléostéens, corticostérone chez les amphibiens) en réponse à des stressseurs physiques ou chimiques.

Détoxification : Terme générique pour désigner le résultat de la mise en fonction de divers mécanismes, dont la métabolisation, ayant pour but de réduire l'activité toxique de xénobiotiques dans un organisme.

ELISA : Terme anglais provenant de *enzyme-linked immunosorbent assay*. Il s'agit d'un procédé (immuno-absorption enzymatique) qui permet de doser les antigènes (corps considérés comme étrangers par l'organisme) et les anticorps grâce à l'utilisation d'un marqueur enzymatique (molécule dont la détection permet d'identifier ces éléments).

Équivalences toxiques : Expression de la toxicité combinée d'un mélange de substances ayant en commun un mode d'action semblable. De façon individuelle, on compare les substances à une valeur « étalon » pour obtenir un facteur relatif de toxicité, puis on calcule la somme des toxicités du mélange.

Espèce indicatrice : Espèce biologique qui indique le niveau de pollution par son absence ou son abondance.

Espèce sentinelle : Espèce relativement tolérante aux polluants. Les espèces sentinelles intègrent le signal de pollution dans l'espace et dans le temps d'une manière quantifiable ; elles présentent généralement des concentrations tissulaires de contaminants reflétant les concentrations ambiantes.

Espèces réactives de l'oxygène : Espèces chimiques dérivées comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$) qui ne sont pas des radicaux, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. Désigne souvent l'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs.

Flambée oxydative : Processus pour lequel des lysosomes fusionnent avec les phagosomes et relarguent leur contenu enzymatique (peroxyde), ce qui amorce la dégradation de l'élément étranger.

Gène hybride : Gène résultant du croisement entre des gènes homologues génétiquement différents.

Gènes homologues : Gènes codant pour une protéine ayant une même fonction physiologique.

Génie génétique : Terme général désignant l'ensemble des méthodes et des techniques comportant une intervention directe sur les unités de base du matériel génétique d'une cellule ou d'un organisme, ou l'utilisation de fragments de ces unités comme matériau d'étude ou d'application.

Génomique : Discipline scientifique qui a pour objet d'inventorier l'ensemble des gènes d'un organisme vivant et d'en étudier les fonctions.

Hépatocytes : Cellules du parenchyme hépatique les plus abondantes dans le foie.

Homéostasie : Capacité d'un organisme à réguler la concentration cellulaire (cytosolique) d'un élément à l'intérieur d'une gamme relativement étroite.

Immunoglobuline : Famille de protéines plasmatiques à laquelle appartiennent toutes les molécules d'anticorps.

Inducteur enzymatique : Composé capable d'augmenter l'activité catalytique d'une enzyme.

Induction biologique : Activation d'un phénomène se produisant avec un certain retard relativement à l'agent déclencheur de celui-ci.

Inhibiteur enzymatique : Composé capable de diminuer la concentration de l'enzyme et/ou de diminuer ou bloquer la fonction catalytique associée à cette enzyme. L'inhibiteur peut être de type réversible, compétitif, allostérique ou mixte.

Interféron β : Molécule produite lors d'une infection virale et qui a des propriétés antioxydantes. La cellule infectée par des virus fabrique des interférons de type alpha et bêta qui agissent sur les cellules voisines pour les rendre plus résistantes à l'infection virale.

Ligand : Molécule inorganique ou organique, « L », qui se lie à un cation en solution M^{z+} , par une liaison de coordination, formant un complexe métallique ML_n .

Lysosomes : Les lysosomes, par leur diversité d'action, entrent en contact avec de nombreux contaminants de l'environnement, métaux et xénobiotiques organiques. L'accumulation de telles substances dans les cellules et leur prise en charge par les lysosomes peut s'accompagner de la dégradation de la structure de ces organites, notamment de la membrane qui perd alors ses caractéristiques d'étanchéité.

Malonyldialdéhyde (MDA) : Substance issue de l'oxydation des graisses poly-insaturées, résultant d'un stress oxydatif et indiquant le niveau des dégâts provoqués par les radicaux libres.

Métabolisme : Ensemble de réactions séquentielles, catalysées par plusieurs enzymes, qui permettent la transformation d'un xénobiotique organique lipophile en un ou plusieurs composés (métabolites) hydrosolubles facilement excrétables de l'organisme. Le terme biotransformation est utilisé comme un synonyme de métabolisme.

Métaux essentiels/non essentiels : Les métaux traces essentiels tels que le cuivre (Cu), le fer (Fe) et le zinc (Zn) sont des micro-nutriments essentiels à la vie et dont l'absence se traduit par un dérèglement d'une fonction de l'organisme qui ne peut être restaurée que par l'ajout du métal en question. Les métaux non essentiels, tels le cadmium (Cd), le mercure (Hg) et le plomb (Pb), n'ont aucune fonction biologique connue (c'est-à-dire que ces métaux n'interviennent dans aucun processus métabolique).

Métaux traces : Terme utilisé pour décrire tout élément métallique présent dans l'environnement à de faibles concentrations (généralement <1 partie par million) comparativement à d'autres éléments majeurs tels que le sodium (Na), le calcium (Ca) et le magnésium (Mg). Dans un sens plus général, ce terme peut également englober les éléments métalloïdes comme l'arsenic (As) et le sélénium (Se). Le terme « métaux lourds » renvoie à une terminologie plus ancienne, mais il est souvent employé comme synonyme de « métaux traces ».

Microorganismes prototrophiques : Microorganismes qui tirent leur énergie de réactions d'oxydation de la matière organique.

Micropuce : Pièce de petite dimension constituée de verre, de silicium ou de polymère sur laquelle sont imprégnées des sondes d'ADN dans le but de créer un microréseau.

Microréseau : Arrangement ordonné, sur un support miniaturisé de verre, de silicium ou de polymère, de centaines ou de milliers de sondes moléculaires dont la séquence nucléotidique est connue et dont la fonction est de reconnaître, dans un mélange, leurs séquences nucléotidiques complémentaires.

Microsomes : Vésicules formées du réticulum endoplasmique lors du fractionnement cellulaire.

Nécrose : Terme employé en morphologie pour désigner les différentes variétés de modifications macroscopiques ou histologiques qui résultent de la mort d'une cellule ou d'un tissu.

Oponisation : Mécanisme fixant des molécules sur le matériel à éliminer, modifiant ainsi la surface d'un pathogène ou d'une autre particule, ce qui le rend plus vulnérable à l'action des phagocytes.

Ovogénèse : Production des ovules ou oocytes. Processus typiquement caractérisé par le dépôt du vitellus et d'autres couches nutritives ainsi que par des divisions méiotiques.

Peroxydases : Système d'enzymes cytosoliques capables de détruire le peroxyde d'hydrogène. Ces enzymes, dont font partie les glutathions peroxydase à cofacteur sélénium, constituent le système majeur de protection, car elles détruisent non seulement le H_2O_2 mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol.

Peroxydation des lipides : Les lipides des organismes vivants sont sensibles à l'oxydation, surtout ceux formés d'acides gras polyinsaturés dans les membranes cellulaires. Les formes les plus réactives de l'oxygène peuvent initier directement la peroxydation lipidique et endommager les membranes cellulaires.

Perturbateurs endocriniens : Substances d'origine anthropique ayant la capacité de perturber ou d'altérer la fonction endocrinienne des organismes et de causer des anomalies physiologiques au niveau de la reproduction et du développement.

Phagocytose : Mécanisme qui permet à certains types de cellules de capturer et de détruire des corps étrangers. La cellule phagocyte entoure l'antigène de pseudopodes et l'internalise dans un phagosome.

Plasmide : Petite molécule d'ADN extrachromosomique circulaire double brin, capable de se répliquer indépendamment et portant des caractères génétiques non essentiels à la cellule hôte.

Potentiation : Cas où la toxicité d'un composé chimique augmente en présence d'un autre composé chimique n'ayant pas de propriétés toxiques.

Pression de sélection : Variation de fréquence d'un allèle dans une population en l'espace d'une génération sous le seul effet de la sélection (généralement naturelle).

Prise en charge (*uptake*) : Assimilation d'un métal ou d'une molécule organique impliquant un transport transmembranaire.

Protéomique : Discipline regroupant les activités de recherche destinées à rassembler l'information complète sur l'expression des protéines des organismes dont le génome a été identifié.

Radicaux libres : Atomes ou molécules dont une orbitale externe contient un électron non apparié. Ils sont chimiquement hyperactifs et capables d'extraire un électron des molécules voisines pour combler la vacance de leur orbitale. Ils induisent des dommages et des lésions sur l'ADN, les protéines cellulaires essentielles et les lipides membranaires et peuvent initier des réactions en cascade telle la peroxydation des lipidiques.

Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) : Procédé d'amplification enzymatique *in vitro* d'une séquence d'ADN définie.

Recombinaison génétique : Assemblage de séquences d'ADN non contiguës pour former des hybrides.

Recombinaison moléculaire aléatoire *in vitro* (DNA shuffling) : Procédé faisant appel à la technique de la PCR pour recombinaison des gènes homologues *in vitro*.

Sac vitellin : Structure membranaire qui fait le lien entre l'embryon et le vitellus. Considéré comme le site principal du transfert des nutriments et des produits du métabolisme.

Sélectine : Lectine extracellulaire impliquée dans l'adhésion cellulaire.

Spéciation : Répartition d'un élément ou d'un métal parmi différentes formes physiques ou chimiques.

Stress oxydatif : Déséquilibre entre les systèmes prooxydants et antioxydants en faveur de la formation des espèces réactives de l'oxygène.

Superoxyde dismutase (SOD) : Enzyme qui catalyse une réaction de dismutation entre deux radicaux superoxydes pour produire du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène moléculaire triplet.

Synergisme : Cas où la toxicité d'un mélange de composés chimiques est plus grande que celle qu'elle aurait dû être par la simple addition des toxicités des composés individuels présents dans le mélange.

Tératogénèse : Événement embryonnaire anormal qui affecte la structure, le fonctionnement ou le comportement de l'embryon.

Tests fonctionnels en toxicologie endocrinienne : Stimulation par des agents (p. ex., ACTH, dbcAMP) qui induisent la production maximale de l'hormone *in vivo* ou *in vitro* afin d'estimer la capacité fonctionnelle de l'organe ou de la cellule endocrine exposée ou non à des polluants (en laboratoire, ou sur un site contaminé ou de référence).

Toxicologie endocrinienne : Science qui traite des effets toxiques ciblant le système endocrinien et les processus hormonodépendants.

Transport accidentel : Assimilation d'un métal par transport facilité, via un transporteur qui sert normalement à transporter un autre élément (essentiel).

Transport facilité : Transport transmembranaire impliquant des transporteurs protéiques intégrés à la membrane.

Vitellus : Substance déposée dans l'œuf, riche en lipides et en protéines. Source essentielle de nutriments pour l'embryon.

Xénobiotique : Substance étrangère au milieu naturel ou à l'organisme possédant des propriétés toxiques même à faible dose.

Zona occludens-1 : Protéine cytoplasmique impliquée dans la formation des jonctions serrées et dans la signalisation intracellulaire.

I N D E X

A

Acipenser fulvescens 239
 ACTH 164, 167, 180
 Adduits
 analyse 270
 formation 273
 Adhérence intercellulaire 307
 Albumine 270, 274
 AMP cyclique 167, 179, 179, 180
 Amphibiens
 immunotoxicologie 421
 stockage des rétinoïdes 218
 système immunitaire 427-429
 tissu adrénocortical 166, 179, 180
 Antagonisme
 BaP/TBT 288, 291
 sélénimun/mercure, 260-262
 Anti-oestrogènes 372
 Approche écotoxicologique intégrée 70-72
 Approche multiparamétrique et hiérarchique 67, 70
 ARAT 202-203, 223-225
Ardea herodias 234
 Aspartate transcarbamylase 363

B

BaPDE 267
 Benzo(a)pyrène (BaP)
 activité EROD 271
 bioactivation 267, 281-283
 effet protecteur 286-288
 métabolites 270, 273

 structure 263
 trétols 268
 Bioactivation 281-283
 Biomarqueurs
 méthallothionéines (MT) 64-66, 70, 72, 73, 77, 100
 biochimiques des hépatocytes 269, 289
 définitions 53, 66, 352
 hormonaux 186-188
 utilisant les rétinoïdes 230-243
 Biomarqueurs d'exposition 73, 74, 76, 79, 82, 99
 Biomarqueurs d'effets toxiques 73, 77, 78, 83, 85, 89, 100
 Biosurveillance 230
 Biphényles polychlorés (BPC)
 dioxygénase du biphényle 121
 effets sur le rétinol 227, 228
 voie catabolique des BPC 122
 Bivalves 64, 66, 71
 biomarqueurs immunologiques 415-419
 réponses intracellulaires 72
 réponses des populations 72
 variables démographiques des populations 86-88
 BLM (modèle du ligand biotique) 21-33
 BPC (voir biphényles polychlorés)
 Branchies 173
Burkholderia 120, 123, 124, 143, 146

C**Cadhérines**

- voie de signalisation 330
- complexe cadhérine-vaténine 331
- structure 329

Cadmium (Cd) 11, 13, 16-19, 26, 32-34, 42, 52, 65, 70, 335

- Cd-HTM (haut poids moléculaire) 64, 72, 78-80, 92, 94, 100
- Cd-FPM (faible poids moléculaire) 64, 71, 78-80, 82, 94, 100
- Cd-MT (métallothionéine) 64, 71, 78-80, 94

- effets sur le calcium cellulaire 177
- effets sur les cadhérines 335
- effets sur les cytokines 311, 327
- interactions avec les MT 40, 73-76, 173
- méthodes de mesure 80
- relation dose-réponse 72, 74, 172, 173

Calcium 24, 27, 28, 35, 176**Canaux calciques** 177**Cancer** 315**Caroténoïdes** (*voir* rétinoïdes)**Catalase** 185, 353, 356**Catéchol** 119, 130, 135, 142, 143**Cellules NK** 409**Cellules chromaffine** 166**Centre Rieske** (structure) 124***Chaoborus* sp.** 74**Chlorobenzoate** 112, 116, 119, 120, 143**Cholestérol** 167, 170**Cœlomocytes** 412***Comamonas testosteroni*** 119**Co-métabolisme** 115**Communication intercellulaire** 315**Composés xénobiotiques** (*voir*

- xénobiotiques)
- métabolisme 113

Connexines 315-318**Connexons** 318-321**Corticostéroïdes** 164**Corticostérone** 164**Cortisol**

- sécrétion 164, 185

Croissance 174**Cuivre (Cu)** 11, 13, 16-19, 26, 32-34, 35, 42

- régulation 47, 48

Cytochromes

- isoforme P4501A1 264, 271, 284-286

isoforme P4503A 283

isoforme P450RA1 206

stéroïdogéniques 169, 365

Cytokines 411**Cytotoxicité** 417**D****DAL** 305**DDT** (trichloro-bis(*p*-chloroéthane) 324**Débordement cellulaire** 40, 53, 68, 72, 73, 79**Défense cellulaire** 182**Dérivés oxygénés** 182, 412*Delphinapterus leucas* 228**Déshalogénation réductrice** 116**Déshydrogénase du**

dihydroxybiphényle 119

Dibutylétain (DBT) 276-277, 287**Dioxygénases du biphényle**

dihydroxybiphényle 119, 143-145

évolution moléculaire 133

ingénierie moléculaire 129-131

purification 120-124

séquences en acides aminés 127

Dynamique des populations 64, 85, 96**E****Écotoxicologie**

définition 1, 7

interactions multiples 291-293

Effets toxiques 66, 67, 70, 72, 73, 94, 99**Effets confondants** 64, 67, 70-74, 97, 99, 100

facteurs environnementaux 95, 187

Endosulfan 184-186**Enzymes stéroïdogéniques** 178**Epididyme** 333, 334**EROD** 205, 269*Esox lucius* 171**Essais enzymatiques (méthodes)** 183**Évolution moléculaire *in vitro***

application à l'ingénierie moléculaire 133

définition 131-133

familles de gènes 134

F**Fécondité cumulée** 64, 72, 85, 92, 100**Ferrédoxine** 123

G

Gamétogenèse 362-364
Gènes suicides 149
Glande thyroïde 164, 175
Globine
 méthode d'extraction 270
 adduits 274
Glutathion 182, 185, 275, 276, 287
Glutathion *S*-transférase (GST) 274-275, 286
Glutathion peroxydase (GSP) 64, 72, 73, 79, 80, 82, 183, 185
Glutathion réductase (GSR) 64, 72, 73, 79, 80, 82, 183
Grands lacs canadiens 230
Glycogène 375

H

Hémocytes 416
HER 202, 203, 223-225, 237
Hexachlorobenzène (HCB) 325
Hexagenia limbata 74
Histopathologie 278
 tissu hépatique 277-279
Homéostasie
 des métaux 11, 38, 47, 52
HOPDA hydrolase 146
Hormones
 cellule corticostéroïdogénique 170
 corticostéroïdes 166, 169
 thyroïdiennes 164
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)
 benzo(a)pyrène 263
 effets sur les fonctions lacunaires 321
Hypervitaminose 211
Hypophyse 164
Hypothalamus 164
Hypovitaminose 209-211

I

ICAM 305, 309
Immunité acquise 424
Immunité innée 423
Immunodépression 404
Immunoglobulines 424
Immunostimulation 404
Immunotoxicologie
 évaluation du risque 406
Induction enzymatique 265
Inflammation 406

Inhibition enzymatique 265
Intégrines
 définition 305
 mécanismes d'action 307
Interactions métaboliques 258, 262-266, 272-274, 276, 289-291
Interleukine 404
Invertébrés aquatiques 66, 70, 74, 94, 96
Invertébrés benthiques 73, 96

J

Jonctions adhérentes 332-334
Jonctions lacunaires 316, 315-321

L

Larus argentatus 231
L-FPM 77
L-HPM 77
Ligands cytosoliques 37-40
Lindane (hexachlorocyclohexane) 325
LRAT 202, 203, 223-225, 237
Lymphocytes 422

M

Malondialdéhyde (MDA) 64, 73, 73, 79, 80, 354
Mammifères
 stockage des rétinoides 219-220
Membrane lysosomale 356-357
Mercure (Hg) 11, 13, 16-19, 34, 42, 52
 interaction avec le sélénium 261
 interactions avec les connexines 328
Métallothionéines (MT) 64, 70, 71, 74, 77, 82, 99, 100
 biochimie et structure 41
 biomarqueur d'exposition au cadmium 74, 173
 fonctions 45-50
 induction chez les mammifères 44-45
 structure 41-43
 tolérance aux métaux 50
Métaux
 biodisponibilité 32-33
 classification 13, 51
 complexation 28, 36
 détoxification 37-39, 49
 effets toxiques 34-37, 69, 174-176, 180, 181, 327-329, 413-415

interactions membranaires 21, 23
 prise en charge 19-33, 51
 spéciation aqueuse 16-19, 39
 spéciation intracellulaire 53
 Méthylmercure 11, 329
 Microorganismes
 adaptabilité à l'environnement 115, 116
 MIL (modèle de l'ion libre) 21-25
 MOD (matière organique dissoute) 29, 32
 Modulation 433
Mya arenaria 355, 358, 374-377, 380, 381, 387
Mytilus sp 354, 358

N

Nickel (Ni) 11, 13, 26, 34, 312

O

Oestradiol 369, 370
 Oiseaux
 biomarqueurs 230-237
 rôle des rétinoïdes 203-205
 stockage des rétinoïdes 215, 221, 222
 Oligocètes
 marqueurs immunologiques 411-415
 vers de terre 412
Oncorhynchus mykiss 175, 184, 370
 Organismes modifiés génétiquement (OGM)
 application en décontamination 146-148
 utilisation *in situ* 148-150
 Osmorégulation (capacité) 165, 173

P

P450 (*voir* cytochromes)
 Paramètres de croissance 64, 72, 85, 89
 Pentachlorophénol (PCP) 326
Perca flavescens 171-172
 Peroxydation lipidique 64, 182, 185, 352
 Perturbateurs endocriniens
 définition 163, 164
 effets 368
 Pesticides 180, 181
 Phagocytose 408
 Phénobarbital 322-323

Phénotypage 406
Phoca vitulina 229
 Phytoplancton 25
 Plaque jonctionnelle 316
 Plomb (Pb) 11, 13, 26, 34-35, 51-52, 328
 Poissons
 biomarqueurs 370-372
 stockage des rétinoïdes 216-218
 POP (polluants organiques persistants)
 comparaison avec les métaux 11, 13
 définition et composition 117
 effets sur les amphibiens 429-431
 effets sur les oligochètes 415
 effets sur les jonctions lacunaires 323, 326
 mécanismes réactionnelles de dégradation 111-115
 persistance 118
 Potentiation 283, 284
 Potentiel de croissance 358, 360
 Prégnenolone 170, 382
 Processus oxydants 183, 352-356
 Progestérone 378-383
 Prolifération des lymphocytes 405
 Protection mutuelle 288
Pyganodon grandis 64, 71, 73, 74, 76-79, 82, 83, 94, 96

R

RAG 206
 RAR 207
 Ratio P/B 64, 72, 85, 89, 92, 100
 Récepteur Ah 265, 285
 Recombinaison *in vitro* aléatoire 136-142
 Relations dose-réponse 72, 74, 83, 99
 Réductase de la dioxygénase du biphenyle 121
 Répartition subcellulaire 15, 37-40, 100
 Réponse non spécifique 403
 Réponses des populations 64, 70, 72
 Reproduction 333
 Rétinoïdes 198, 199
 acide rétinoïque 205, 206
 carence en vitamine A 209
 effets des contaminants 213, 214
 effets sur l'embryon 208, 211, 212
 stockage 215-220
 structure générale 200
 synthèse et réactivité 201-205

Rétinol
 hépatique 221
 sanguin 226-229
Risques écotoxicologiques 70, 73, 100

S

Saguenay (fjord) 373-374
Saint-Laurent (fleuve) 234-237
Salmo trutta 171
Salvelinus alpinus 268, 269, 279
Sélectines
 définition 304
 mécanisme d'action 307
Sélénium/mercure
 antagonisme 260
 structure du complexe 261
Signalisation Wnt 333
Spéciation 16-19, 39, 40, 51
Spéciation intracellulaire 71, 78, 82, 83, 92
StAR 167, 170
Stéroïdogénèse 178, 364-366
Stress oxydatif 36, 37, 49, 64, 72, 100
 165, 181-185, 354
 action antioxydante 182-184
 définition 182
Substances humiques 17, 30

T

TBT (*voir* tributylétain)
Testicule 164
Tétrols (*voir* BaPDE)
Thalidomide 314
Tissu adréнал 164, 166, 168
Tissu interrénal 164, 166, 168
TNF- α 406
Tolérance 425

Toxicité
 mécanismes pour les métaux 34-36
Transfert horizontal 150
Transport facilité
 métaux 30, 51
Transport passif
 métaux 31
Tributylétain (TBT)
 bioaccumulation chez les bivalves 383
 effets sur l'ATCase 384-386
 effets sur la phagocytose 418
 effets sur les mollusques 377-378
 effets sur la bioactivation du BaP 281
 excrétion 283
 métabolite 277
 structure 263

V

VCAM 307
Vitamine A (*voir* rétinoïdes)
Vitellogénèse 366

X

Xénobiotiques
 biodisponibilité dans les sols et sédiments 113,114
 définition générale 113
 métabolisme microbien 111-116
 métabolisme 265
Xéno-œstrogènes 369-372

Z

Zinc (Zn) 11, 13, 16-19, 26, 35, 42, 51
 complexe MT 45
 régulation 48

AUTEURS

Olivier Assoi-Etchian est diplômé de l'Université de Côte-d'Ivoire (1994) au Diplôme d'études approfondies (DEA) en biochimie (biotechnologie et amélioration des productions végétales). Diplômé de l'Université du Québec à Rimouski (UQAR) (août 2003) au doctorat en océanographie (Ph.D.) (écophysiologie et écotoxicologie). Il compte poursuivre une carrière d'enseignant-chercheur dans le domaine de la toxicologie environnementale en Côte-d'Ivoire.

Diane Barriault a obtenu une maîtrise en microbiologie appliquée de l'Institut Armand-Frappier en 1989. Depuis, elle occupe un poste d'assistante de recherche à l'Institut national de la recherche scientifique (INRS). Elle s'intéresse principalement à l'étude des voies cataboliques microbiennes impliquées dans la dégradation des polluants persistants ainsi qu'à l'ingénierie des enzymes qui catalysent les réactions de dégradation.

Marjolaine Bisson a complété sa M.Sc. en biologie à l'Université du Québec à Montréal en 2001 dans le domaine de l'écotoxicologie endocrinienne chez le poisson. Elle travaille présentement chez Sanexen Services Environnementaux inc.

Monique Boily a complété sa M.Sc. en biologie en 1993 et son Ph.D. en 2000 à l'Université du Québec à Montréal en écotoxicologie, principalement sur les effets des contaminants sur les rétinoïdes chez les oiseaux. Elle est auteure de plusieurs communications scientifiques, chargée de cours et chercheure postdoctorale.

Pauline Brousseau a obtenu un B.Sc en biologie de l'Université du Québec à Montréal, une M.Sc. en microbiologie-immunologie de l'Université de Montréal et un Ph.D. en médecine expérimentale de l'Université McGill (1983). Elle a par la suite travaillé pour la compagnie Bio-Recherche comme responsable du laboratoire d'immunopharmacologie/immunotoxicologie. En 1993 elle retourne en recherche fondamentale, à l'UQAM d'abord puis à l'INRS-Institut Armand-Frappier. Depuis février 2001, elle dirige la division de la recherche contractuelle de la compagnie Biophage.

Peter Campbell a obtenu un doctorat en chimie organique à l'Université Queen's en 1968. En 1970, il a accepté un poste de professeur-chercheur au sein de l'Institut national de la recherche scientifique où il fait carrière depuis. Ses recherches, qui portent sur la biogéochimie des métaux dans l'environnement aquatique, comprennent des éléments de chimie analytique, de géochimie et d'écotoxicologie (développement de modèles prédictifs reliant la réponse biologique provoquée par un métal à la spéciation du métal). En 2002, Peter Campbell s'est vu octroyer une Chaire de recherche du Canada en écotoxicologie des métaux. La même année, en guise de reconnaissance pour son apport au développement de la science, le professeur Campbell a été élu à l'Académie des sciences de la Société royale du Canada.

Marie-Soleil Christin a complété un B.Sc. en microbiologie et immunologie (2000) à l'Université McGill et une M.Sc. en sciences expérimentales de la santé à l'INRS-Institut Armand-Frappier (2002). Elle a travaillé comme assistante de recherche à l'INRS-Institut Armand-Frappier. Elle poursuit des études de doctorat à l'Université de Montréal.

Yves Couillard a obtenu en 1988 une maîtrise en toxicologie aquatique à l'Université de Montréal. Son doctorat, obtenu à l'INRS-Eau en 1993, portait sur les mécanismes de détoxification des métaux traces chez les invertébrés d'eau douce. Il a par la suite poursuivi des recherches sur la métallothionéine comme biomarqueur d'exposition et d'effet, et sur le développement d'une approche générale d'évaluation du risque écotoxicologique associé aux effluents miniers en milieu naturel. Il est évaluateur principal (de risque écotoxicologique) à la Direction des substances existantes d'Environnement Canada. Il enseigne la toxicologie environnementale à l'Université de Montréal.

Daniel Cyr a fait ses études supérieures en écotoxicologie à l'Université Concordia et en endocrinologie à l'Université du Manitoba, où il a obtenu son Ph.D. Il a ensuite fait un stage postdoctoral en biologie cellulaire et moléculaire à l'Université McGill. Il est professeur titulaire à l'INRS-Institut Armand-Frappier.

Sylvain De Guise a complété un D.M.V. (1988) et une M.Sc. (1993) en pathologie animale à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, et un Ph.D. (1996) en sciences biologiques à l'Université du Québec à Montréal. Il a par la suite complété un stage postdoctoral en immunologie à la University of California Davis. Il a joint le Department of Pathobiology and Veterinary Science à l'Université de Connecticut en août 1998 comme assistant professeur; il y poursuit ses recherches en immunologie et immunotoxicologie comparée.

John Dorval a obtenu un doctorat de biologie à l'Université du Québec à Montréal (2003) et est aujourd'hui chercheur au laboratoire d'écologie et de zoologie de l'Université Paris-Sud. Ses travaux de recherche en toxicologie concernent les mécanismes d'action et les effets des polluants environnementaux (pesticides, métaux et HAP), en tant qu'inducteurs de stress oxydatif, sur l'intégrité physiologique des poissons.

Michel Fournier a complété un B.Sc. en biologie moléculaire (1976) à l'Université du Québec à Montréal, une M.Sc. en micro-immunologie (1978) à l'Université de Montréal et à l'Institut Armand-Frappier et un Ph.D. en médecine expérimentale à l'Université McGill et à l'Institut Armand-Frappier. Il a été

professeur en immunotoxicologie de l'environnement au Département des sciences biologiques de l'Université du Québec à Montréal de 1980 à 1998 et membre du laboratoire de recherche en toxicologie de l'environnement (TOXEN). Il s'est joint à l'INRS-Institut Armand-Frappier en 1998. Depuis 2001 il est titulaire de la Chaire de recherche du Canada en immunotoxicologie de l'environnement. Les projets de recherche auxquels il a travaillé concernent les effets des substances de l'environnement sur le système immunitaire.

Sophie Gauthier-Clerc s'est spécialisée en toxicologie de l'environnement à l'Université de Metz (France) pour obtenir un Diplôme d'études approfondies (DEA) en toxicologie de l'environnement en 1996. Elle a poursuivi son cursus universitaire avec une maîtrise en océanographie de l'Université du Québec à Rimouski (UQAR) qu'elle a obtenue en 1999. Ses travaux de maîtrise sur la condition physiologique du bivalve *Mya arenaria* ont alors donné lieu à une recherche plus approfondie sur la vitellogénèse et la stéroïdogénèse chez ce bivalve, durant un doctorat en océanographie de l'UQAR qu'elle a obtenu à la fin de l'année 2003.

Anik Giguère a obtenu son baccalauréat en biologie à l'Université Laval et elle a ensuite poursuivi des études à la même université en aménagement du territoire et développement régional pour obtenir une maîtrise. Elle a terminé son doctorat à l'Institut national de la recherche scientifique-Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE), situé à Québec. Sa thèse porte sur l'accumulation, la répartition subcellulaire et la toxicité du Cd, Cu, Zn et Ni chez un bivalve d'eau douce et chez la perchaude récoltés le long d'un gradient métallique en milieu naturel.

Landis Hare a obtenu son baccalauréat en zoologie à l'Université de Calgary. Il a poursuivi ses études à l'Université de Waterloo (Ontario) où il a obtenu une maîtrise en biologie. Par la suite, il a été engagé comme professeur adjoint à l'Université du Nigeria à Nsukka, où il a étudié les changements saisonniers de la flore et la faune d'un lac équatorial. Les données issues de ce projet ont fait l'objet de ses études doctorales à l'Université de Waterloo. Il s'est joint ensuite à l'Institut national de la recherche scientifique-Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE), où il est actuellement professeur titulaire. Ses recherches portent sur l'écologie et le comportement des animaux aquatiques et leur accumulation de métaux traces. Il est le père dévoué de Jenna et Nadine.

Alice Hontela était professeure à l'Université du Québec à Montréal jusqu'en juin 2003 ; elle est présentement à l'Université de Lethbridge en Alberta, détentrice d'une Chaire de recherche du Canada en écotoxicologie. Elle a reçu un B.Sc. de l'Université d'Ottawa (1975), une M.Sc et un Ph.D. de l'Université d'Alberta (1982). Sa recherche en toxicologie endocrinienne concerne les mécanismes d'action et les effets des polluants environnementaux sur le système endocrinien et l'homéostasie physiologique des espèces fauniques, notamment les poissons et les amphibiens. Membre associé du Centre de recherche en toxicologie de l'environnement (TOXEN) et membre régulier du Water Institute for Semi-arid Ecosystems (WISE) de l'Université de Lethbridge.

Annie Lalancette a complété un B.Sc. en biologie (1998) à l'Université du Québec à Trois-Rivières et une M.Sc. en sciences biologiques à l'Université du Québec à Montréal et à l'INRS-Institut Armand-Frappier (2002). Elle a travaillé en 2003 comme assistante de recherche à l'INRS-Institut Armand-Frappier.

Lucie Ménard a complété un B.Sc. en biologie (1988) à l'Université du Québec à Montréal et une M.Sc. en sciences de l'eau à l'INRS-Eau (1993). Elle a par la suite travaillé comme biologiste au Centre Saint-Laurent d'Environnement Canada (1993-2000) et comme assistante de recherche à l'INRS-Institut Armand-Frappier.

Jean-Marc Nicolas a reçu son Ph.D. en écotoxicologie au Département des sciences biologiques de l'Université Dalhousie. Il a été stagiaire postdoctoral du CRSNG au Centre de biotechnologies de Noranda et à l'INRS-Institut Armand Frappier. Il travaille maintenant comme professionnel de recherche à l'ISMER.

Jaime Padrós est scientifique principal au Département de métabolisme *in vitro* des médicaments, découverte et développement pré-clinique, de Services Pharma MDS. Il est titulaire d'une maîtrise (1994) et d'un doctorat (2000) en océanographie de l'Université du Québec à Rimouski. Marquées par une approche interdisciplinaire de divers aspects dans les domaines de la chimie, de la biochimie et de la pharmacologie, ses recherches doctorales ont porté sur les interactions métaboliques entre polluants aquatiques. Ses recherches actuelles sont axées sur l'évaluation de l'absorption, la distribution, le métabolisme, l'excrétion et la toxicité des médicaments au stade expérimental utilisant des modèles *in vitro*.

Jocelyne Pellerin a complété un B.Sc. en biologie (1977) à l'Université du Québec à Rimouski et un Ph.D. en physiologie (endocrinologie moléculaire) à l'Université Laval (1982). Elle a ensuite fait des études postdoctorales en physiologie de l'exercice à l'UQTR (1983-1985), pour ensuite occuper des fonctions d'associée de recherche à l'INRS-Océanologie (1985-1988). En 1988, elle a poursuivi sa carrière au Département d'océanographie de l'UQAR comme professeure-chercheure en écophysiologie des invertébrés et en écotoxicologie marine. Elle est aujourd'hui professeure chercheure à l'Institut des sciences de la mer de Rimouski (ISMER-UQAR) et fut directrice des programmes d'études supérieures en océanographie (ISMER-UQAR) entre 1997 et 2000. En recherche, elle s'intéresse aux effets de facteurs du milieu sur la croissance et la reproduction d'invertébrés marins (*Mytilus edulis* L., *Mya arenaria* et *Nereis virens*).

Émilien Pelletier est professeur à l'Institut des sciences de la mer de Rimouski (ISMER) rattaché à l'Université du Québec à Rimouski. Il est titulaire de la Chaire de recherche du Canada en écotoxicologie moléculaire appliquée aux milieux côtiers des hautes latitudes depuis juin 2001. Ses travaux portent sur le métabolisme et le transfert trophique de divers contaminants organiques comme les butylétains et les hydrocarbures aromatiques polycycliques en milieu côtier froid. Il développe de plus en plus l'approche moléculaire et cellulaire pour comprendre les mécanismes de l'action toxique des contaminants transférés dans l'alimentation. Il possède une maîtrise en océanographie et un Ph. D. en chimie (McGill, 1983).

Olivier Perceval, après avoir obtenu une licence en sciences naturelles à l'Université Paris VII (Jussieu), a poursuivi des études de maîtrise (M.Sc.) en océanographie à l'Université du Québec à Rimouski jusqu'en 1997. À l'heure actuelle, il s'intéresse, dans le cadre de ses études doctorales à l'Université de Montréal, à l'évaluation et au développement de biomarqueurs d'exposition aux métaux traces et de toxicité en milieu naturel.

Stéphane Pillet a effectué une licence en zoologie à l'Université Libre de Bruxelles, à la suite de quoi il a réalisé une maîtrise et un doctorat en océanologie à l'Université de Liège. Il occupe aujourd'hui les fonctions d'associé de recherche à l'INRS-Institut Armand-Frappier au sein du Réseau de recherche en écotoxicologie du Saint-Laurent. Ses travaux s'orientent vers les impacts des contaminants de l'environnement sur le système immunitaire ainsi que l'utilisation et le développement de biomarqueurs cellulaires et moléculaires.

Bernadette Pinel-Alloul a obtenu une maîtrise en 1970 et un doctorat en 1975 en écologie aquatique à l'Université de Montréal où elle est professeure depuis 1976 en limnologie et en toxicologie de l'environnement. Elle a fondé et dirigé de 1989 à 1999 le Groupe de recherche interuniversitaire en limnologie et en environnement aquatique (GRIL) regroupant 22 chercheurs (Université de Montréal, UQTR, UQAM, McGill). Elle s'intéresse à l'écologie du plancton dans les écosystèmes d'eau douce. Depuis 1990, elle poursuit des études en écotoxicologie aquatique sur le développement de biomarqueurs d'exposition et de toxicité des métaux traces en milieu naturel en région minière.

Marie-Michèle Plante a obtenu une maîtrise en microbiologie appliquée de l'Institut national de la recherche scientifique-Institut Armand-Frappier en 2002. Elle occupe maintenant un poste d'associée de recherche à l'unité de recherche en vaccinologie du Centre hospitalier de l'Université Laval à Québec. Elle étudie les réponses immunologiques suite à une infection aux streptocoques de groupe A chez la souris dans le but de développer un vaccin efficace contre cette bactérie.

Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro est professeur de biologie et de toxicologie au département de biologie cellulaire de l'Université du Paraná à Curitiba, au sud du Brésil. Il a obtenu son doctorat de l'Université de Rio de Janeiro après avoir effectué un stage d'une année dans les laboratoires du professeur Pelletier à l'INRS-Océanologie en 1996. Ses travaux portent essentiellement sur les mécanismes de toxicité cellulaire et tissulaire des métaux et sur l'utilisation de l'histopathologie comme outil de diagnostic précoce pour évaluer les atteintes à la santé des écosystèmes aquatiques. Il mène des études comparatives sur la réponse toxicologique des poissons tropicaux et des poissons des eaux froides nordiques.

Ahmed Siah possède une double maîtrise en océanographie et en physiologie des animaux marins suivie par un Diplôme d'études approfondies en endocrinologie. Il a jumelé cette double expertise pour réaliser des études doctorales à l'Institut des sciences de la mer (ISMER) sur la régulation, par les hormones sexuelles, du cycle reproducteur de *Mya arenaria*. Son cheminement le conduit maintenant à l'Université du Havre pour un stage postdoctoral en génomique fonctionnelle.

Catherine Simard a obtenu une maîtrise en microbiologie appliquée de l'Institut national de la recherche scientifique-Institut Armand-Frappier en 2001. Depuis, elle a travaillé successivement comme assistante de recherche à l'Université du Québec à Montréal (UQAM) sur des projets de virologie appliqués aux thérapies géniques et comme assistante de recherche à l'Université du Québec à Rimouski sur des projets en génétique évolutive.

Philip Spear a obtenu sa M.Sc. en biologie de l'Université Concordia en 1976. Lors de son Ph.D., obtenu à l'Université d'Ottawa en 1986, il a exploré les effets possibles des hydrocarbures halogènes polyaromatiques sur les systèmes thyroïdien et rétinoides chez les oiseaux. Il a travaillé comme biologiste au sein du Conseil national de recherche du Canada et comme chercheur postdoctoral à l'Université d'Ottawa et à l'Université de Bordeaux. Il est professeur à l'Université du Québec à Montréal depuis 1989. Ses recherches en écotoxicologie/toxicologie de l'environnement portent sur les effets des contaminants sur les rétinoïdes et les mécanismes associés.

Michel Sylvestre a obtenu une maîtrise en microbiologie de l'Université de Montréal et un doctorat en microbiologie et en biochimie pharmaceutique de l'Université du Wisconsin en 1974. Depuis, il a successivement occupé un poste de professeur à l'Institut Armand-Frappier et à l'Institut national de la recherche scientifique. Il s'intéresse principalement aux biotechnologies environnementales et aux biocatalyses. Au cours des dernières années, ses travaux ont porté sur les voies cataboliques oxydatives des chloroaromatiques, le but ultime étant le développement par génie génétique d'enzymes capables de dégrader efficacement les polluants persistants.

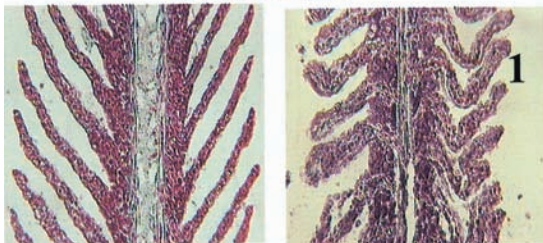
Planche 1



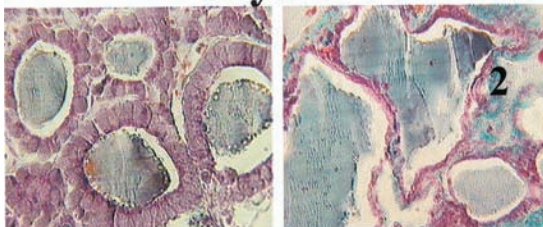
Colonies induites de E. coli pDB31 [bphAE]/pQE51 [bphFGB] et de E. coli pDB31/pQE51 [bphFGB] exposées aux vapeurs de biphenyle

Planche 2

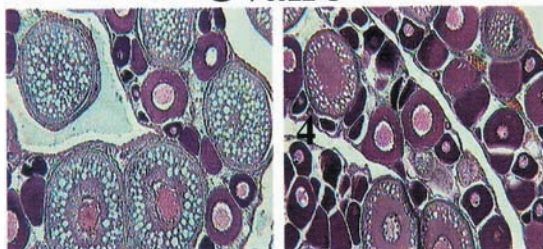
Branchie



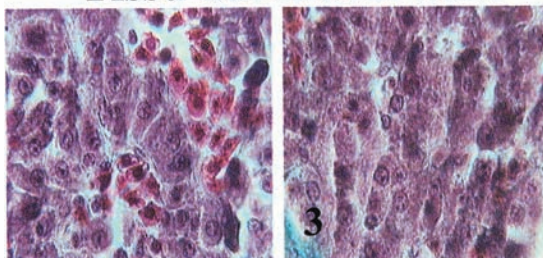
Thyroïde



Ovaire



Tissu adrénocortical



Références

Contaminés

50 μ m

Des modifications de la structure des branchies (1- lamelles secondaires épaissies), de la thyroïde (2- épithélium du follicule thyroïdien mince et follicule endommagé), du tissu adrénocortical (4- noyaux plus petits), ainsi que des oocytes (3) moins matures ont été observées chez les poissons contaminés par les métaux.

Planche 3



Exemple de dispositif expérimental utilisé en écotoxicologie

Cette figure illustre la mise en place de *Mya arenaria*, *Mytilus edulis* et *Nereis virens* dans des bacs de polyéthylène avant le suivi des réponses associées aux processus oxydants et les variations des paramètres physicochimiques du milieu. Les analyses de la catalase, de la malondialdéhyde et des réserves énergétiques ont été réalisées selon les protocoles déjà décrits par Pellerin-Massicotte (1994).

Planche 4



Vue d'un mésocosme et du dispositif de descente d'un bac contenant les sédiments et les organismes exposés

Planche 5



Vue générale des mésocosmes servant à l'exposition des organismes aux substances contaminantes

Planche 6



Variations de taille de Mya arenaria

Des observations *in situ* en milieu peu contaminé montrent, pour un même âge de *Mya arenaria*, des variations de taille importantes entre les niveaux de haute et de basse mer en zone littorale.