

## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS .....	i
RESUME.....	ii
TABLE DES MATIERES .....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vi
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE.....	1
1.1. Problématique .....	1
1.2. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.....	7
1.2.1. Identité, propriétés, production .....	7
1.2.2. Pénétration dans l'environnement.....	8
1.2.3. Historique des HAP dans l'Est du Québec .....	8
1.2.4. Devenir.....	8
1.3. Impacts des HAP sur les invertébrés marins et choix de biomarqueurs .....	8
1.3.1. Le système immunitaire .....	10
1.3.2. Le système oxydatif .....	13
1.3.3. Les réserves énergétiques.....	16
1.4. Modèle biologique choisi comme organisme sentinelle .....	16
CHAPITRE 2 : PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS ON SOFT-SHELL CLAM MYA ARENARIA.....	22
ABSTRACT.....	23
1. INTRODUCTION.....	24
2. MATERIALS AND METHODS.....	24
2.1. Clams and sediment .....	26
2.2. Exposure protocol .....	27
2.3. Immunological analysis .....	29
2.4. Biochemical analysis.....	30
2.5. Energy reserves analysis .....	31
2.6. Histological study.....	32
2.7. PAH analysis.....	32
2.8. Statistical analysis .....	33
3. RESULTS .....	33
3.1. PAH tissue concentrations .....	33
3.2. Phagocytosis.....	34
3.3. Oxidative stress .....	35
3.4. Glycogen reserves .....	36
3.5. Reproductive cycle.....	36
4. DISCUSSION .....	46
ACKNOWLEDGEMENTS .....	54
CHAPITRE 3 : CONCLUSION GENERALE .....	56
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	58

ANNEXES .....	68
ANNEXE 1 : Protocole de phagocytose en microplaques.....	69
ANNEXE 2 : Protocole de dosage des protéines .....	72
ANNEXE 3 : Protocole de dosage des lysosymes .....	75
ANNEXE 4 : Protocole de dosage du glycogène.....	78
ANNEXE 5 : Protocole de dosage des lipides .....	81
ANNEXE 6 : Protocole de dosage de la malondialdéhyde.....	83
ANNEXE 7 : Protocole de dosage de la catalase.....	86

## LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Niveaux de réponse des organismes marins aux contaminants chimiques issu de McDowell (2005) adapté de Capuzzo (1981).....</i>	9
<i>Tableau 2 : catégorisation de chaque stade du développement de la gonade mâle et femelle. Issu de Gauthier-Clerc et al. (2006) . ....</i>	19
<i>Table 3 : Results of digestive gland polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) bioaccumulation (ng PAH/ g dry tissue).....</i>	38

## LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : schéma de Mya arenaria (issu de www.biopix.dk) .....</i>	18
<i>Figure 2 : Effects of exposure to PAHs on phagocytic activity of hemocytes.....</i>	39
<i>Figure 3 : Effects of exposure to PAHs on phagocytic efficiency of hemocytes. ....</i>	40
<i>Figure 4 : Effects of exposure to PAHs on catalase activities in the digestive gland.....</i>	41
<i>Figure 5 : Effects of exposure to PAHs on malondialdehyde concentration in the digestive gland.....</i>	42
<i>Figure 6 : Effects of exposure to PAHs on glycogen concentration in the digestive gland.</i>	43
<i>Figure 7 : Effects of exposure to PAHs on glycogen concentration in the gonad. ....</i>	44
<i>Figure 8 : Effects of exposure to PAHs on gametogenesis in Mya arenaria. ....</i>	45

# CHAPITRE 1 :

## INTRODUCTION GENERALE

### 1.1. Problématique

L'état de l'environnement marin est un sujet de préoccupation mondiale, avec notamment la détérioration de cet écosystème qui est un phénomène bien documenté (Clark, 2002). Des fréquences élevées d'épidémies et l'émergence de nouvelles maladies ont été rapportées chez les animaux marins (Harvell et al., 1999). Les contaminants anthropogéniques peuvent partiellement être responsables de cette augmentation d'incidence (Harvell et al., 1999) en lésant le système immunitaire et en augmentant ainsi la sensibilité aux infections (Pipe and Coles, 1995). Depuis quelques décennies, les écosystèmes côtiers sont sujets à une contamination croissante aux Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP). Les HAP sont des contaminants organiques ubiquistes des sédiments marins côtiers (Raoux et al., 1999) qui proviennent de sources naturelles et anthropogéniques. Parmi les facteurs anthropogéniques, les sources pétrogéniques et pyrolitiques sont les plus importantes. Les sources pyrolitiques incluent les processus de combustion (e.g. la combustion de carburant fossile, les feux de forêts, les feux d'arbrisseaux et de gazon), alors que l'apport pétrogénique est étroitement lié aux produits pétroliers (e.g. déversement de pétrole, matériaux de construction pour les routes). L'aluminerie, qui est possiblement la source primaire d'apport des HAP du Saguenay, fait pénétrer ces composés dans l'environnement marin à travers la perte de coke vert durant le

transport à la fonderie et le relâchage des HAP par les émissions aériennes, les ruissellements de surface et les effluents (Simpson et al., 1996) comprenant les suies (boues de dépuración) et le B-Lagoon (mélange trouvé à la sortie des alumineries).

Les différentes origines et régimes de transport des HAP entrant dans l'environnement aquatique résultent en une adsorption variable de ces composés entre l'eau, les particules, les autres liquides de phase non-aqueuse et les sédiments (e.g. : (Gearing et al., 1994) due à la nature hydrophobique et lipophile de ces contaminants. Ainsi, la plupart des HAP dans l'environnement marin sont associés avec les matières particulaires (Meyers et Qujnn, 1973; Means et al., 1980) telles que le charbon noir et semblent être résistants à la dégradation et à la désorption. Ceci peut mener à des différences dans la biodisponibilité des HAP issus de différentes matrices sources, dépendant de l'origine et de l'histoire de la substance (Rust et al., 2004). En particulier, les HAP des processus pyrolytiques sont plus fortement associés avec les sédiments et également plus résistants à la dégradation microbienne que les HAP d'origine pétrogénique (McGroddy et Farrington, 1995). De même, la biodisponibilité sera différente selon que les HAP seront piégés dans le sédiment ou dans la colonne d'eau. De nombreuses études (Means et al., 1980; McGroddy et al., 1996; Chiou et al., 1998) ont montré que la matière organique joue un rôle crucial dans l'adsorption des HAP sur les sédiments marins et bien que les HAP soient distribués de façon relativement uniforme dans des sites éloignés, les sédiments près des aires urbaines et industrielles montrent des concentrations plus élevées et plus variables (Witt et Trost, 1999). Ces contaminants sont par la suite rapidement

accumulés par les invertébrés dépositives (Weston, 1990; Meador et al., 1995) en raison de la faible solubilité et de l'affinité pour les lipides des HAP. Ces contaminants peuvent donc être bioaccumulés par les organismes et ainsi intégrer les réseaux trophiques où ils pourront être bioamplifiés (Grundy et al., 1996a; Grundy et al., 1996b; Wootton et al., 2003).

L'information sur la biodisponibilité et la disposition des contaminants dans le biote marin est essentielle pour estimer la relation cause-effet entre les produits chimiques dans l'environnement marin et les anomalies biologiques observées. Ainsi les invertébrés benthiques, notamment les bivalves, servent souvent comme organismes sentinelles pour l'estimation de la toxicité, de la biodisponibilité et du transfert trophique des contaminants issus des sédiments. Leur distribution mondiale, leur nature sédentaire, leur comportement de filtreur et leur capacité à bioaccumuler les polluants font de ces organismes des espèces idéales pour la recherche (Burns et Smith, 1981). De ce fait, depuis le milieu des années 70, l'utilisation de la moule, du genre *Mytilus*, a été suggérée dans les études de niveaux et de tendances de contamination chimique dans les eaux côtières (Goldberg, 1975). Dans cette étude, afin de comprendre l'impact écotoxicologique que les HAP peuvent avoir sur le biote de la zone intertidale, nous avons choisi un bivalve de l'endofaune, *Mya arenaria* (Pellerin-Massicotte et al., 1993; Blaise et al., 2002a; Gagné et al., 2002). Un haut apport de produits chimiques (White et al., 1997) et de faibles processus de détoxification, font que *Mya arenaria* a le potentiel d'accumuler les contaminants de l'eau et des compartiments sédimentaires, et peut ainsi fournir des renseignements sur les niveaux de contaminants dans les eaux côtières (Kure et Depledge, 1994).

Afin de pouvoir étudier la santé d'un écosystème marin et le potentiel toxique d'une pollution telle que celle liée à la présence de HAP, il est nécessaire de pouvoir accéder à la fraction des composés disponibles pour les organismes aquatiques et de connaître les effets toxiques des contaminants incriminés (effets toxiques qui peuvent être reliés à la capacité de biotransformation des espèces). Les effets des HAP sont principalement causés par leurs métabolites plus que par les composés parents (James et Kleinow, 1993). Donc, les méthodes simples pour la détection et la quantification des métabolites de HAP dans les invertébrés marins pourraient servir d'outils de dépistage lors des étapes préliminaires d'évaluation du risque environnemental dans les sédiments contaminés par les HAP.

Les HAP ont des effets néfastes sur la santé de la faune et de la flore (activité cancérigène et/ou mutagène) (Varanasi et al., 1985; Swartz et al., 1990; Landrum et al., 1991). Les variations environnementales induisent chez les organismes des réponses métaboliques afin de maintenir l'homéostasie (Stebbing, 1987), la croissance et la reproduction dans ce milieu. Cependant, lorsque la capacité de réagir des organismes est dépassée, le métabolisme s'en trouve perturbé, ce qui peut avoir de sévères conséquences pour les individus, puis pour les populations et la communauté. Chez les mollusques, principalement les bivalves, les hydrocarbures aromatiques polycycliques ont été examinés pour leur comportement immunosuppresseur (e.g. (Coles et al., 1994; Dyrinda et al., 2000)). Les hémocytes circulant dans l'hémolymphe représentent le composant principal du système immunitaire chez les bivalves (Adema et al., 1991). Les HAP affectent chez les mollusques, les processus cellulaires (réduction de la phagocytose des hémocytes) et le



système lysosomal (modification de la perméabilité membranaire des lysosomes) (Moore et al., 1987; Grundy et al., 1996a). La déstabilisation de la membrane lysosomale est un signe cellulaire de stress, bien corrélé avec le stress oxydatif (Regoli et al., 1998). Les organismes exposés aux hydrocarbures produisent des espèces oxygénées réactives (ROS) qui entraînent des dommages à l'ADN, une inactivation des enzymes, la peroxydation lipidique, la perturbation du métabolisme des lipides (Ross et Moldeus, 1991) et possiblement la mortalité cellulaire (Regoli et al., 2002).

Les biomarqueurs sont des mesures de réponses des organismes ou des systèmes biologiques contaminés, pouvant démontrer une exposition aux polluants environnementaux ou les effets de ces derniers (Blaise et al., 2002a). En terme d'indicateurs, l'utilisation d'une des fonctions clés des cellules immunitaires, la phagocytose, semble a priori très prometteuse pour une application in situ et une évaluation des dommages subis par le système immunitaire. De même, le stress oxydatif, qui se produit notamment en présence de contaminants, peut être évalué par la malondialdéhyde (MDA), produit final issu de la peroxydation lipidique (Pellerin-Massicotte, 1994; Grundy et al., 1996a) et par la catalase (CAT) qui est une enzyme antioxydative (Manduzio et al., 2005). Enfin, les réserves énergétiques sont considérées comme des biomarqueurs qui permettent de refléter les changements subléthaux résultant d'un stress suite à une exposition aux xénobiotiques (Lagadic et al., 1994). L'importance de la déplétion énergétique pourrait refléter la puissance du stress subi (Rajalekshmi et al., 1993) mais le stockage énergétique saisonnier et l'utilisation chez les mollusques bivalves marins sont

étroitement liés aux conditions environnementales (Gabbott et Bayne, 1973; Bayne, 1976) et au cycle gamétogénique annuel (Gabbott, 1975).

Le projet global dans lequel s'insère cette étude vise à développer un réseau trophique modèle permettant de tester l'hypothèse d'un transfert des HAP et de leurs métabolites à partir des sédiments, des particules et de l'eau vers des niveaux trophiques supérieurs et d'évaluer la réponse toxique des organismes ciblés à des niveaux de contamination correspondant strictement à ceux du Système Saint-Laurent-Saguenay. Afin de refléter les divers risques environnementaux près des alumineries, il est nécessaire d'étudier les effets de certains HAP et de la matrice résiduelle provenant des différentes étapes du traitement de l'aluminium. Le premier objectif spécifique est de quantifier le transfert des HAP vers un vecteur benthique suspensivore *Mya arenaria* depuis (1) la colonne d'eau contaminée par des fines particules de charbon (coke verte) ou par du phytoplancton servant de vecteur à un mélange de HAP purs, (2) le sédiment contaminé par de la suie fraîche (provenant des boues de dépuración) ou par du B-Lagoon (sédiments contaminés sur une très longue période). Le second objectif spécifique est d'examiner les réponses toxicologiques induites par le transfert de différentes sources de HAP chez cette espèce. Les réponses toxicologiques sont traduites par les variations (1) du système immunitaire avec l'activité et l'efficacité phagocytaires, (2) du stress oxydatif avec la catalase et la malondialdéhyde, (3) des réserves énergétiques avec notamment le glycogène de la glande digestive et de la gonade et (4) de la gamétogenèse. Plusieurs hypothèses seront testées : la première est qu'aucune différence significative n'apparaît entre les

individus témoins et les individus contaminés, la deuxième étant que l'état physiologique des myes contaminées va subir des modifications au niveau du système immunitaire, du stress oxydatif, des réserves énergétiques et de la gamétogenèse; la troisième hypothèse sera que *Mya arenaria* aura la même sensibilité à la contamination au niveau immunologique, oxydatif, énergétique et du développement sexuel. Enfin, la dernière hypothèse sera qu'aucune différence significative n'apparaît entre les différentes sources d'introduction des HAP.

## **1.2. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques**

### **1.2.1. Identité, propriétés, production**

Les HAP sont des substances organiques constituées d'atome de carbone et d'hydrogène formant au moins deux anneaux aromatiques condensés. Ils sont divisés en deux catégories : les composés à faible masse moléculaire formés de moins de quatre anneaux et les composés à masse moléculaire élevée, à quatre anneaux ou plus. La présente étude ne porte que sur les HAP non substitués, ne contenant que des atomes de carbone et d'hydrogène. Les propriétés physiques des HAP varient selon leur masse moléculaire et leur structure (LCPE, 1994). Leurs coefficients de partage octanol/eau ( $K_{ow}$ ) sont relativement élevés, ce qui dénote un important potentiel d'adsorption sur les matières particulaires en suspension dans l'air et dans l'eau, ainsi qu'un fort potentiel de bioconcentration dans les organismes (Weston, 1990; Law et al., 2002).

### **1.2.2. Pénétration dans l'environnement**

Les HAP peuvent être libérés dans l'environnement par des phénomènes naturels; toutefois, les activités anthropiques sont une importante source de rejet de HAP dans l'environnement. Les estimations des émissions atmosphériques de HAP au Canada, basées sur l'examen de sources ponctuelles et diffuses de 45 secteurs sources, démontrent que les alumineries constituent la deuxième source principale d'émissions de HAP (derrière les feux de forêts), comptant pour 21 % (925 t) des émissions (LCPE, 1994).

### **1.2.3. Historique des HAP dans l'Est du Québec**

Depuis les années 1940, les alumineries ont grandement contribué à l'essor économique de la Côte Nord, du Saguenay et du Lac Saint-Jean. Des concentrations élevées de HAP caractéristiques des processus de combustion ont été rapportées dans le Fjord du Saguenay et la Baie des Anglais, et sont associées aux déchargements historiques par les alumineries (Gearing et al., 1993).

### **1.2.4. Devenir**

Les HAP dans la colonne d'eau, tout comme dans l'atmosphère, sont généralement associés à des matières particulaires. Les principaux processus régissant le devenir des HAP dans l'eau sont la volatilisation, la photolyse, l'hydrolyse, la biodégradation, l'adsorption sur les matières particulaires et, enfin, la sédimentation. Les sédiments sont le point de fuite environnemental final pour les HAP où ils persistent et se transforment très

lentement. Les HAP sont relativement stationnaires dans les sédiments. Néanmoins, ces sédiments peuvent être partiellement remis en suspension et ensuite déplacés par des processus de transport.

### 1.3. Impacts des HAP sur les invertébrés marins et choix de biomarqueurs

Niveau	Types de réponses	Effets au niveau supérieur
Biochimique-cellulaire	Toxicité Altération métabolique Dommages cellulaires Détoxication	Métabolites toxiques Perturbation dans les processus énergétiques et cellulaires Adaptation
Organisme	Changements physiologiques Changements comportementaux Susceptibilité aux maladies Effort reproductif Viabilité larvaire Ajustement dans les fonctions Réponses immunitaires	Réduction de la performance de la population Régulation et adaptation des populations
Population	Structure Age/taille Recrutement Mortalité Biomasse Ajustement du rendement reproductif et autres caractéristiques démographiques	Effets sur la productivité des espèces et de la coexistence des espèces et de la communauté Adaptation de la population
Communauté	Abondance des espèces Distribution des espèces Biomasse Interactions trophiques Adaptation à l'écosystème	Remplacement par des compétiteurs plus adaptés Production secondaire réduite Aucun changement dans la structure et le fonctionnement de la communauté

Tableau 1 : Niveaux de réponse des organismes marins aux contaminants chimiques issu de McDowell (2005) adapté de Capuzzo (1981).

Face à un stress chimique, chaque type d'organismes a une capacité d'adaptation basée sur des processus de régulation. Comme dit précédemment l'utilisation d'espèces sentinelles comme indicatrices de la contamination chimique s'est notamment faite dans les programmes de suivi de l'environnement marin (Chase et al., 2001; Nicholson et Lam, 2005). Cette approche a augmenté les connaissances sur la distribution spatiale et temporelle des contaminants et des effets associés aux organismes sentinelles (Chase et al., 2001). Les effets des contaminants chimiques sur les mollusques bivalves ont été examinés intensivement depuis les deux dernières décennies. La majorité des études portent sur la moule commune *Mytilus edulis* (Lowe et Fossato, 2000) avec une volonté d'intégrer les réponses sur différents niveaux de la hiérarchie biologique (Tableau 1).

### **1.3.1. Le système immunitaire**

Bien que le système immunitaire des invertébrés 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 (ex. : les myes possèdent des molécules de défense de type défensines). Le fait que les invertébrés représentent plus de 90 % du nombre total des espèces vivantes sur terre démontre l'efficacité de leur système de défense « primitif ».

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 (i.e. les phagocytes) et humorales (i.e. le complément) (Pipe et Coles, 1995; Pipe et al., 1995; Lowe et al., 2000). Diverses stratégies sont utilisées par les invertébrés pour détruire les micro-organismes invasifs ou opportunistes. Celles-ci incluent la phagocytose, l'agglutination, l'encapsulation, le relâchage de molécules microbicides et l'apoptose (Cheng, 1996) qui sont réalisés par les hémocytes considérés comme l'équivalent des cellules inflammatoires des vertébrés. De plus, les hémocytes produisent des molécules incluant les enzymes lysosomiales (estérases et aminopeptidase) et les molécules antimicrobiennes qui contribuent à la destruction des organismes pathogènes. La classification des hémocytes la plus souvent citée est celle présentée par Cheng (1981), basée sur des critères morphologiques, qui comprend trois lignées cellulaires : les hémocytes granulaires (comprenant différents types de granulocytes), les hémocytes agranulaires (comprenant les « macrophage-like », les hyalinocytes et les « monocyte-like ») (Auffret, 1988) et les cellules séreuses qui sont agrégées avec de nombreux globules pigmentaires. Les fonctions des différentes sous-populations hémocytaires sont encore mal déterminées, mais l'observation cellulaire des hémocytes montre des différences structurales suggérant la possibilité de fonctions différentes.

Les bivalves, de nature sessile, sont continuellement soumis à une contamination par de nombreux polluants tels que les HAP. Les effets des contaminants environnementaux peuvent résulter en action toxique directe sur les tissus ou cellules ou en altérations des mécanismes homéostasiques incluant le système immunitaire (Moore et al., 1978). Il a été

prouvé que les HAP possèdent des effets immunotoxiques, notamment l'altération des fonctions immunitaires. D'où des conséquences variées telles l'immunodépression, l'immunostimulation, l'hypersensibilité ou l'autoimmunité (Fournier et al., 2004).

Le nombre d'hémocytes et leur viabilité pourraient être de bons biomarqueurs de toxicité lors d'une contamination par les HAP. Ainsi, une diminution du nombre d'hémocytes a été notée chez les bivalves suite à une exposition aux HAP, bien que les concentrations ne reflètent pas celles de l'environnement (Sami et al., 1992; Grundy et al., 1996b; Fournier et al., 2002). La phagocytose, comme réponse sensible à l'exposition aux xénobiotiques et ayant un rôle critique dans l'élaboration de plusieurs réponses immunitaires, est un biomarqueur de choix pour mesurer l'immunotoxicité (Blaise et al., 2002b). Parallèlement, à la diminution hémocytaire, plusieurs études ont montré l'inhibition de l'activité phagocytaire chez des organismes exposés aux HAP (Anderson et al., 1981; McCormick-Ray, 1987; Sami et al., 1992; Dyrinda et al., 2000; Wootton et al., 2003). Suite à l'injection de 1 à 5 mM d'anthracène (HAP), des effets ont été observés sur l'intégrité des membranes lysosomiales des cellules digestives de *Mytilus edulis* (Moore et al., 1978; Lowe et Fossato, 2000). Les lysosomes sont des organelles capables d'ingérer et de dégrader les macromolécules d'origine intra et extracellulaires, incluant les contaminants chimiques et sont donc une cible importante des contaminants. Ils représentent ainsi de bons biomarqueurs (Lowe et al., 1995). Une autre étude rapporte l'effet in vivo de 500 nM de fluoranthène sur le temps de rétention du rouge neutre des lysosomes (Grundy et al., 1996a; Grundy et al., 1996b). De plus, des études d'exposition



d'un mélange d'anthracène, de fluoranthène et de phénanthrène ont montré une diminution de la phagocytose et des dommages aux lysosomes de *Mytilus edulis* avec des concentrations variant de 40 à 250  $\mu\text{M}$  (Coles et al., 1994).

### 1.3.2. Le système oxydatif

La santé des organismes aquatiques peut aussi être affectée par le stress oxydatif (Di Giulio et al., 1989). Ce mécanisme est dépendant de l'oxygène (flambée oxydative) et correspond à la libération de radicaux toxiques de l'oxygène lors de la perturbation par des xénobiotiques, tels les HAP (Cossu et al., 2000; Pellerin et al., 2004). L'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et les composants intermédiaires avec une haute activité bactéricide, font partie des ROS (Reactive Oxygen Species) (Pipe, 1992). Le terme d'espèces réactives de l'oxygène regroupe ainsi:  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{OCl}^-$  et le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Les ROS sont produites à partir d'une réaction oxydante couplée à la phagocytose, ou à l'activation des hémocytes (Adema et al., 1991).

L'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ), source ultime de ces oxydants (Chu 2000), est converti en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), participant ainsi à la destruction des phospholipides membranaires, par la superoxyde dismutase (SOD) et éventuellement sous forme d'autres espèces hautement toxiques (Manduzio et al., 2005). Ces radicaux oxygénés sont toxiques et peuvent réagir avec d'autres composés pour former des molécules encore plus toxiques. Ils jouent un rôle essentiel dans l'élimination des particules phagocytées (bactéries, virus,

levures, et protozoaires). Par ailleurs, lorsque le lysosome fusionne avec le phagosome, l'activité de la myéloperoxidase produit de l'hypochlorite à partir du peroxyde d'hydrogène et des ions chlorure.

Ces ROS vont conduire à des dommages sur l'ensemble des constituants cellulaires, notamment la dénaturation oxydante des acides aminés et des bases azotées et la peroxydation lipidique (entraînant la fragilisation des membranes lysosomales) (Ross et Moldeus, 1991; Tremblay et Pellerin-Massicotte, 1997). Cette dernière, par la perturbation des fonctions membranaires, se traduira par une diminution de la fluidité des membranes et par conséquent affectera l'activité phagocytaire suite à l'inactivation des enzymes situées au niveau des membranes. La production continue et régulière de radicaux libres va générer une cancérisation des tissus, un vieillissement prématuré ou des néoplasies (Manduzio et al., 2005).

Afin de réguler la production de ROS, des systèmes antioxydants interviennent dans les cellules d'organismes soumis à un stress induit par des substances xénobiotiques telles que les HAP. Un stress oxydatif, est le résultat de contaminants présents dans le milieu ou d'un déficit de l'action des systèmes antioxydants. Chez les mammifères dont les tissus produisent constamment des ROS toxiques au cours de leur métabolisme normal, de nombreux systèmes antioxydants protègent les cellules. Ce sont des enzymes telles que la SOD (superoxyde dismutase) qui convertit les  $O_2^-$  en  $H_2O_2$  ( $2O_2^- + 2H^+ = H_2O_2 + O_2$ ) la catalase qui réduit  $H_2O_2$  en eau dans les péroxysomes ( $2H_2O_2 = 2H_2O + O_2$ ) et la glutathion

réductase qui convertit le glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) ( $H_2O_2 + 2GSH = GSSG + 2H_2O$ ) (Ross et al. 1991). Ce sont aussi des composés piègeurs de radicaux, de poids moléculaires plus faibles : vitamines A, C et E, glutathion, caroténoïdes, etc. (Ross et Moldeus, 1991). Certains de ces systèmes antioxydants ont été mis en évidence chez les bivalves marins (Livingstone et al., 1992). La glutathion-peroxydase est la voie enzymatique la plus importante. Elle permet la dégradation des radicaux  $OH\cdot$ ,  $H_2O_2$ ,  $RO\cdot$  et  $ROOH$ .

De nombreuses études ont montré des variations saisonnières des activités antioxydantes chez les espèces marines (Viarengo et al., 1991; Orbea et al., 2002). Ces variations sont dues aux fluctuations de température, de salinité, du taux d'oxygène et de la quantité de nourriture disponible (Viarengo et al., 1991).

Chez *Mytilus edulis* une exposition in vivo de 1 à 2  $\mu M$  de fluoranthène (HAP) durant 7 jours diminue le nombre total d'hémocytes circulant, leur production de ROS et le relâchage de peroxydase et phenoloxydase (Coles et al., 1994; Gomez-Mendikute et al., 2002). D'autres études supposent le relâchage de peroxydase et la production de ROS comme des cibles potentielles pour les HAP (Gomez-Mendikute et al., 2002). Les hémocytes de *Mytilus galloprovincialis* exposés au B $\alpha$ P, (HAP, 2-150  $\mu M$ ) durant 1 heure montrent une augmentation de la production de l'anion superoxyde, une diminution du temps de rétention au rouge neutre et une perturbation des filaments d'actine du cytosquelette (Larson et al., 1989). Enfin, le naphthalène entraîne une diminution de la

chemoluminescence induite par les ROS des hémocytes de *Crassostrea virginica* à des concentrations de 80 à 800  $\mu\text{M}$ .

L'activité catalasique présente des avantages évidents en tant que biomarqueur. En effet, bien que fonctionnant en association avec la superoxyde dismutase, ces augmentations d'activités sont cependant plus précoces et nettes que celles de la SOD (Di Giulio et al., 1993). Ainsi, des augmentations de l'activité catalasique ont été notées lors d'exposition aux HAP (Livingstone et al., 1993; Garcia Martinez et al., 1995). La malondialdéhyde, un produit issu de la peroxydation lipidique, traduit l'inefficacité des systèmes antioxydants face à une agression toxique. Le niveau de MDA est proportionnel à l'étendue de la peroxydation lipidique, d'où son utilisation comme biomarqueur pour la mesure du stress oxydant. La MDA est généralement corrélée avec la réduction de la totalité des enzymes antioxydatives (Doyotte et al., 1997; Geret et al., 2002). La présence de HAP provoque une augmentation de MDA chez *Perna viridis* (Cheung et al., 2001; Cheung et al., 2004), chez *Mytilus trossulus* et *Mya arenaria* (Downs et al., 2002).

### **1.3.3. Les réserves énergétiques**

De nombreuses études ont examiné les variations saisonnières dans la composition biochimique des bivalves marins imposées par le cycle reproductif (Lowe et al., 1982). Ainsi, chez *Mytilus edulis*, des cycles réguliers d'entreposage de protéines, de lipides et de glycogène ont lieu généralement l'été, période de repos sexuel où la nourriture est

abondante. Les réserves ainsi entreposées seront utilisées durant l'automne et l'hiver pour fournir l'énergie requise à la gamétogenèse. Puis au printemps la ponte s'effectue par séries successives (Epp et al., 1988). Il apparaît ainsi que le cycle reproducteur et celui d'entreposage des réserves sont fortement liés (Thompson, 1984). Un tel cycle reproducteur est caractérisé par Bayne (1976) comme étant de nature conservatrice. Ce modèle cyclique de la reproduction ne s'applique pas à tous les bivalves. Des études sur des populations de *Mytilus edulis* de Terre-Neuve (Emmet et al., 1987) et de Vancouver (Emmet et al., 1987) ont démontré que la gamétogenèse ne se produit pas durant l'automne et l'hiver, mais plutôt au printemps en même temps que le début de l'accumulation des réserves énergétiques. Cette accumulation se produit grâce à l'arrivée printanière de nourriture. L'hiver constitue une période de repos sexuel où les réserves énergétiques restantes sont utilisées pour le maintien du métabolisme (Gabbott et Bayne, 1973; Navarro et al., 1989). Chez ces bivalves, le cycle d'entreposage et le cycle reproducteur se recouvrent temporairement, et ce type de reproduction est caractérisé par Bayne (1976) comme étant opportuniste. Ainsi, il y a de considérables variations dans l'organisation du cycle reproducteur chez les bivalves marins (Bayne, 1976). De même, des changements dans le contenu en glycogène, en lipide et en protéine peuvent être induits par des fluctuations environnementales naturelles ou artificielles, telles que des températures extrêmes, l'anaérobiose et des jeûnes prolongés (Kluytmans et al., 1980; Pieters et al., 1980). Les niveaux de réserves énergétiques, ont été montrés comme de bons biomarqueurs de stress chez les mollusques bivalves (Pellerin-Massicotte et al., 1993). Des substances xénobiotiques, notamment les HAP, présentent un effet délétère sur la vitellogenèse des

poissons (Nicolas, 1999), agissant ainsi comme perturbateurs endocriniens (Lintelmann et al., 2003). Ces réserves énergétiques, de même que le stress oxydatif et le système immunitaire, vont traduire l'état physiologique de l'organisme étudié.

#### 1.4. Modèle biologique choisi comme organisme sentinelle

*Mya arenaria* est un mollusque bivalve de l'ordre des Eulamellibranches, sous-ordre des Hétérodontes et de la famille des Myidés. C'est un organisme pélicypode, filtreur, suspensivore et fouisseur qui vit dès l'âge adulte enfoui (jusqu'à 10 cm) dans la matrice sédimentaire des baies côtières abritées, depuis le Labrador jusqu'à la Caroline du Nord. Au Québec, elle appartient à la communauté à *Macoma balthica* (Desrosiers et Brêthes, 1984).



Figure 1 : schéma de *Mya arenaria* (issu de [www.biopix.dk](http://www.biopix.dk))

*Mya arenaria* est gonochorique mais ce dimorphisme sexuel est observable uniquement au niveau de la structure de la gonade (Coe et Turner jr., 1938). Elle atteint la maturité après 2 ou 3 ans lorsque la coquille mesure 20 mm. Dès lors les gonies primaires commencent à se multiplier et à se différencier en cellules germinales mâles (spermatogonies) ou femelles (ovogonies). Lors de la différenciation sexuelle, les cellules folliculaires accumulent des inclusions caractéristiques pour chaque sexe. A partir de ce

moment, se déroule la gamétogenèse qui comprend la formation des ovocytes (ovogenèse) chez la femelle et celle des spermatozoïdes (spermatogenèse) chez le mâle (Coe et Turner jr., 1938). Les caractéristiques du développement de la gonade ont fait l'objet d'études histologiques qui ont mis en évidence six stades de développement de la gonade mâle et femelle (tableau 2). Cet organisme présente une gamétogenèse bimodale dans l'estuaire du Saint-Laurent avec deux périodes de maturation pour la gonade (Roseberry et al., 1991; Gauthier-Clerc et al., 2002) : une première maturation au printemps et l'autre à l'automne. La gamétogenèse s'arrête en hiver. Cependant il y a une succession d'utilisation du glycogène, d'entreposage des lipides et de remobilisation des lipides, tout au long de l'été, de l'automne et même de l'hiver. Ce type de reproduction bimodale, également noté sur les côtes de l'Atlantique nord (Brousseau, 1978), reflète un comportement opportuniste (Bayne, 1976) et fait coïncider la période de reproduction avec celle d'un apport nutritionnel optimal du milieu.

<b>Stade de développement de la gonade mâle</b>	<b>Stade de développement de la gonade femelle</b>
Indifférencié : aucune spermatogonie visible	Indifférencié : aucune ovogonie visible
Développement 1 : spermatogonie à la périphérie des alvéoles	Prévitellogénique : petite ovogonie à la périphérie des alvéoles
Développement 2 : spermatoocytes en différenciation vers le centre de l'alvéole	Vitellogénique : ovocytes en développement à la périphérie de l'alvéole
Mûr : alvéole pleine de spermatozoïde	Post-vitellogénique : ovocytes mûrs libre dans l'alvéole
Ponte : spermatozoïdes seulement visibles dans le centre de l'alvéole	Ponte : faible nombre d'ovocytes mûrs non encore expulsé
Passé : plus de spermatozoïdes	Passé : ovocytes en dégénération restant dans l'alvéole

*Tableau 2 : catégorisation de chaque stade du développement de la gonade mâle et femelle. Issu de Gauthier-Clerc et al.(2006) .*

Chez *Mya arenaria*, comme chez tous les autres bivalves, l'énergie dérivée de l'alimentation et destinée à la gamétogenèse est stockée puis consommée selon un cycle biochimique interdépendant de la gamétogenèse (Bayne, 1976). Ce cycle est particulièrement marqué dans la gonade où se développent les gamètes. Gauthier-Clerc et al. (2002) ont parfaitement illustré ce phénomène chez les myes lors d'une étude sur la rive Nord du Saint-Laurent par un suivi saisonnier des concentrations en protéines, lipides et glycogène qui sont les trois formes principales des réserves énergétiques. Du mois de mai au mois de juin, alors que l'activité de la gonade est à son maximum et que près de 66% des gonades sont au stade de ponte en juillet, le pourcentage des réserves représenté par le glycogène diminue, alors que celui concernant les lipides augmente. Cette observation illustre d'ailleurs clairement le fait que le glycogène est le principal soutien de la gamétogenèse et est remobilisé durant le processus de vitellogenèse alors que les concentrations en lipides, principale forme de réserve énergétique des œufs, augmentent dans ces derniers (Gabbott, 1975). Ce phénomène est également désigné comme un cycle de stockage pour le glycogène (Gabbott, 1975). Dans les gonades de myes, une baisse de lipides se produit avec le temps, ce qui pourrait également s'expliquer par le cycle de reproduction. Les lipides étant la principale source d'entreposage des œufs de mollusques (Tremblay, 1992), la diminution de lipides serait donc reliée à la libération des gamètes (Goldberg, 1975; Burns et Smith, 1981; Andral et al., 2004).

Comme tous les mollusques bivalves, *Mya arenaria* présente un système immunitaire dont l'appareil hémolympatique est un système circulatoire de type semi-ouvert,



comprenant un cœur, des vaisseaux et des sinus, où circule l'hémolymphe. Les hémocytes peuvent être présents dans différents compartiments tels que le compartiment circulatoire et les sinus. Précédemment, une étude basée sur l'apparence des hémocytes de myes, avait distingué deux types hémocytaires; les agranulocytes (diamètre cellulaire moyen de 5,43  $\mu\text{m}$ ) représentant 23,5% de la population et les granulocytes (diamètre cellulaire moyen de 7,47  $\mu\text{m}$ ) (Huffman et Tripp, 1982). Actuellement, deux sous-populations d'hémocytes sont également repérables par l'utilisation de la cytométrie de flux (Brousseau et al., 2000; Fournier et al., 2001; Fournier et al., 2002). La première sous-population, les granulocytes, représente environ 85% des hémocytes. La seconde représente une sous-population hétérogène correspondant probablement aux hyalinocytes (Brousseau et al., 2000; Fournier et al., 2001; Fournier et al., 2002).

**CHAPITRE 2 :**

**PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF POLYCYCLIC  
AROMATIC HYDROCARBONS ON SOFT-SHELL  
CLAM *MYA ARENARIA***

H. Frouin <sup>a</sup>, J. Pellerin <sup>a</sup>, M. Fournier <sup>b\*</sup>, E. Pelletier <sup>a</sup>, N. Pichaud <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institut des Sciences de la Mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, 310  
allée des Ursulines, C.P. 3300, Rimouski, G5L 3A1, Québec, Canada

<sup>b</sup> INRS-Institut Armand Frappier Santé humaine, 245 Hymus Boul., Pointe-Claire,  
H9R 1G6, Québec, Canada

\* Corresponding author. Tel.: +1-514-630-8824; fax: +1-514-630-8850

*E-mail address:* Michel.Fournier@iaf.inrs.ca (M. Fournier)

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of the polycyclic aromatic hydrocarbons on the physiological status of the bivalve *Mya arenaria*. Specimens were exposed to sediment contaminated with soot and B-Lagoon and to water contaminated with carbon particles and contaminated phytoplankton for a period of 30 days and bivalves were let to recover during 20 days. At days 8, 15, 30 and 50, immune parameters (phagocytic activity and efficiency) were monitored in hemocytes. Different antioxidant parameters including catalase and lipid peroxydation were quantified in digestive gland as well as tissue concentrations of PAHs. Glycogen levels in gonad and digestive gland were also measured and gametogenesis stages were investigated. Results showed that decrease of phagocytosis was well correlated with the transfer of contaminants from water column and sediments to the bivalves and their subsequent bioaccumulation. In the digestive gland tissues, the lipid peroxydation (malondialdehyde) was found to increase in the clams contaminated but no differences were observed in the catalase activities. A delay in gametogenesis occurred in clams contaminated. Males were more sensitive than females to PAH exposition. A dysfunction in steroid synthesis is suspected to occur due to the exposure to PAHs.

*Keywords* : Aluminum smelter; Endocrine disruption; Energy reserves; Immune system; Oxidative stress; Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); Sexual maturation; Soft-shell clams (*Mya arenaria*)

## 1. INTRODUCTION

There is a worldwide concern about the state of the marine environment, the higher frequency of epizootics and the emergence of new diseases in aquatic animals (Harvell et al., 1999). Anthropogenic contaminants may partly be responsible for this increase in disease incidence by adversely affecting immunity, thus enhancing susceptibility to infection (Pipe and Coles, 1995). Petrogenic and pyrogenic sources of PAHs are in continuous production around the world and the coastal marine sediments represent a major reservoir for these ubiquitous compounds (Raoux et al., 1999). The aluminum smelter is alleged to be in the Saguenay Fjord (Martel et al., 1986) the primary source of PAHs input into the marine environment through loss of green coke during transport to the smelter and release of PAHs through airborne emissions, surface runoff, and waterborne effluents (Simpson et al., 1996).



In mammals, PAHs are immunosuppressive (Vos et al., 1989). In fish, macrophage activities and lymphocyte proliferation decrease after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (Reynaud and Deschaux, 2005). In bivalve molluscs, hemocytes (main component of their immune system) (Chu, 2000), capable of executing several immune functions notably phagocytosis (Lopez et al., 1997; Beaven and Paynter, 1999), are an ideal biological endpoint (Wong et al., 1992; Fournier et al., 2002). The effects of PAHs on the immunocompetence have been observed on phagocytic activity of *Mercenaria mercenaria* (Anderson et al., 1981), *Cerastoderma edule* (Wootton et al., 2003), *Crassostrea virginica*

(Sami et al., 1992) and *Mytilus edulis* (Grundy et al., 1996b; Dyrzynda et al., 2000). Exposure to PAHs leads to the formation of reactive oxygen species (ROS) which affect immune system as a result of lipid peroxidation and membrane destabilisation (Di Giulio et al., 1989). Anti-oxidative enzymes as superoxide dismutase and catalase (CAT), involved in defence systems against radicals generated by oxidative pollutants, are used as biomarkers of exposure to environmental stresses (Livingstone et al., 1992; Pellerin-Massicotte, 1994). CAT is a peroxisomal hydroperoxidase that degrades H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O and O<sub>2</sub> (Gianni et al., 1985). Malondialdehyde (MDA) levels, a product of lipid peroxidation, are used as markers for oxidative stress (Pellerin-Massicotte, 1997; Cheung et al., 2004). Exposure to PAHs have led to increased catalase and peroxydase activities as well as to increased malondialdehyde level in *Mytilus edulis* (Garcia Martinez et al., 1995), in *Mya arenaria* and *Mytilus trossulus* (Downs et al., 2002) and in *Perna viridis* (Cheung et al., 2004).

Energy reserves are considered as biomarkers reflecting sublethal changes from a stressful xenobiotic exposure (Lagadic et al., 1994). Energy is generally stored as glycogen in bivalves until gametogenesis (Gabbott, 1975) when the glycogen and lipid stores are converted. Long term exposure to diesel oil at 30 and 130 mg L<sup>-1</sup> caused internal degeneration of gametes produced by *M. edulis* (Lowe et al., 1986). Glycogen, which is also the fuel for different metabolic and physiological processes, responds quite well to contamination (Pellerin-Massicotte, 1994; Gauthier-Clerc et al., 2002). PAHs have been found to have a deleterious effect on the vitellogenesis of fish from feral populations as

well as in laboratory experiments (Nicolas, 1999). However the effects of these pollutants on gametogenesis in bivalves are unknown.

Bivalve molluscs are common sentinels used in biomonitoring programs to assess toxicity, bioavailability and potential trophic transfer of PAHs in the food chain (Burns and Smith, 1981). Their worldwide distribution together with their sedentary nature, filter-feeding behaviour and ability to bioaccumulate pollutants make them ideal species for investigation (Salanki et al., 2003; Andral et al., 2004). To better understand the toxic impact chemical stresses might have on intertidal zone biota, the present study was centered on an infaunal bivalve, *Mya arenaria* (Pellerin-Massicotte et al., 1993; Blaise et al., 2002a). In the present work, activity and efficiency of phagocytosis, CAT activities and MDA levels, glycogen reserves and sexual development were used to assess the effects of particulate PAHs in this clam. The exposure to PAHs was realized in both water column (PAHs in suspended particulate matter) and sediment compartments, and the impacts of this contamination were measured on *Mya arenaria*.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Clams and sediment**

Soft shell clams (*Mya arenaria*) were collected in June 2005, at low tide, on the south shore of the St. Lawrence Estuary near Metis Beach (48°40'N, 68°00'W), a remote location exempt from direct sewage inputs or harbour activities (Fournier et al., 2002). All

specimens were between 55-65 mm in shell length. Clean sediments were distributed in 15 aquaria and each aquarium was supplied with flowing sea water (8-10°C) at a constant flow of 500 mL per min to avoid the formation of bacterial layer at the surface. Upon arrival to the Pointe-au-Père station, 36 organisms were transferred and acclimated in each aquarium for 2 weeks prior to the experiment, to reduce stress due to handling. Studies in laboratories have shown that stress due to the transfer of the soft shell clam lasted only 7 days (Pellerin-Massicotte et al., 1993).

The sediment of Metis Beach was taken in the first 10 cm then was passed through a stainless sieve (1 mm) to remove pebbles and shell-debris.

## **2.2. Exposure protocol**

To reflect the diverse environmental risks near the aluminum smelter, it is necessary to study the effects of PAHs and the residual matrix coming from different steps in the treatment of aluminum on soft-shell clams. Various operations at the smelter generate PAHs. They occur in effluent discharges primarily due to dust from potroom roofs that are captured in precipitation and surface runoff. Other sources include scrubbed alumina losses and raw material (green coke) handling. Green coke is the raw form of coke received at the smelter, which is calcined for use in the manufacture of anodes; a by-product of oil refining. Typical base effluent discharge from the smelter consists of cooling water releases and limited amounts of process water. Surface runoff from the smelter site, originating as

snowmelt and rain, account for most of the water releases (soot). The primary source of PAHs in sediment is former process material losses (potroom wet scrubbers liquid discharge via the B-Lagoon system). B-Lagoon is designed to remove contaminants by sedimentation or settling, and to smooth fluctuations in inflows and contaminant levels.

Exposures to PAHs and residual matrix were carried out by adding carbon particles and PAHs to seawater and by adding soot and “B-Lagoon” to sediments. Fifteen aquariums were used: three controls and three by type of contamination.

Seawater was contaminated in two ways. For the first kind of contamination, 2 g of fine carbon particles (green coke) was suspended in each aquarium every day (0.92 ppm). For the second kind of contamination, a mixture of pure PAHs was prepared by dissolving 0.061 g of 2-methyl phenanthrene, 0.102 g of naphthalene, 0.099 g of 2-methylnaphthalene, 0.222 g of phenanthrene, 0.102 g of anthracene, 0.314 g of pyrene, 0.097 g of benzo-(a)-pyrene and 0.252 g of fluoranthene in ethanol. This mixture was added to a suspension of phytoplankton ( $20.10^6$  cells per mL with a flow of 2.5mL per min) for a final concentration of PAHs of 100 ng/L per aquarium every day.

Sediments were also contaminated in two ways. For the first kind of contamination, some soot (2 % of weight of sediment) coming from smelteries (33.3 ppm) were mixed with sediments. For the second kind of contamination, a historical sediment, “B-Lagoon”, (2 % of weight of sediment) coming from surrounding area of an aluminum smelter (46.2 ppm) were blended with sediments.



The whole experience lasted 50 days. Contamination experiment was stopped at day 30 and clams were let to recover and depurate for the last 20 days. Control and contaminated clams (n=6 by aquarium) were collected randomly in each series of aquariums and organisms were replaced by control organisms from Metis Beach to keep the same biomass and filtration volume throughout the experimental period. Clams were sampled at day 0 (2005/07/12) in control aquariums, at days 8 (2005/07/20), 15 (2005/07/27), 30 (2005/08/11) and at day 50 (2005/08/31) after the depuration period in control and contaminated aquariums. After each sampling, the organisms were kept on ice and brought to the laboratory for analysis. The sex determination was performed after the sampling by consequence the number of individuals for a total of 18 organisms (6 clams x 3 aquariums) varied for each group and for each date between 6 and 16 for the male and between 2 and 12 for the female clams (minimal and maximal values obtained) according to random sampling.

### **2.3. Immunological analysis**

Hemolymph containing hemocytes was collected from the posterior adductor muscle sinus using a 5 ml syringe with 23G needle (Brousseau et al., 2000). The cells were kept in hemolymph and stored on ice during manipulations. Phagocytosis was monitored using a microplate modified cytometric method (Brousseau et al., 2000; Fournier et al., 2002). For each organism, 200  $\mu$ L of hemolymph, placed in duplicatas in a 96-well microplate, were mixed with yellow-green latex FluoSpheres (Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA),

diameter 1.716  $\mu\text{m}$ , at a ratio of 1:30 (hemocytes: beads). After a centrifugation at 1550 rpm ( $\approx 750\text{ g}$ ), samples were incubated at room temperature in the dark. After 18h, the microplate was emptied by inversion. Cells with phagocytised beads were resuspended in 200  $\mu\text{L}$  of a solution (50 mL of flow cytometric solution, Hematall (Fisher, Montreal, Canada) mixed with 100 mg of sodium azide and 0.250 mL of formaldehyde). A flow cytometer was used to acquire phagocytosis parameters. A FASCan was used (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, Mountain View, CA, USA) with an air cooled argon laser, providing an excitation at 488 nm. Hemocyte populations were defined based on their forward (FSC) and right angle scatter (SSC) properties. Fluorescent emissions were collected at 520 nm, which is the frequency band emitted by the beads. A total of 10 000 events were acquired for each sample and stored in the list mode data format. The data were then analysed once displayed as two-parameters, complexity (SSC) and cell size (FSC) then, the fluorescence (FL1) frequency distribution histogram of the hemocyte population was obtained. The results were expressed as the percent of hemocytes having engulfed one bead or more (phagocytosis activity), and three beads or more as a marker of efficiency of phagocytosis cells, representing the more active hemocytes (Brousseau et al., 2000).

## **2.4. Biochemical analysis**

The digestive gland of each organism was dissected out and divided into 3 parts for biochemical analysis. For catalase analysis, fresh tissue was homogenised in 3mL of

phosphate buffer (0,1M, pH 7.0). For malondialdehyde analysis, fresh tissue was homogenised in 3mL of KCl buffer (150 mM). All samples were stocked at -80°C.

The catalase activity was estimated with Amplex® Red Catalase assay kit (Molecular Probes, Eugene, OR) and measured spectrophotometrically at a wavelength of 540 nm with a UV spectrophotometer. Protein concentrations were measured spectrophotometrically using the Bradford method (1976) modified for microplates using BIORAD reagent (BIORAD, Mississauga, ON). A wavelength of 595 nm was used, with BSA (fractionV) as the protein standard. Results of catalase were expressed as U per mg protein.

MDA levels were estimated with Bioxytech® MDA-586 assay kit (OxisResearch, Portland, Oregon, USA) and measured spectrophotometrically at a wavelength of 590 nm with a UV spectrophotometer. Results were expressed as  $\mu\text{M}$  per g wet tissue.

## **2.5. Energy reserves analysis**

Gonad and digestive gland of each organism were dissected out, weighted and homogenised in 1mL of citrate buffer (pH 5.0) for glycogen analysis.

Glycogen in crude extracts was hydrolysed with amyloglucosidase, and glucose was further analysed by enzymatic determination (Carr and Neff, 1984). Glycogen type II from oyster (Sigma G-8751) was used as standard. Glycogen was estimated as the difference

between values of glucose released in the incubated extracts reported on standard curve and values of the glucose measured in the crude homogenates.

## 2.6. Histological study

Gonads were cut in sections of 5  $\mu\text{m}$  at  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  with a Cryotome® 0620 (Thermo® Shandon®), then stained in a mix of methylene blue basic fuchsin. Sex and the six maturation stages were determined in light transmission microscopy (Leitz Ortholux II) according to Gauthier-Clerc et al. (2006).

## 2.7. PAH analysis

In this study, PAH analysis was realized by a method adapted from Brion and Pelletier (2005). Wet tissue was lyophilized and then crushed into fine particles. Dry tissue (0.2g) was added to 5 ml of 50 (v/v) hexane:acetone and first sonicated for 30 min at  $30^{\circ}\text{C}$  (Branson® 5210 Ultrasonic bath), then shaken for 3 h, and finally sonicated again for 30 min at  $30^{\circ}\text{C}$ . Then the sample was centrifuged 15 min at 3000 rpm ( $\approx 1500\text{ g}$ ). The extract was evaporated to 0.5 ml under nitrogen stream in an ice-bath. The sample was transferred to an Enviropack® 18 column (3 ml/500 mg), eluted with 9 ml of 90:10 (v/v) hexane:acetone. The eluate was then concentrated to 0.2-0.3ml under nitrogen stream in an ice-bath and 3 ml acetonitrile was added. The volume was again reduced to 0.2 ml before HPLC-F (high-performance liquid chromatography with fluorescence detection) analysis. The final volume was reduced to 0.5 ml and a 25  $\mu\text{l}$  of 8  $\mu\text{g/ml}$  PAH standard solution (Quebec

Ministry of Environment PAH mix from Supelco Co.) was added for internal standardization before HPLC-F analysis.

## 2.8. Statistical analysis

The results were statistically analysed using SigmaStat (Release 3.0) (Jandel, Scientific Software, San Rafael, CA). Normality (Kolmogorov-Smirnov test) and homogeneity of variance (Levene Median test) were first checked and a parametric (ANOVA) or non-parametric (Kruskall-Wallis) one way ANOVA was subsequently performed on data. When significant differences were found ( $P < 0.05$ ), a Multiple Pairwise Comparison Procedure was used to isolate the different groups (Tukey's Test). Significance was concluded at  $P < 0.05$ .

# 3. RESULTS

## 3.1. PAH tissue concentrations

Results are summarised in table 3. The compounds of PAHs did not present in the same proportions in all contaminants. The fact that for the analyses of controls clams, we should pool the control organisms of days 8, 15, 30 and 50 to obtain a weight of 200 mg, the results do not show the variations if they existed. In organisms exposed to carbon particles, total PAH concentrations decreased until the day 30 and increased by during the depuration period. In clams contaminated with a technical mixture of PAHs adsorbed on

phytoplankton, a peak occurred at day 8, total PAH concentration decreased until the day 15, and then a mild increase was noted until the day 30 and finally decreased during the depuration period. In clams exposed to soot, a peak occurred at day 15, total PAH concentration decreased strongly until the day 30 and milder during the depuration period. Finally, in organisms exposed to B-Lagoon, a peak occurred at day 15, total PAH concentration decreased faintly until the day 30 and stronger during the depuration period.

### **3.2. Phagocytosis**

Activity of phagocytosis representing the percentage of hemocytes having engulfed one bead or more is presented in Fig. 2. Phagocytic activity in contaminated males was significantly (carbon particles,  $P < 0.001$ ; mixture of PAHs,  $P = 0.003$ ; soot,  $P = 0.03$ ; B-Lagoon,  $P < 0.001$ ) suppressed after 8 days of contamination. The inhibition of phagocytosis was more important in animals exposed to carbon particles and B-Lagoon. After depuration period, a return to basic conditions occurred. Efficiency of phagocytosis, assessed by the measure of hemocytes having engulfed three beads or more, is illustrated in Fig. 3. Phagocytic efficiency decreased significantly after 8 days of exposure in male clams (carbon particles,  $P < 0.001$ ; mixture of PAHs,  $P = 0.001$ ; soot,  $P = 0.015$ ; B-Lagoon,  $P < 0.001$ ). The inhibition of phagocytosis was also significant in animals exposed to carbon particles and B-Lagoon. At the end of experiment, the phagocytosis of contaminated clams returned to the same level than the controls. Phagocytosis decreased significantly

throughout the experiment for male (day 15,  $P=0.003$ ; day 30,  $P=0.01$ ; day 50,  $P<0.001$ ) and for female (day 8,  $P=0.028$ ; day 30,  $P=0.024$ ; day 50,  $P=0.002$ ) control clams.

### 3.3. Oxidative stress

Catalase activities following PAH exposure (Fig. 4) did not show any increase. At day 8, a significant decrease occurred when male clams were exposed to mixture of PAHs ( $P=0.021$ ). After the depuration period, levels were lower than in control organisms and a significant decrease occurred between controls and male clams exposed to mixture of PAHs ( $P=0.007$ ), to soot ( $P=0.024$ ) and to B-Lagoon ( $P=0.007$ ) and. Significant increases were observed in control animals after 30 days for females ( $P=0.047$ ) and after 50 days for males ( $P<0.001$ ).

Significant responses of oxidative stress occurred with increases of MDA (Fig. 5). Significant increases occurred after the exposure to phytoplankton contaminated by the technical mixture of PAHs after 15 days both in male ( $P<0.001$ ) and female ( $P<0.001$ ) clams. Significant increases of MDA were observed after the exposure to soot coming from smelteries and to sediments contaminated with B-Lagoon after 30 days in both female ( $P=0.017$ ) and male ( $P=0.027$ ) organisms. After the depuration period, levels of MDA for clams exposed to sediments contaminated with B-Lagoon returned near those of the control clams.

### 3.4. Glycogen reserves

Glycogen reserves in digestive gland (Fig. 6) showed a significant increase between control and carbon particles ( $P=0.011$ ), technical mixture of PAHs ( $P=0.003$ ) and B-Lagoon ( $P=0.01$ ) after 30 days in male. Significant increases occurred between control and mixture of PAHs ( $P=0.001$ ) in female. Although, in control males, glycogen concentration decreased not significantly throughout the experience, in control females, glycogen concentration increased not significantly until the day 15 and decreased after.

In gonad, glycogen reserves (Fig. 7) increased significantly between control and technical mixture of PAHs ( $P=0.007$ ) and B-Lagoon ( $P=0.002$ ) after 15 days and between control and carbon particles ( $P=0.024$ ), technical mixture ( $P<0.001$ ) and soot ( $P<0.003$ ) after 30 days in male clams. A significant increase in glycogen levels occurred between control and B-Lagoon ( $P=0.01$ ) after 8 days and between control and technical mixture of PAHs ( $P=0.022$ ) after 15 days in female clams. After the depuration period, levels of glycogen decreased for clams that were previously contaminated.

### 3.5. Reproductive cycle

In control organisms, spawning occurred around the day 15, for females 33% were in pre-vitellogenic stage, 33% were in spawning stage and 33% were in spent stage and for males 20% were in development stage, 26% were in ripe stage and 53% were in spawning stage (Fig. 8). Although for females, a delay of gametogenesis occurred with carbon



particles (36%: pre-vitellogenic, 45%: vitellogenic, 18%: post-vitellogenic) until the day 30 and technical mixture of PAHs (50%: pre-vitellogenic and 50%: spent) until the day 50, for males a delay occurred with all treatments. In contaminated male clams, the spawning occurred around the day 50 with carbon particles (25% were in development stage, 37.5% were in ripe stage and 37.5% were in spawning stage), with mixture of PAHs (31% were in development, 31% were in ripe and 37.5% were in spawning stage) and with B-Lagoon (25%: development, 12.5%: ripe and 62.5%: spawning). In males contaminated with soot, the spawning happened around the day 30 (20% were in development, 30% were in ripe and 50% were in spawning stage).

Table 3 : Results of digestive gland polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) bioaccumulation (ng PAH/ g dry tissue)

Compound	Control		Carbon particles				Mixture of PAHs				Soot				B-Lagoon			
	Day 0	Days 8, 15, 30, 50	Day 8	Day 15	Day 30	Day 50	Day 8	Day 15	Day 30	Day 50	Day 8	Day 15	Day 30	Day 50	Day 8	Day 15	Day 30	Day 50
Fluorene	0	0	0	0	116	0	3 041	0	0	0	2 165	0	0	0	0	0	0	0
Phenanthrene	1 586	1 679	1 592	752	0	674	1 131	440	2 840	570	1 221	0	0	0	0	0	2 587	1 130
Anthracene	711	265	1 047	159	62	251	3 593	314	335	360	1 490	0	0	0	0	0	0	0
Fluoranthene	334	847	21	108	4	1 184	949	1 052	133	1 074	110	4 763	1 625	613	0	0	0	259
Pyrene	214	176	331	91	30	238	580	615	757	273	858	4 611	756	520	784	3 799	3 261	234
Benzo(c)phenanthrene	56	47	0	22	18	61	102	57	54	71	571	648	622	402	576	0	0	231
Benzo(a)anthracene	23	34	4	14	41	12	10	0	36	23	1 497	5 908	39	2 558	1 002	2 188	2 105	840
Chrysene	12	0	44	9	16	56	0	0	0	19	669	1 563	1 332	559	1 004	2 734	5 774	756
7,12-dimethylbenzo(a)anthracene	7	33	64	1	0	3	33	19	0	2	2 365	4 655	2 595	2 515	1 822	6 526	234	1 465
Benzo(b)fluoranthene	24	39	30	7	99	13	8	9	0	12	1 443	8 808	6 189	5 007	4 401	1 715	4 204	255
Benzo(k)fluoranthene	12	17	40	3	40	5	0	5	7	4	1 736	1 997	1 736	1 152	1 498	2 211	1 860	598
Benzo(a)pyrene	73	27	1	11	49	10	772	298	328	18	2 357	2 639	2 304	1 596	1 831	2 338	2 033	579
Dibenzo(a,l)pyrene	15	9	4	2	0	2	0	0	0	1	0	42	232	176	288	1 899	1 229	0
Dibenzo(a,h)anthracene	3	2	1	0	9	0	6	0	0	0	1 805	180	157	66	0	1 836	0	0
3-methylcholanthrene	2	5	0	1	10	3	2	1	0	1	113	487	427	214	441	113	93	88
Total organic carbon	3 070	3 178	3 179	1 182	493	2 511	10 225	2 810	4 489	2 428	18 402	36 301	18 014	15 378	13 647	25 359	23 380	6 435

Figure 2 : Effects of exposure to PAHs on phagocytic activity of hemocytes. Results are expressed as percentage of hemocytes, collected from (A) male and (B) female *Mya arenaria* contaminated for 30 days, having engulfed one bead or more. Results are given as mean  $\pm$  standard deviation. Asterisks indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between controls at day 0 and other sampling dates and letters denote significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments during the same sampling.

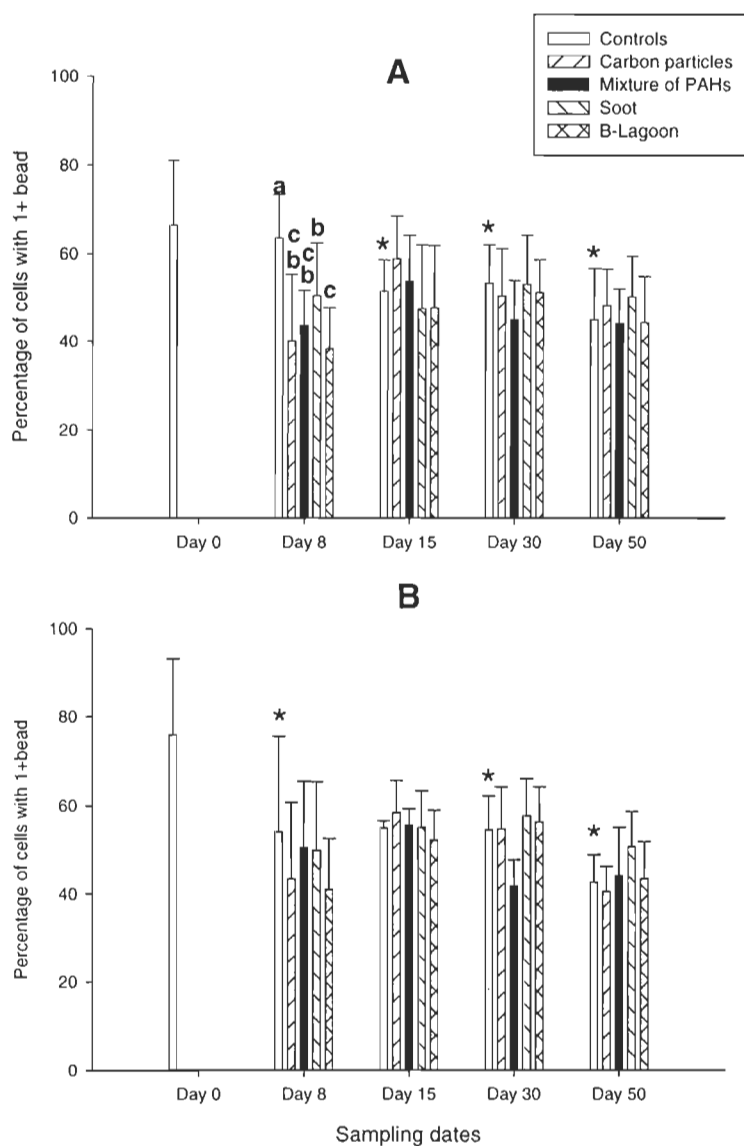


Figure 3 : Effects of exposure to PAHs on phagocytic efficiency of hemocytes. Results are expressed as percentage of hemocytes, collected from (A) male and (B) female *Mya arenaria* contaminated for 30 days, having engulfed three beads or more. Results are given as mean  $\pm$  standard deviation. Asterisks indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between controls at day 0 and other sampling dates and letters denote significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments during the same sampling.

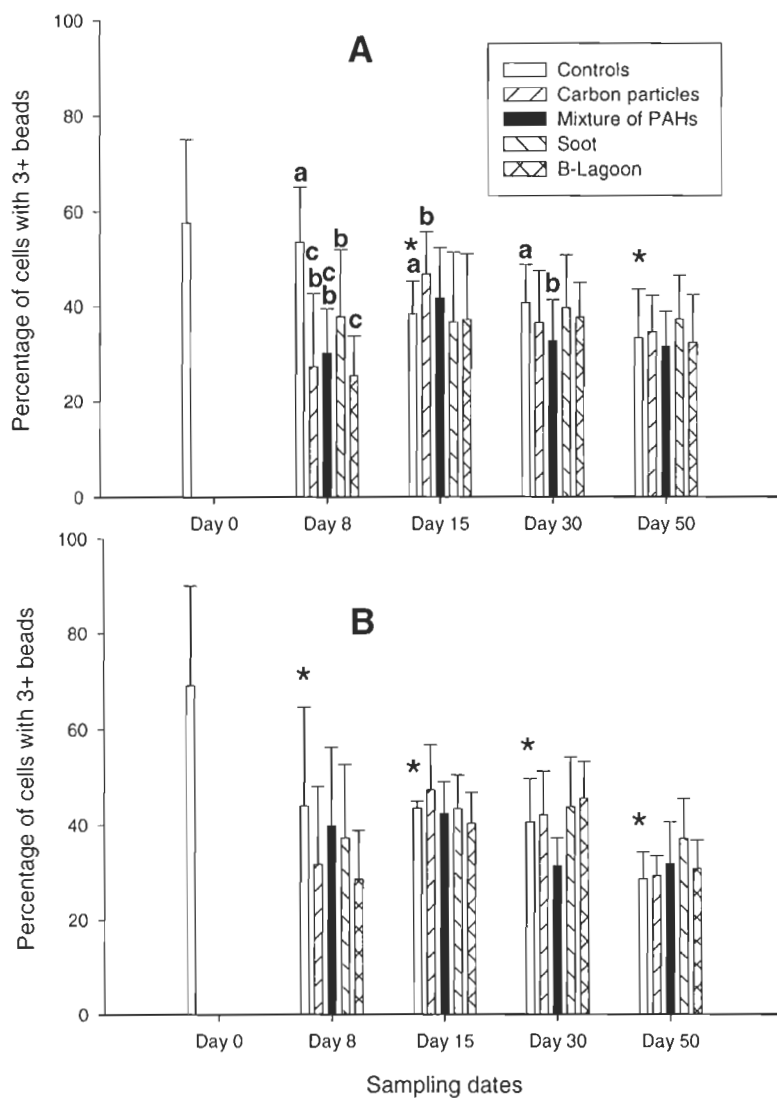


Figure 4 : Effects of exposure to PAHs on catalase activities in the digestive gland. Results are expressed as  $U\ mg^{-1}\ proteins$  from (A) male and (B) female *Mya arenaria* contaminated for 30 days. Results are given as mean  $\pm$  standard deviation. Asterisks indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between controls at day 0 and other sampling dates and letters denote significant differences ( $P < 0.05$ ) from control during the same sampling.

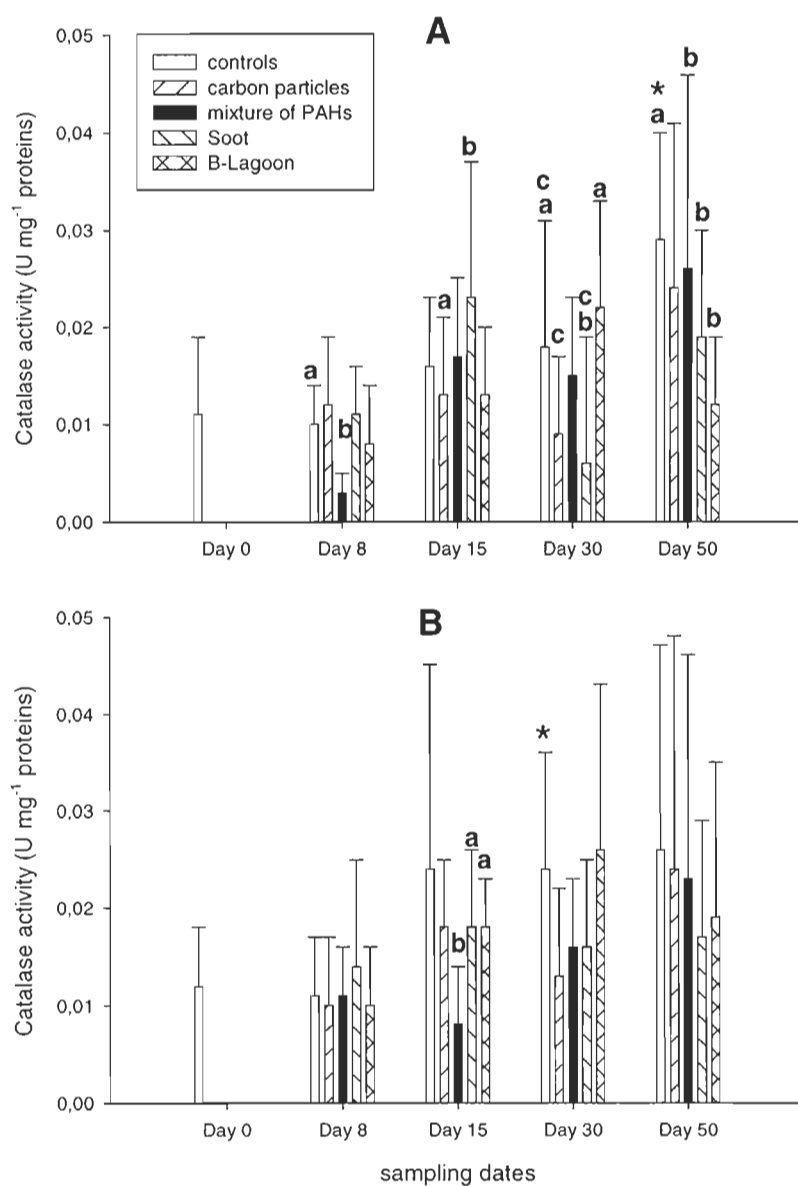


Figure 5 : Effects of exposure to PAHs on malondialdehyde concentration in the digestive gland. Results are expressed as  $\mu\text{M g}^{-1}$  wet weight from (A) male and (B) female *Mya arenaria* contaminated for 30 days. Results are given as mean  $\pm$  standard deviation. Asterisks indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between controls at day 0 and other sampling dates and letters denote significant differences ( $P < 0.05$ ) from control during the same sampling.

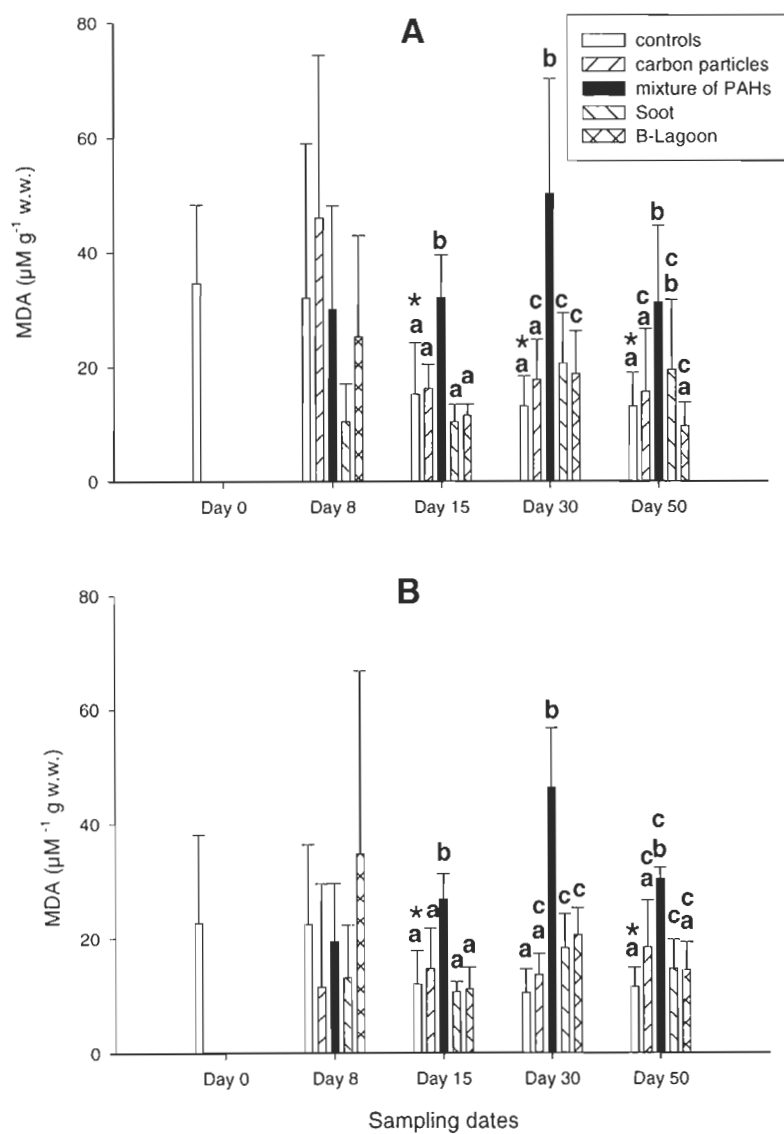


Figure 6 : Effects of exposure to PAHs on glycogen concentration in the digestive gland. Results are expressed as  $\text{mg g}^{-1}$  wet weight from (A) male and (B) female *Mya arenaria* contaminated for 30 days. Results are given as mean  $\pm$  standard deviation. Asterisks indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between controls at day 0 and other sampling dates and letters denotes significant difference ( $P < 0.05$ ) from control during the same sampling.

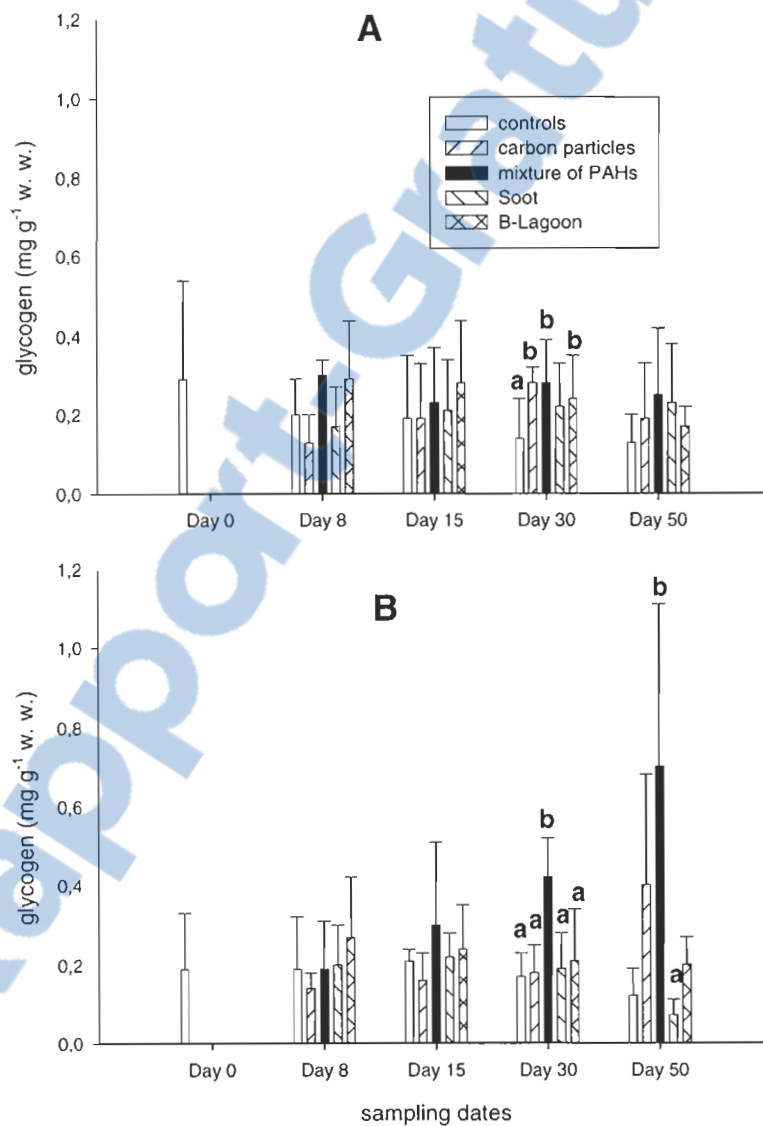


Figure 7 : Effects of exposure to PAHs on glycogen concentration in the gonad. Results are expressed as  $\text{mg g}^{-1}$  wet weight from (A) male and (B) female *Mya arenaria* contaminated for 30 days. Results are given as mean  $\pm$  standard deviation. Asterisks indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between controls at day 0 and other sampling dates and letters denotes significant difference ( $P < 0.05$ ) from control during the same sampling.

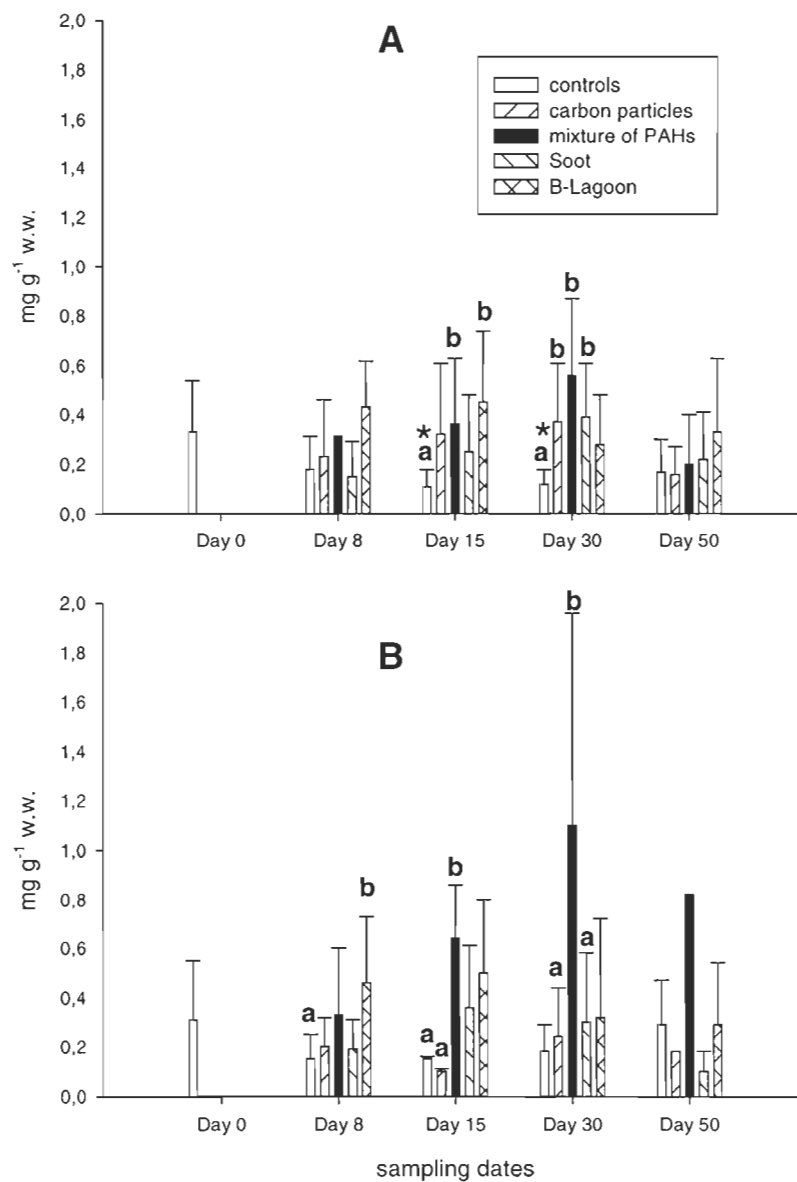
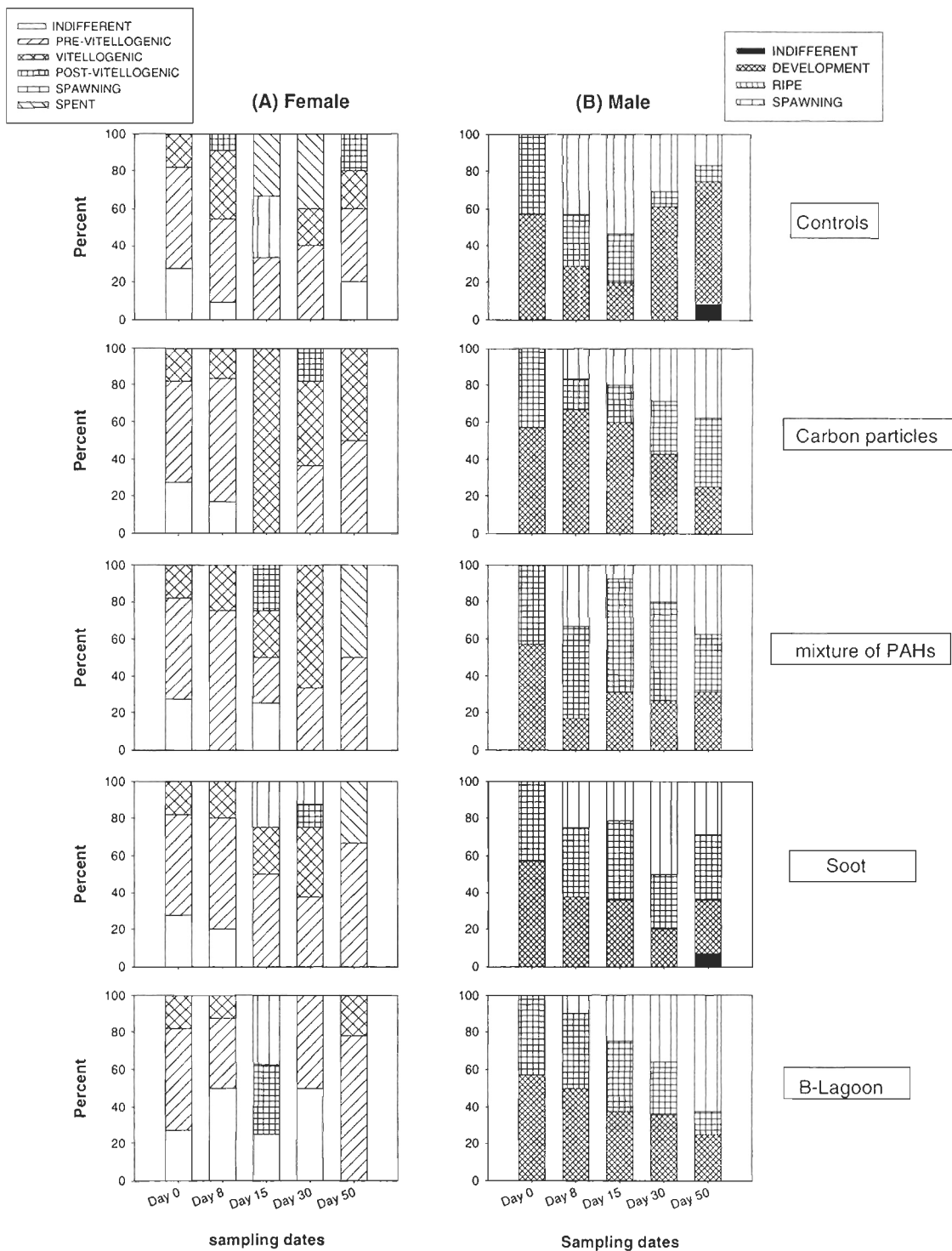




Figure 8 : Effects of exposure to PAHs on gametogenesis in *Mya arenaria*.



## 4. DISCUSSION

All treatments with PAHs reflected different kinds of contamination. Since bivalves have only a low capability to metabolise PAHs, these xenobiotics (being lipophilic) tend to accumulate within the tissues and accurately reflect the magnitude of environmental contamination. The accumulation of PAHs and their biochemical effects on invertebrates are probably related both to the exposure source of PAHs (water column or sediment) and the ability of the organisms to metabolize PAHs. Control clams were exposed to flowing seawater slightly contaminated by light PAHs such as phenanthrene and anthracene most probably from creosote treated wood pieces submerged nearby the seawater intake pipe of the pumping station. This unsuspected and continuous contamination can explain the relatively high level of PAHs observed in control clams at day 0 and also during exposure days. When sediment was the contamination source (soot and B-Lagoon), the highest concentration of PAHs in digestive gland occurred 15 days after the beginning of contamination. High assimilability of PAHs was due to high concentrations of PAHs in particules SPM and deposited particules. In clams exposed to soot, total concentration decreased around the day 30, possibly related to the spawning stage. The release of lipid rich gametes may liberate relatively large quantities of lipophilic organic pollutants (Porte and Albaigés, 1993). After the depuration period in clams exposed to B-Lagoon, total concentration of PAHs decreased. When water column was the exposure source (mixture of PAHs and carbon particles), the highest total concentration of PAHs occurred 8 days after the beginning of contamination. After 8 days of exposure to contaminated phytoplankton,

PAH concentrations in the digestive gland exhibited a decrease, possibly due to a combination of: (1) saturation of uptake sites, (2) stimulation of degradation products and (3) remobilization to other tissues. TBT was also shown to display a biphasic pattern of uptake in gills and digestive gland with higher burdens than in remaining tissues and followed by a subsequent decrease (Coelho et al., 2002). In clams exposed to mixture of PAHs, after the period of depuration, total concentration of PAHs was lowest and a return to initial conditions occurred. In organisms exposed to carbon particles, total concentration of PAHs decreased up to the day 15. A first explanation is that possibly carbon particles blocked gills and animals stopped filtering in the presence of suspended carbon particles in water column. Suspended solids in the water column may exert direct mechanical effects on filter feeders by increasing abrasion, clogging the respiratory surfaces of gills, and/or interfering with feeding mechanisms (Hughes, 1976). This in turn might reduce the intake of suspended particles. Negative responses (closing of valves) have been noted in clams exposed to carbon particles, with opening of valves at various time intervals apparently to test the water conditions (personal observation). However, during depuration period, in the absence of this particle cloud, animals recovered their behaviour and were exposed to carbon particles deposited on the surface of sediment, therefore explaining the increase in PAH bioaccumulation. A second explanation is that adsorption of PAHs from water onto carbon particles leading to depuration of flow through seawater. During depuration period, PAHs from seawater were not adsorbed and were available for the organisms.

Phagocytosis, the predominant mechanism of immunity in bivalves, is commonly monitored in immunotoxicology. Phagocytosis in PAH-exposed bivalves tends to decrease (Anderson et al., 1981; Grundy et al., 1996a; Fournier et al., 2002). In the present study, some significant reductions in both activity and efficiency of phagocytosis were observed 8 days after the contamination in male clams. In female clams, no significant reductions were observed at the same sampling date. After depuration period, a return to basic conditions occurred. This is in agreement with Mayrand et al. (2005), who also showed a partial recovery of phagocytic activity in mussels originating from an industrialized site and transferred to an unindustrialized environment. Since the recovery of immune function in clams occurred during the depuration period, the effects of PAHs at concentrations used for this experience were reversible. In control organisms, significant decreases in both activity and efficiency of phagocytosis were noted after 8 days for females and after 15 days for males. This phenomenon can be related to the sexual maturation throughout the experience and to the spawning that occurred around the day 15. A recent study had shown a decrease of phagocytic activity at the spawning stage (Cartier et al., 2004). The increase during spawning of sex steroids could possibly have a suppressive effect on the phagocytic activity of hemocytes. Immunological performance may be subject to rapid temporal changes due to possible resource re-allocation between the immune system and reproduction, or through immunomodulation by reproductive hormones (Wedekind and Folstad, 1994; Folstad and Skarstein, 1997). According to the immunocompetence handicap hypothesis (Folstad and Karter, 1992), the production of testosterone during breeding may involve a concomitant reduction in male immune defence. That is why the males could be more sensitive to

pollutants than females. In mammals, the breeding period itself may cause physiological stress, which can affect immune function (Buchanan, 2000). Future studies, on the effects of gametogenesis on the immune function in bivalves would be of value to confirm this interaction. Because the spawning affects immune functions and because the present study documents that the exposure to PAHs affects the spawning, if immune functions are affected by exposure to PAHs, we can not affirm that this is directly linked to immunomodulator effects of PAHs or to the effects of spawning. However, since at day 8, immune system of male clams were affected and since they were not in spawning stage, we can conclude that immunomodulator effects were connected to impacts of PAHs and not at the spawning stage. But, further studies should assess the immunological effects of PAHs in some conditions unfavourable to the spawning.

Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and the resulting oxidative damage may be a mechanism of toxicity in marine bivalves exposed to pollution (Pellerin-Massicotte, 1994). PAHs were shown to increase the production of ROS leading to oxidative stress (Winston and Di Giulio, 1991). In bivalves, the antioxidant activity may be induced by an exposition to PAHs (Cheung et al., 2004). The increased activities of CAT are known to serve as protective responses to eliminate reactive free radicals. In control organisms, significant increases were observed after 30 days for females and after 50 day for males. This can be explained by the fact that antioxidant enzyme activities, especially catalase, are generally enhanced in summer (Pellerin-Massicotte, 1997; Orbea et al., 1999; Orbea et al., 2002), indicating some relationship between enzymatic activities and

gametogenesis (Filho et al., 2001). In the present study, since responses of CAT activities do not reflect the impacts of PAHs, another way was possibly preferred to regulate the retrieval of free radicals. As in bivalves, an exposure to PAHs showed an increase simultaneously between the levels of superoxyde dismutase and catalase (SOD works in association with CAT) (Livingstone et al., 1993), this way could have been chosen.

Several studies have shown enhanced lipid peroxidation in aquatic organisms exposed to high concentrations of toxicants, notably PAHs (Downs et al., 2002). Levels of MDA in both males and females clams were significantly higher after 8 days with clams exposed to mixture of PAHs as compared to levels found in control organisms. This increase of MDA could result in a saturation of antioxidant systems. At day 30, in both sexes, level of MDA with clams exposed to mixture of PAHs was significantly higher. Increases of MDA occurred also between controls and clams exposed to soot and B-Lagoon. These results confirmed the inefficiency of antioxidant enzymes for the detoxification of cells during the exposure to contaminants. Whereas, after depuration period, a return to initial conditions occurred in organisms contaminated with B-lagoon, but recovery did not occurred in organisms contaminated with mixture of PAHs and soot. Since, the recuperation of initial MDA levels in clams exposed to B-Lagoon occurred during the depuration period, the effects of PAHs were reversible. However, the concentrations of PAHs came from soot and mixture of PAHs used for this experiment, were not reversible, since no recuperation occurred during the depuration process. In control organisms, significant decreases were observed after 15 days in both male and

female clams. The decreasing level MDA in these organisms could depend upon physiological factors like gonad maturation (Viarengo et al., 1991). Variations in antioxidant defence systems in digestive gland appear to have an inverse relationship to the level of lipid peroxidation (Viarengo et al. 1991). An increase in antioxidant enzyme activity coincides with a reduction in lipid peroxidation formation (Niyogi et al., 2001). The variations of individual antioxidants are useful for understanding the mode of action of a chemical stressor and the possible molecular interaction with specific responses.

Analyses of seasonal changes in the biochemical composition of bivalves (Gabbott, 1975) have revealed that storage and mobilization of reserves (mainly glycogen) are closely linked to the annual reproductive cycle. The reproductive and biochemical cycles are thus often closely coupled in bivalves. Some differences in glycogen concentrations in digestive gland were observed between control and exposed organisms. At day 30, in male clams, glycogen concentration in clams exposed to carbon particles, mixture of PAHs and B-Lagoon were significantly higher. Gametogenesis represents a period of particularly high energy demand, when both maintenance costs and the cost of gamete synthesis must be met by the food supply, stored reserves or a combination of both. In control organisms, lower glycogen concentrations in gonad were observed when the gonad development occurred, and the lowest concentration was observed at the day 15 when spawning period occurred. In the days just preceding spawning there was a period of accumulation of glycogen in the digestive gland. After spawning, the glycogen content of the digestive gland declined as it was transferred to the gonad (Bayne, 1976).

Actually, there is clear evidence that numerous xenobiotic compounds act as endocrine disrupters (EDs) in wildlife affecting reproductive functions (Depledge and Billinghamurst, 1999). The interference of xenobiotics with the synthesis and clearance of key sex hormones may also alter bioavailable amounts of active hormones within the organism and be a potential mechanism of endocrine disruption. Despite the absence of knowledge about PAH effects on bivalve reproduction, these organic chemical pollutants are often referred as estrogenic xenobiotics (Lintelmann et al., 2003). In control organisms, in both male and female clams, the spawning occurred around the day 15 of the experience, but in females exposed to carbon particles, spawning took place around the day 30. And in females exposed to mixture of PAHs, spawning happened around the day 50. In males contaminated with soot, the organisms spawned around the day 30. The males contaminated with carbon of particles, mixture of PAHs and B-Lagoon spawned around the day 50. A first explanation of the delays in sexual maturation in contaminated clams is based on the fact that ROS-induced oxidative stress may alter steroidogenesis by indirectly or directly impairing the function of steroid producing cells. Plasma membrane function in steroidogenic cells may be indirectly changed by ROS-induced lipid peroxidation resulting in altered membrane fluidity, increased membrane permeability and leakiness, and, ultimately, a breakdown of membrane architecture (Oakes et al., 2005). A second explanation is based on the hypothesis of an estrogenic control of gametogenesis in *Mya arenaria*. Neuroendocrine factors are known to be involved in the control mechanisms of energy storage and sexual maturation in bivalves (Lubet et Mathieu, 1990; Wang et al.,



2004). However, how estrogens in bivalves induce vitellogenesis is still a subject of investigation. The roles of estrogens and androgens in gametogenesis are well characterized, in which estrogens are involved in control of the growth of the female gonad whereas androgens stimulate growth and development of the male gonad (Wang et Croll, 2004). Our results show males were more sensitive than females to exposure to PAHs during sexual maturation. Delays in spermatogenesis and concomitant effects on gonadal growth have been well documented in studies investigating the effects of exposure of male fish to either natural or environmental estrogens during sexual maturation (Panter et al., 1998). Jobling et al. (2002) showed in contrast that the growth and development of the testes, the maturation of ovaries of female fish exposed to environmental estrogens appeared to be less obviously affected. A recent field work has indicated a positive relationship between environmental exposure to PAHs, lipophilic organic chemical pollutants that accumulate in lipid-rich tissues like the gonads, and an inhibitory effect on CYP17, 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (17  $\beta$ -HSD), and P450 aromatase in vitellogenic ovarian tissue of the flounder (*Platichthys flesus* L.) (Rocha Monteiro et al., 2000). In vertebrates, CYP17 hydroxylates the 17 $\alpha$  position of pregnenolone or progesterone to form the respective 17 $\alpha$ -hydroxysteroids. The 17 $\alpha$ -hydroxysteroids are further converted to androstenedione and testosterone in male and female gonads. The balance between these androgens depends on the activity of 17 $\beta$ -HSD; high 17 $\beta$ -HSD activity favours the formation of testosterone. In both these organs, CYP450 or P450 aromatase is capable of converting androstenedione and testosterone into estrone and 17 $\beta$ -estradiol, respectively. During sexual maturation, 17 $\beta$ -HSD activities increase, and this

activity decline after spawning (Mori et al., 1966). Estrogen synthesized in the estrogenic cells of the ovary through aromatization by P450 aromatase is apparently involved in vitellogenin synthesis, and testicular estrogen may play a physiological role in spermatogenesis (Osada et al., 2004). In Gauthier-Clerc et al. (2006), in female clams, concentrations of estradiol and testosterone increased during spawning. In male clams, concentration of estradiol increased but concentration of testosterone decreased during spawning stage. So, if PAHs interact with steroid synthesis and prevent transformation of testosterone in estradiol, the spawning in males should be delayed more strongly than in females. Considering the possible container effects and numerous uncertainties of the effect of certain PAHs we can only suppose the reproductive success of bivalves living in environments polluted by these organic chemical pollutants may be compromised.

The results highlight the need to fully describe seasonal oestrogenic and vitellogenic activity in clams all along gametogenesis and the consequences of an exposure to xeno-oestrogens. More study is necessary to elucidate the physiological role of the estrogenic compounds as well as their potential interactions with extrinsic and intrinsic factors to understand endocrine disruptor pathways in bivalves during gametogenesis.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was funded by NSERC cooperative research program. Many thanks are due to staff of laboratory of Dr. Jocelyne Pellerin and staff of laboratory of Dr. Emilien

Pelletier for laboratory and fieldwork assistance. Sediment samples were provided by Alcan Ltée.

## CHAPITRE 3 :

### CONCLUSION GENERALE

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés d'intérêt environnemental à cause de leur potentiel cancérigène, de leur activité mutagène et de leur forte présence dans l'environnement. Notamment dans le milieu marin, une exposition à ces xénobiotiques peut entraîner des perturbations chez les organismes vivants. Dans cette étude, différents marqueurs ont donc été utilisés afin de déterminer l'impact produit par les HAP, provenant des alumineries, chez un mollusque bivalve, la mye, *Mya arenaria*.

Des dommages se produisent en présence des HAP et quel que soit la voie d'introduction de ces derniers (colonne d'eau ou compartiment sédimentaire). Un stress oxydatif se crée, démontré par l'augmentation des taux de malondialdéhyde, qui traduit la peroxydation lipidique et confirme ainsi l'inefficacité des enzymes antioxydantes pour la détoxification des cellules durant l'exposition aux contaminants. Ce stress oxydatif va donc engendrer des dommages cellulaires et entraîner également une perturbation du système immunitaire. L'activité et l'efficacité phagocytaire vont se trouver diminuées, notamment chez les myes mâles. Les mâles semblent plus touchés, potentiellement dû à une immunomodulation par les hormones reproductives. Après la période de dépuración, un retour aux conditions initiales du système immunitaire se produit, démontrant le potentiel de récupération de *Mya arenaria*, capable de revenir à un état physiologique quasi-normal en l'absence de polluants. Le statut reproducteur va également être affecté par les HAP qui

agissent comme perturbateurs endocriniens à action œstrogénique. Des retards de ponte se produisent chez les mâles et femelles contaminés, cependant les mâles semblent plus touchés par l'exposition aux HAP que les femelles durant la maturation sexuelle. L'hypothèse la plus probable est que les HAP inhibent l'aromatase P450 (Rocha Monteiro et al., 2000), qui permet la conversion de la testostérone en  $17\beta$ -estradiol, or durant la ponte chez les mâles la concentration d'estradiol doit augmenter tandis que celle de testostérone doit diminuer. Mais si la conversion ne peut se faire, le taux d'estradiol ne peut pas augmenter, de même que le taux de testostérone ne peut diminuer, d'où un retard dans la ponte.

Une description précise chez les myes des activités vitellogéniques et oestrogéniques tout au long de la gamétogenèse, de même qu'une étude sur les conséquences d'une exposition aux xéno-oestrogènes semblent nécessaires. Enfin, il apparaît indispensable d'élucider le rôle physiologique des composés oestrogéniques aussi bien que leurs interactions potentielles avec des facteurs intrinsèques et extrinsèques pour comprendre les mécanismes des perturbateurs endocriniens chez les bivalves durant la gamétogenèse.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adema, C.M., Van Der Knapp, W.P.W., Sminia, T., 1991. Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. *Rev. Aquat. Sci.* 4, 201-223.
- Anderson, R.S., Giam, C.S., Ray, L.E., Tripp, M.R., 1981. Effects of environmental pollutants on immunological competency of the clam *Mercenaria mercenaria*: impaired bacterial clearance. *Aquat. Toxicol.* 1, 187-195.
- Andral, B., Stanisiere, J.-Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar. Environ. Res.* 49, 704-712.
- Auffret, M., 1988. Bivalve hemocyte morphology. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 18, 169-177.
- Bayne, B.L., 1976. Aspects of reproduction in bivalve molluscs. In: Wiley, M. (Ed.) *Estuarine processes*, NY (USA), pp. 432-448
- Beaven, A.E., Paynter, K.T., 1999. Acidification of the phagosome in *Crassostrea virginica* hemocytes following engulfment of *Zygosoma*. *Biol. Bull.* 196, 26-33.
- Blaise, C., Gagné, F., Pellerin, J., Hansen, P.-D., Trottier, S., 2002a. Molluscan shellfish biomarker study of the Quebec, Canada, Saguenay Fjord with the softshell clam, *Mya arenaria*. *Environ. Toxicol.* 17, 170-186.
- Blaise, C., Trottier, S., Gagné, F., Lallement, C., Hansen, P.-D., 2002b. Immunocompetence of bivalves hemocytes as evaluated by a miniaturized phagocytosis assay. *Environ. Toxicol.* 17, 160-169.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. biochem.* 72, 248-254.
- Brion, D., Pelletier, E., 2005. Modelling PAHs adsorption and sequestration in freshwater and marine sediments. *Chemosphere* 61, 867-876.
- Brousseau, D.J., 1978. Spawning cycle, fecundity and recruitment in a population of soft-shell clam *Mya arenaria* from Cape Ann Massachusetts. *Fish. Bull.* 76, 155-166.
- Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Fournier, M., 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* 142, 145-156.
- Buchanan, K.L., 2000. Stress and the evolution of condition-dependent signals. *Trends Ecol. Evol.* 15, 156-160.
- Burns, K.A., Smith, J.L., 1981. Biological monitoring of ambient water quality: the case for using bivalves as sentinel organisms for monitoring petroleum pollution in coastal waters. *Estuar. Coast. Shelf S.* 13, 433-443.
- Capuzzo, J.M., 1981. Predicting pollution effects in the marine environment. *Oceanus* 24, 25-33.
- Carr, R.S., Neff, J.M., 1984. Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen. *Comp. Biochem. Physiol.*, B 77, 447-449.
- Cartier, S., Pellerin, J., Fournier, M., Tamigneaux, E., Girault, L., Lemaire, N., 2004. Use of an index based on the blue mussel (*Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*)

- digestive gland weight to assess the nutritional quality of mussel farm sites. *Aquacult.* 241, 633-654.
- Chase, M.E., Jones, S.H., Hennigar, P., Sowles, J., Harding, G.C., Freeman, K., Wells, P.G., Krahforst, C., Coombs, K., Crawford, R., Pederson, J., Taylor, D., 2001. Gulfwatch: monitoring spatial and temporal patterns of trace metal and organic contaminants in the Gulf of Maine (1991-1997) with the blue mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 491-505.
- Cheng, T., 1996. Hemocytes: forms and functions. In: Newel, R.I.E.K., V.S., Eble, A.F. (Eds.), *The eastern oyster Crassostrea virginica*, Maryland Sea Grant College, College Park, MD, pp. 299-334
- Cheng, T.C., 1981. Bivalves. In: Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F. (Eds.), *Invertebrate blood cells*, vol. 1. Academic Press, London, pp. 231-300
- Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Li, A.M.Y., Richardson, B.J., Lam, P.K.S., 2001. Relationship between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquat. Toxicol.* 52, 189-203.
- Cheung, C.C.C., Siu, W.H.L., Richardson, B.J., De Luca-Abbott, S.B., Lam, P.K.S., 2004. Antioxydant responses to benzo[a]pyrene and Araclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Environ. Pollut.* 128, 393-403.
- Chiou, C.T., McGroddy, S.E., Kile, D.E., 1998. Partition characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils and sediments. *Envir. Sci. Techno.* 32, 264-269.
- Chu, F.-L.E., 2000. Defense mechanisms of marine bivalves. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. (Eds.), *Recent Advances in Marine Biotechnology. Immunobiology and Pathology*, vol. 5. UK: Science Publishers, Enfield, NH, Plymouth, pp. 1-42
- Clark, R.B., 2002. *Marine Pollution: fifth edition*. Oxford UP (Editors).
- Coe, W.R., Turner jr., H.J., 1938. Development of the gonads and gametes in the soft-shell clam (*Mya arenaria*). *J. Morphol.* 62, 91-111.
- Coelho, M.R., Bebianno, M.J., Langston, W.J., 2002. Routes of TBT uptake in the clam *Ruditapes decussatus*. II. Food as vector of TBT uptake. *Mar. Environ. Res.* 54, 193-207.
- Coles, J.A., Farley, S.R., Pipe, R.K., 1994. Effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 30, 367-379.
- Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 2000. Antioxydant biomarkers in freshwater bivalves, *Uni tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 106-121.
- Depledge, M.H., Billingham, Z., 1999. Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. *Mar. Pollut. Bull.* 39, 32-38.
- Desrosiers, G., Brêthes, J.C., 1984. Etude bionomique de la communauté à *Macoma balthica* de la batture de Rimouski. *Sci. Tech. Eau* 17, 25-30.
- Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W., Jewell, C.S., 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 1103-1123.

- Di Giulio, R.T., Habig, C., Gallagher, E.P., 1993. Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress and DNA integrity in channel catfish. *Aquat. Toxicol.* 26, 1-22.
- Downs, C.A., Shigenaka, G., Fauth, J.E., Robinson, C.E., Huang, A., 2002. Cellular physiological assessment of bivalves after chronic exposure to spilled Exxon Valdez crude oil using a novel molecular diagnostic biotechnology. *Environ. Sci. Technol.* 36, 2987-2993.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.-C., Babut, M., Vasseur, P., 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat. Toxicol.* 39, 93-110.
- Dyrynda, E.A., Law, R.J., Dyrynda, P.E.J., Kelly, C.A., Pipe, R.K., Ratcliffe, N.A., 2000. Changes in immune parameters of natural mussel *Mytilus edulis* populations following a major oil spill ('Sea Empress', Wales, UK). *Mar. Ecol., Progr. Ser.* 206, 155-170.
- Emmet, B., Thompson, K., Popham, J.D., 1987. The reproductive and energy storage cycles of two populations of *Mytilus edulis* (Linne) from British Columbia. *J. Shell. Res.* 6, 29-36.
- Epp, J., Bricelj, V.M., Malouf, R.E., 1988. Seasonal partitioning and utilization of energy reserves in two age classes of the bay scallop *Argopecten irradians irradians* (Lamarck). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 121, 113-136.
- Filho, D.W., Tribess, T., Gaspari, C., Claudio, F.D., Torres, M.A., Magalhaes, A.R.M., 2001. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquacult.* 203, 149-158.
- Folstad, I., Karter, A.J., 1992. Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *Am. Nat.* 139, 603-622.
- Folstad, I., Skarstein, F., 1997. Is male germ line control creating avenues for female choice? *Behav. Ecol.* 8, 109-112.
- Fournier, M., Pellerin, J., Clermont, Y., Morin, Y., Brousseau, P., 2001. Effects of exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology* 161, 201-211.
- Fournier, M., Pellerin, J., Lebeuf, M., Brousseau, P., Morin, Y., Cyr, D., 2002. Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactrometris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes. *Aquat. Toxicol.* 59, 83-92.
- Fournier, M., Lalancette, A., Ménard, L., Christin-Piché, M.-S., De Guise, S., Brousseau, P., 2004. Biomarqueurs immunologiques appliqués à l'écotoxicologie. In: Pelletier, E., Campbell, P.G.C., Denizeau, F. (Eds.), *Ecotoxicologie moléculaire: Principes fondamentaux et perspectives de développement*, Presses de l'Université du Québec, pp. 401-403
- Gabbott, P.A., Bayne, B.L., 1973. Biochemical effects of temperature and nutritive stress on *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 53, 269-286.
- Gabbott, P.A., 1975. Storage cycles in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. In: Barnes, A.



- (Ed.) Proceedings of the 9th European Marine Biology Symposium, Aberdeen University Press, pp. 191-211
- Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Gauthier-Clerc, S., 2002. Alteration of the biochemical properties of female gonads and vitellins in the clam *Mya arenaria* at contaminated sites in the Saguenay Fjord. *Mar. Environ. Res.* 53, 295-310.
- Garcia Martinez, P., Winston, G.W., Metash-Dickey, C., O'Hara, S.C.M., Livingstone, D.R., 1995. Nitrofurantoin-stimulated reactive oxygen species production and genotoxicity in digestive gland microsomes and cytosol of the common mussel (*Mytilus edulis* L.). *Toxicol. Appl. Pharm.* 131, 332-341.
- Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Gagné, F., 2002. Delayed gametogenesis of *Mya arenaria* in the Saguenay fjord (Canada): a consequence of endocrine disruptors? *Comp. Biochem. Physiol., C* 131, 457-467.
- Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Amiard, J.C., 2006. Estradiol-17 $\beta$  and testosterone concentrations in male and female *Mya arenaria* (Mollusca bivalvia) during the reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 145, 133-139.
- Gearing, J.N., Gearing, P.J., Noël, M., Smith, G.W., 1993. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment of the St. Lawrence Estuary. In: Proceedings of the Twentieth Annual Aquatic Toxicity Workshop, Quebec City, Quebec, pp. 58-64
- Gearing, J.N., Gearing, P.J., Noël, M., Smith, J., 1994. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment of the St. Lawrence Estuary. *Can. Tech. Rep. Fish. Aqua. Sci.* 1989, 58-64.
- Geret, F., Jouan, A., Turpin, V., Bebianno, M.J., Cosson, R.P., 2002. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat. Living Resour.* 15, 61-66.
- Gianni, L., Zweiert, J.L., Levy, A., Myers, C.E., 1985. Characterisation of the cycle of iron-mediated electron transfer from adriamycin to molecular oxygen. *J. Biol. Chem.* 260, 6820-6826.
- Goldberg, E.D., 1975. The mussel watch. *Mar. Pollut. Bull.* 6, 111.
- Gomez-Mendikute, A., Etxeberria, A., Olabarietta, I., Carajaville, M.P., 2002. Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo(a)pyrene. *Mar. Environ. Res.* 54, 431-436.
- Grundy, M.M., Moore, M.N., Howell, S.M., Ratcliffe, N.A., 1996a. Phagocytic reduction and effects on lysosomal membranes by polycyclic aromatic hydrocarbons, in haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 34, 273-290.
- Grundy, M.M., Ratcliffe, N.A., Moore, M.N., 1996b. Immune inhibition in marine mussels by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.* 42, 187-190.
- Harvell, C.D., Kim, K., Kurkholder, J.M., Colwell, R.R., Epstein, P.R., Grimes, D.J., Hofmann, E.E., Lipp, E.K., Osterhaus, A.D.M.E., Overstreet, R.M., Porter, J.W., Smith, G.W., Vasta, G.R., 1999. Emerging marine diseases-climate links and anthropogenic factors. *Science* 285, 1505-1510.
- Huffman, J.E., Tripp, M.R., 1982. Cell types and hydrolytic enzymes of soft shell clam (*Mya arenaria*) hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 40, 68-74.

- Hughes, G.M., 1976. Polluted fish respiratory physiology. In: Lockwood, A.P.M. (Ed.) Effects of pollutants on aquatic organisms, Cambridge University Press, Cambridge, p. 163
- James, M.O., Kleinow, K.M., 1993. Trophic transfer of chemicals in the aquatic environment. In: ed., L.P. (Ed.) Aquatic toxicology. Molecular, biochemical and cellular perspectives, pp. 1-38
- Jobling, S., Beresford, N., Nolan, M., Rodgers-Gray, T., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 2002. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biol. Reprod.* 66, 272-281.
- Kluytmans, J.H., Zandee, D.I., Zurburg, W., Pieters, H., 1980. The influence of seasonal changes on energy metabolism in *Mytilus edulis* (L). Anaerobic energy metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.*, B 67, 307-315.
- Kure, L.K., Depledge, M.H., 1994. Accumulation of organotin in *Littorina littorea* and *Mya arenaria* from Danish coastal waters. *Environ. Pollut.* 84, 149-157.
- Lagadic, L., Caquet, T., Ramade, F., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology* 3, 193-208.
- Landrum, P.F., Eadie, B.J., Faust, W.R., 1991. Toxicokinetics and toxicity of a mixture of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons to the amphipod *Diplorea* sp. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 35-46.
- Larson, K.G., Roberson, B.S., Hetrick, F.M., 1989. Effect of environmental pollutants on the chemiluminescence of hemocytes from the American oyster *Crassostrea virginica*. *Dis. Aquat. Org.* 6, 131-136.
- Law, R.J., Kelly, C.A., Baker, K.L., Langford, K.H., Bartlett, T., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments, mussels and crustacea around a former gasworks site in Shoreham-by-Sea, UK. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 903-911.
- LCPE, 1994. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (Liste des substances d'intérêt prioritaire, rapport d'évaluation). Ministre des Approvisionnements et Services Canada.
- Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L., Wenzel, A., 2003. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 75, 631-681.
- Livingstone, D.R., Lips, F., Garcia Martinez, P., Pipe, R.K., 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 112, 265-276.
- Livingstone, D.R., Lemaire, P., Matthews, A.A., Peters, L., Bucke, D., Law, R.J., 1993. Prooxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin o-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. *Mar. Pollut. Bull.* 26, 602-606.
- Lopez, C., Carballal, M.J., Azevedo, C., Villalba, A., 1997. Morphological characterization of the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *J. Invertebr. Pathol.* 69, 51-57.
- Lowe, D.M., Moore, M.N., Bayne, B.L., 1982. Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 62, 133-145.

- Lowe, D.M., Pipe, R.K., 1986. Hydrocarbon exposure in mussels: a quantitative study of the responses in the reproductive and nutrient storage cell systems. *Aquat. Toxicol.* 8, 265-272.
- Lowe, D.M., Soverchia, C., Moore, M.N., 1995. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquat. Toxicol.* 33, 105-112.
- Lowe, D.M., Fossato, V.U., 2000. The influence of environmental contaminants on lysosomal activity in the digestive cells of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon. *Aquat. Toxicol.* 48, 75-85.
- Lubet, P., Mathieu, M., 1990. Les régulations endocriniennes chez les Mollusques bivalves. *L'année biologique* 29, 235-252.
- Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., Leboulenger, F., 2005. The point about oxidative stress in molluscs. *ISJ* 2, 91-104.
- Martel, L., Gagnon, M.J., Massé, R., Leclerc, A., Tremblay, L., 1986. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments from the Saguenay Fjord, Canada. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 133-140.
- Mayrand, E., St.-Jean, S.D., Courtenay, S.C., 2005. Haemocyte responses of blue mussels (*Mytilus edulis* L.) transferred from a contaminated site to a reference site: can be the immune system recuperate? *Aquacult. Res.* 36, 962-971.
- McCormick-Ray, M.G., 1987. Hemocytes of *Mytilus edulis* affected by Prudhoe Bay Crude oil emulsion. *Mar. Environ. Res.* 22, 107-122.
- McDowell, J.E., 2005. Biological effects of contaminants on marine shellfish and implications for monitoring population impacts. In: Buchsbaum, R., Pederson, J., Robinson, W.E. (Eds.), *The decline of fisheries resources in New England: Evaluating the impact of overfishing, contamination, and habitat degradation*, MIT Sea Grant College Program, Cambridge, pp. 119-130
- McGroddy, S.E., Farrington, J.W., 1995. Sediment porewater partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons in three cores from Boston Harbor, Massachusetts. *Envir. Sci. Technol.* 29, 1542-1550.
- McGroddy, S.E., Farrington, J.W., Gschwend, P.M., 1996. Comparison of the in situ and desorption sediment-water partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls. *Envir. Sci. Technol.* 30, 172-177.
- Meador, J.P., Stein, J.E., Reichert, W.L., Varanasi, U., 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 143, 79-165.
- Means, J.C., Wood, S.G., Hassett, J.J., Banwart, W.L., 1980. Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. *Envir. Sci. Technol.* 14, 1524-1528.
- Meyers, P.A., Qujnn, J.G., 1973. Association of hydrocarbons and mineral particles in saline solution. *Nature* 244, 23-24.
- Moore, M.N., Lowe, D.M., Fieth, P.E.M., 1978. Lysosomal responses to experimentally injected anthracene in the digestive cells of *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 48, 297-302.
- Moore, M.N., Pipe, R.K., Farrar, S.V., Thomson, S., Donkin, P., 1987. Lysosomal and microsomal responses to Oil-Derived Hydrocarbons in *Littorina littorea*. In: Capuzzo, J.M., Kester, D.R. (Eds.), *Oceanic processes in marine pollution-*

- Biological Processes and Waste in the Ocean (Vol. I). vol. Biological Processes and Waste in the Ocean. Krieger, Malabar, Florida,
- Mori, K., Tamate, H., Imai, T., 1966. Histochemical study on the change of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the oyster during the stages of sexual maturation and spawning. *Tohoku J. Agri. Res.* 17, 179-191.
- Navarro, E., Iglesias, J.I.P., Larranaga, A., 1989. Interannual variation in the reproductive cycle and biochemical composition of the cockle *Cerastoderma edule* from Mundaca Estuary (Biscay, North Spain). *Mar. Biol.* 101, 503-511.
- Nicholson, S., Lam, P.K.S., 2005. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). *Envir. Inter.* 31, 121-132.
- Nicolas, J.-M., 1999. Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminants. *Aquat. Toxicol.* 45, 77-90.
- Oakes, K.D., Hewitt, L.M., McMaster, M.E., Wood, C., Munkittrick, K.R., Van Der Kraak, G.J., 2005. Oxidative stress and sex steroid levels in fish following short-term exposure to pulp-mill effluents. *J. Toxicol. Environ. Health A* 68, 267-286.
- Orbea, A., Marigomez, I., Fernandez, C., Tarazona, J.V., Cancio, I., Carajaville, M.P., 1999. Structure of peroxisomes and activity of the marker enzyme catalase in digestive epithelial cells in relation to PAH content of mussels from two basque estuaries (Bay of Biscay): seasonal and site-specific variations. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 158-166.
- Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Solé, M., Porte, C., Carajaville, M.P., 2002. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crab and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquat. Toxicol.* 58, 75-98.
- Osada, M., Tawarayama, H., Mori, K., 2004. Estrogen synthesis in relation to gonadal development of Japanese scallop, *Pactinopecten yessoensis*: gonadal profile and immunolocalization of P450 aromatase and estrogen. *Comp. Biochem. Physiol., C* 139, 123-128.
- Panter, G.H., Thompson, R.S., Sumpter, J.P., 1998. Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. *Aquat. Toxicol.* 42, 243-253.
- Pellerin-Massicotte, J., Vincent, B., Pelletier, E., 1993. Evaluation écotoxicologique de la baie des Anglais à Baie-Comeau (Québec). *Water Pollut. Res. J. Can.* 28, 665-686.
- Pellerin-Massicotte, J., 1994. Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *J. Aquat. Ecosyst. Health* 3, 101-111.
- 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.). *J. Rech. Océanogr.* 22, 91-98.
- Pellerin, J., Gauthier-Clerc, S., Siah, A., Assoi-Etchian, O., 2004. Stress physiologique et perturbation endocrinienne chez les bivalves marins. In: Pelletier, E., Campbell, P.G.C., Denizeau, F. (Eds.), *Ecotoxicologie moléculaire: Principes fondamentaux et perspectives de développement*, Presses de l'Université du Québec, pp. 349-400

- Pieters, H., Kluytmans, J.H., Zandee, D.I., 1980. Tissue composition and reproduction of *Mytilus edulis* in relation to food availability. *Neth. J. Sea Res.* 14, 349-361.
- Pipe, R.K., 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.* 16, 111-122.
- Pipe, R.K., Coles, J.A., 1995. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immun.* 5, 581-595.
- Pipe, R.K., Coles, J.A., Thomas, M.E., Fossato, V.U., Pulsford, A.L., 1995. Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon. *Aquat. Toxicol.* 32, 59-73.
- Porte, C., Albaigés, J., 1993. Bioaccumulation patterns of hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in bivalves, crustaceans and fishes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26, 273-281.
- Rajalekshmi, P., Mohandas, A., 1993. Effect of heavy metals on tissue glycogen in the freshwater mussel, *Lamellidens corrianus* (Lea). *Sci. Total Environ. Suppl.* 617-629.
- Raoux, C., Bayona, J.M., Miquel, J.-C., Teyssie, J.-L., Fowler, S.W., Albaigés, J., 1999. Particulate fluxes of aliphatic and aromatic hydrocarbons in near-shore waters to the northwestern mediterranean sea, and the effect of continental Runoff. *Estuar. Coast. Shelf S.* 48, 605-616.
- Regoli, F., Nigro, M., Orlando, E., 1998. Lysosomal and antioxydant responses to metal in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquat. Toxicol.* 40, 375-392.
- Regoli, F., Pellegrini, D., Winston, G.W., Gorbi, S., Giuliani, S., Virno-Lamberti, C., Bompadre, S., 2002. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). *Mar. Pollut. Bull.* 44, 912-922.
- Reynaud, S., Deschaux, P., 2005. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. *Aquat. Toxicol.*
- Rocha Monteiro, P.R., Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit in vitro ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquat. Toxicol.* 48, 549-559.
- Roseberry, L., Vincent, B., Lemaire, C., 1991. Croissance et reproduction de *Mya arenaria* dans la zone intertidale de l'estuaire du St Laurent. *Can. J. Zool.* 69, 724-732.
- Ross, D., Moldeus, P., 1991. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: Vigo-Pelfrey, C. (Ed.) *Membrane lipid oxidation*, vol. 2. CRC Press, pp. 151-170
- Rust, A.J., Burgess, R.M., McElroy, A.E., Cantwell, M.G., Brownawell, B.J., 2004. Role of source matrix in the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons to deposit-feeding benthic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 2604-2610.
- Salanki, J., Farkas, A., Kamardina, T., Rozsa, K.S., 2003. Molluscs in biological monitoring of water quality. *Toxicol. Lett.* 140-141, 403-410.
- Sami, S., Faisal, M., Huggett, R.J., 1992. Alterations in cytometric characteristics of hemocytes from the American oyster *Crassostrea virginica* exposed to a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contaminated environment. *Mar. Biol.* 113, 247-252.

- Simpson, C.D., Mosi, A.A., Cullen, W.R., Reimer, K.J., 1996. Composition and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in surficial marine sediments from Kitimat Harbor, Canada. *Sci. Total Environ.* 181, 265-278.
- Stebbing, A.R.D., 1987. Stress, health and homeostasis. *Mar. Pollut. Bull.* 12, 326-329.
- Swartz, R.C., Schults, D.W., Dewitt, T.H., Ditsworth, G.R., Lamberson, J.O., 1990. Toxicity of fluoranthene in sediment to marine amphipods: a test of the equilibrium partitioning approach to sediment quality criteria. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 1071-1080.
- Thompson, R.J., 1984. The reproductive cycle and physiological ecology of the mussel *Mytilus edulis* in a subarctic, non-estuarine environment. *Mar. Biol.* 79, 277-288.
- Tremblay, R., 1992. Caractérisation de certains processus nutritionnels à différentes échelles temporelles chez deux bivalves vivant en zone intertidale, dans l'estuaire maritime du Saint-Laurent. In: *Océanographie*, vol. Master. Université du Québec à Rimouski, p. 94
- Tremblay, R., Pellerin-Massicotte, J., 1997. Effects of the tidal cycle on lysosomal membrane stability in the digestive gland of *Mya arenaria* and *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, A 117, 99-104.
- Varanasi, U., Reichert, W.L., Stein, J.E., Brown, D.W., Sanborn, H.R., 1985. Bioavailability and biotransformation of aromatic hydrocarbons in benthic organisms exposed to sediment from an urban estuary. *Environ. Sci. Technol.* 19, 836-841.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R., 1991. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol.*, C 100, 187-190.
- Vos, J., Van Loveren, H., Wester, P., Vethaak, D., 1989. Toxic effects of environmental chemicals on the immune system. *Trends Pharmacol. Sci.* 10, 289-292.
- Wang, C., Croll, R.P., 2004. Effects of sex steroids on gonadal development and gender determination in the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Aquacult.* 238, 483-498.
- Wedekind, C., Folstad, I., 1994. Adaptive or nonadaptive immunosuppression by sex hormones? *Am. Nat.* 143, 936-938.
- Weston, D.P., 1990. Hydrocarbon bioaccumulation from contaminated sediment by the deposit-feeding polychaete *Abarenicola pacifica*. *Mar. Biol.* 107, 159-169.
- White, P.A., Blaise, C., Rasmussen, J.B., 1997. Detection of genotoxic substances in bivalve molluscs from the Saguenay Fjord (Canada), using the SOS chromotest. *Mutat. Res.* 392, 277-300.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137-161.
- Witt, G., Trost, E., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of the Baltic Sea and of the German coastal waters. *Chemosphere* 38, 1603-1614.
- Wong, S., Fournier, M., Coderre, D., Banska, W., Krystyniak, K., 1992. Environmental Immunotoxicology. In: Peakall, D. (Ed.) *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*, Chapman and Hall, London, pp. 167-189

Wootton, E.C., Dyrinda, E.A., Pipe, R.K., Ratcliffe, N.A., 2003. Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. *Aquat. Toxicol.* 65, 13-25.

## **ANNEXES**



**ANNEXE 1 :**  
**Protocole de phagocytose en microplaques**

## PROTOCOLE DE PHAGOCYTOSE EN MICROPLAQUE POUR 200 $\mu$ L D'HEMOLYMPHE ET UN RATIO 30 BILLES POUR 1 HEMOCYTE

### Préparation du réactif pour la phagocytose

Fixateur : pour 50 mL

- 50 mL de FACS flow
- 100 mg de sodium azide (pour avoir 0,2%)
- 0,250 mL de formaldéhyde (pour avoir 0,5%)

**Se conserve bien à 4°C. Valable 1 mois.**

### Prélèvement :

Au moment du prélèvement, mettre chaque ponction d'hémolymphe de chaque individu dans un tube de FACS distinct. Garder les tubes avec les ponctions **sur glace**.

### Comptage cellulaire et viabilité :

Pour chaque ponction d'hémolymphe faire un comptage cellulaire et une évaluation de la viabilité avec le Guava.

- a) Réaliser une dilution au 1/10<sup>ème</sup>. Placer dans un eppendorf 20  $\mu$ L d'hémolymphe et 180  $\mu$ L de ViaCount Reagent.
- b) Placer le tube dans le Guava et réaliser un ajustement sur la taille des cellules et la viabilité. Penser à noter la dilution 10 lors des lectures.
- c) Lire la concentration cellulaire.

## PREPARATION DES ECHANTILLONS ET DES STANDARDS

Pour chaque individu, mettre **200  $\mu$ L d'hémolymphe** dans un puits de microplaque (faire un **duplicata**). Prendre en note l'identification et la position des échantillons placés en duplicata dans les différents puits de la microplaque.

**Soniquer les billes** fluorescentes à l'abris de la lumière durant 1 minute dans un bain à sonication.

Mettre un ratio de **30 billes pour un hémocyte** pour chaque échantillon.

Pour respecter ce ratio de 30, il faut 11,12  $\mu$ L de billes (diluées au 1/15<sup>ème</sup>) de 1,716  $\mu$ m de diamètre pour 200 000 cellules. En effet les volumes nécessaires de billes pour conserver le ratio [30 billes/1 hémocyte] sont trop faibles, il est donc nécessaire de diluer un petit volume de billes fluorescentes avec de l'eau de mer artificielle.

**Centrifuger la microplaque à 1550 rpm** pendant 5 minutes pour augmenter le contact entre les hémocytes et les billes (équilibrer la centrifugeuse avant de faire la centrifugation).

Recouvrir la microplaque de **parafilm et mettre à l'obscurité** dans un film de papier aluminium. Le tout est déposé dans le 1<sup>er</sup> tiroir dans la salle du cytomètre.

Laisser incuber les billes et les hémocytes **18 heures à température de la pièce.**

**Préparer un volume suffisant de fixateur avant la fin des 18 heures d'incubation.**

Numéroter des tubes de FACSCAN correspondant à chaque puits contenant chaque échantillon incubé avec les billes pour pouvoir passer les hémocytes sur le fixateur après les 18 h d'incubation.

Après les 18 h d'incubation **vider la microplaque par renversement.** Les hémocytes et les billes adhèrent au fond des puits.

Remettre en suspension les cellules contenant les billes phagocytées (le culot) avec **200 µL de fixateur. Conserver à 4°C avec un parafilm dessus à l'abri de la lumière** jusqu'au moment de la lecture au cytomètre. La lecture de la fluorescence doit se faire préférentiellement tout de suite, cependant elle peut être faite dans les 96 heures qui suivent la fixation des cellules mais il est préférable de le faire le plus tôt possible et de respecter un même temps d'attente d'une expérience à l'autre pour pouvoir comparer les résultats.

#### **PREPARATION DU FIXATEUR : pour 50 mL**

- 50 mL de FACS flow
- 100 mg de sodium azide (pour avoir 0,2 %)
- 0,250 mL de formaldéhyde (pour avoir 0,5 %)

**se conserve bien à 4°C**

**Valable 1 mois**

**ANNEXE 2 :**  
**Protocole de dosage des protéines**

## DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE BRADFORD EN MICROPLAQUES

### Objectifs :

Dosage colorimétrique des protéines pour des concentrations de la courbe standard comprises entre  $1\mu\text{g/mL}$  et  $100\mu\text{g/mL}$ .

### Préparation des réactifs :

Solution mère d'albumine à  $1\text{ (mg/mL)}$

Peser  $100\text{ mg}$  d'albumine et dissoudre dans environ  $80\text{ mL}$  d'eau bidistillée dans une fiole jaugée de  $100\text{ mL}$  et conserver au réfrigérateur. Le lendemain, compléter la solution à  $100\text{ mL}$ .

Préparer et congeler à  $-20^\circ\text{C}$  en aliquot dans des tubes en eppendorfs.

### Solutions :

- Solution mère de BSA  $1\text{ (mg/mL)}$  ( $=1000\mu\text{g/mL}$ )
- H<sub>2</sub>O milli-Q
- Réactif Bio-Rad pour dosage des protéines #cat :500-0006
- Réactif de Bradford dilué : 1 vol. de réactif Bio-Rad + 4 vol. d'eau milli-Q (ne pas faire trop longtemps d'avance)

## PREPARATION DES STANDARDS ET DES ECHANTILLONS

### Préparation d'une solution fille :

Dans un tube de verre propre de  $5.0\text{ mL}$ , mettre  $1600\ \mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O et ajouter  $400\ \mu\text{L}$  de la solution mère de  $1000\ \mu\text{g/mL}$ . Agiter ensuite par vortex.

**(Faire juste avant pour préparation des différents standards)**

### Standards

# tube	Concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volume de la solution fille ( $\mu\text{L}$ )	Volume d'eau milli-Q ( $\mu\text{L}$ )
1	0	0	500
2	20	50	450
3	40	100	400
4	60	150	350
5	80	200	300
6	100	250	250

### Echantillon

Les concentrations en protéine des homogénats lors du dosage doivent entrer dans la gamme. Afin de déterminer la fenêtre de dilutions à faire, il est possible de procéder par essais successifs.

Exemple :

<b>Dilution</b>	<b>Volume de la dilution précédente</b>	<b>Volume d'eau milli-Q (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
<b>30</b>	10 $\mu\text{L}$ d'échantillon	290
<b>50</b>	10 $\mu\text{L}$ d'échantillon	490
<b>70</b>	10 $\mu\text{L}$ d'échantillon	690
<b>100</b>	10 $\mu\text{L}$ d'échantillon	990

#### **Disposition sur la microplaque**

- Mettre 50  $\mu\text{L}$  du blanc (eau milli-Q), des standards (0 à 100 ng/mL de BSA), des échantillons et/ou de leurs dilutions respectives.
- Ajouter 250  $\mu\text{L}$  de réactif de bradford **dilué** (1:4).
- Attendre 5 minutes.
- Lire à 595 n.

**ANNEXE 3 :**  
**Protocole de dosage des lysosymes**

## PROTOCOLE DE DOSAGE DES LYSOSYMES

D'après Cheng and Rodrick, 1974 et Rodrick, 1979

### Préparation du tampon :

- Tampon Glycylglycine à 0,1 M (13,2 mg/mL) et pH 5,5
- Ajustement du pH avec NaOH et HCl à 1 M.

### Solution :

- Solution de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma 3770) à 0,2 mg/mL dans du tampon glycylglycine à 0,1 M et pH 5,5.

Préparer 1h à 1h30 avant les dosages pour que *Micrococcus* se réhydrate bien par l'action du mélangeur mécanique. La turbidité doit représenter environ 0,45 unité d'absorbance à  $\lambda=450$  nm à T0.

- Solution mère de lysosymes (Sigma L-6876) à 1 mg/mL dans de l'eau nanopure.

## PREPARATION DES STANDARDS ET DES ECHANTILLONS

### Préparation d'une solution fille :

Dans un tube propre de 5,0 mL, mettre 1800  $\mu$ L de nanopure et ajouter 200  $\mu$ L de la solution mère de 1 mg/mL. La solution fille est ainsi de 100  $\mu$ g/mL/  
(Faire juste avant pour préparation des différents standards)

### Standards

# tube	Concentration ( $\mu$ g/mL)	Volume de la solution fille ( $\mu$ L)	Volume d'eau nanopure ( $\mu$ L)
1	0	0	1000
2	5	50	950
3	10	100	900
4	15	150	850
5	20	200	800
6	25	250	750

### Echantillon

Centrifuger 15 minutes à 4000g et à 4°C pour éliminer les débris. Garder les échantillons sur glace jusqu'à leur utilisation.

### Dosage :

En duplicata.

- Mettre 20 $\mu$ L des standards (0 à 25 $\mu$ g/mL de lysosymes), des échantillons (supernageant).
- Ajouter 180  $\mu$ L de solution de *Micrococcus lysodeikticus*.



**Lecture :**

Faire une lecture à 450 nm toutes les minutes durant 5 minutes en agitant les plaques pour que *Micrococcus* reste bien en suspension.

**ANNEXE 4 :**  
**Protocole de dosage du glycogène**

## ANALYSE DU GLYCOGENE

### Préparation des solutions

#### **Solution 1 : Solution mère standard de glycogène de l'huître** (glycogène de type II de l'huître)

Faire une solution 0.3% dans un tampon citrate 0.1M pH 5.0

- peser 300 mg et placer dans un ballon volumétrique de 100 mL
  - compléter à 100 mL avec le tampon citrate
  - bien mélanger et laisser dissoudre environ 1 heure.
- (Solution stable 2 semaines à 4°C)

#### **Solution 2 : Amyloglucosidase (8400 U/g)**

##### **\* Préparer la journée même\***

Pour préparer une solution finale à 0.42 Unités par 10 $\mu$ L :

- peser 50 mg d'amyloglucosidase et dissoudre dans environ 10mL de tampon citrate 0.1 M pH 5.0

#### **Solution 3 : Glucose – Oxydase – Peroxydase (GOP)**

##### **\* Mettre des gants et PRECAUTIONS car c'est de l'acide fort\***

- **Pour préparer le Tampon TRIS Trizma base 0.5 M pH 7.0**

- HCl 5N : prendre 38,46 mL de HCl 36% et compléter à 100 mL d'eau distillée
- Peser 61 g de TRIS et ajouter 85 mL de HCl 5N (dans un bêcher)
- Ajouter la solution de TRIS dissous à 800 mL d'eau distillée dans un ballon de 1 L
- Compléter à 1 L avec de l'eau distillée
- Ajuster le pH à 7.0 avec le HCl 5N (on place temporairement la solution dans bêcher de 1 L)

- **Solution de dianisine**

- Peser 60 mg de O-Dianisine di-HCl
- Ajouter à 25 mL d'eau
- Mélanger doucement 10 à 15 minutes

- **Préparation de la solution finale de GOP**

A 875 mL de TRIS (solution A) ajouter :

- 36 mg de peroxydase Type 1
- 228 mg de glucose oxydase Type 2
- La solution de O-Dianisine (solution B dissoute)
- Bien mélanger sous agitation magnétique
- Transvider dans des bouteilles de 100 mL remplies au  $\frac{3}{4}$
- Décongeler le GOP la veille du dosage et filtrer le lendemain sur filtre GF/C avant l'emploi

**\*Conserver la solution une seule journée au frigo après la décongélation\***

## PROCEDURE

### Préparation de la courbe standard

- préparer directement dans les tubes eppendorfs de 1.5 mL

Solution mère de glycogène à 0.3%	Tampon citrate	Concentration finale en Glycogène
0	400 µL	0
50 µL	350 µL	150 µg
100 µL	300 µL	300 µg
200 µL	200 µL	600 µg
300 µL	100 µL	900 µg
400 µL	0	1200 µg

- Incuber les 400 µL de la courbe standard, de même que 400 µL d'échantillons avec 10 µL d'amyloglucosidase (0.42 U/10µL) toute la nuit (minimum 16h et maximum 24h) à la température de la pièce et ayant bien vortexé les tubes. Garder le reste des homogénats non incubé et les garder au frigo à 4°C.

### Le lendemain

- Centrifuger chaque tube eppendorf 10 min dans la centrifugeuse à 12000g et garder le surnageant.

### Faire le dosage du glucose sur :

- La courbe standard (avec l'amyloglucosidase) (**Triplicata**)
- L'homogénat non incubé (**Duplicata**)
- L'homogénat incubé (avec l'amyloglucosidase) (**Duplicata**)

Dans un tube de 5 mL mettre :

- 200 µL de tampon citrate
- 20 µL d'homogénat non incubé, incubé ou standard (agiter très doucement)
- 1.6 mL de GOD POD pré-filtrée

Après 40 minutes, ajouter 60 µL de HCl 5N. Agiter au vortex.

Transférer dans des microplaques non traitées. Lire à une longueur d'onde de 420 nm (ou 414). Faire le blanc avec le zéro de la courbe standard, bien vérifier que le blanc est à 0.

La coloration est stable pour 1 heure.

**ANNEXE 5 :**  
**Protocole de dosage des lipides**

## MESURE DES LIPIDES TOTAUX

### Préparation des réactifs

**La solution mère d'étalon de concentration finale 1 mg/mL (peut être conservée durant 1 mois à une température de 4°C)**

- peser 100 mg d'huile olive normale et placer dans un ballon de 100 mL
- compléter à 100 mL avec le mélange Chloroforme : Méthanol (2 : 1)

**Phosphovanilline 13 mM (peut être conservée durant 1 mois dans un contenant opaque à température de la pièce mais il est préférable de la préparer à chaque jour)**

- Peser 0.24 g de Vanilline
- Ajouter 40 mL de Nanopure
- Compléter à 200 mL avec de l'acide orthophosphorique 85%

### PROCEDURE

#### Préparation de la courbe standard

Concentration finale	Solution mère	Chloroforme : méthanol (2 :1)
Blanc	0	1000 $\mu$ L
0.02 mg/mL	20 $\mu$ L	980 $\mu$ L
0.03 mg/mL	30 $\mu$ L	970 $\mu$ L
0.04 mg/mL	40 $\mu$ L	960 $\mu$ L
0.05 mg/mL	50 $\mu$ L	950 $\mu$ L
0.06 mg/mL	60 $\mu$ L	940 $\mu$ L
0.07 mg/mL	70 $\mu$ L	930 $\mu$ L
0.08 mg/mL	80 $\mu$ L	920 $\mu$ L

A 100  $\mu$ L de l'homogénat ou à la solution étalon d'huile d'olive ou au « blanc » (Chloroforme : méthanol) dans une éprouvette en borosilicate :

- Ajouter 400  $\mu$ L d'acide sulfurique 18M
- Chauffer durant exactement 10 min. dans un bain d'eau bouillante à 100°C ou dans un bloc chauffant
- Refroidir durant 5 min. dans un bain d'eau à la température de la pièce
- Ajouter 1 mL du réactif Phosphovanilline à chacune des éprouvettes et bien mélanger.
- Incuber à 37°C durant 15 min.
- Refroidir durant 10 min. dans un bain d'eau chaude à la température de la pièce.
- Ajouter 200  $\mu$ L de cette solution dans les microscopes.
- Lire la densité optique à 520 nm.

**ANNEXE 6 :**

**Protocole de dosage de la malondialdéhyde**

## **DOSAGE DE LA MDA (Malondialdehyde) avec « Bioxytech® MDA-586 Assay Kit »**

### **Préparation du tampon PBS (Tampon Phosphate Salin) (20 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 140 mM de NaCl ; pH=7.2-7.4)**

Solution A : 6.95 g de sodium phosphate monobasique monohydrate dans une fiole de 250 mL d'eau nanopure

Solution B : 53.65 g de sodium phosphate dibasique monohydrate dans une fiole de 1 L d'eau nanopure

Sous le pHmètre : mettre dans un bêcher les 250 mL de solution A et ajouter de la solution B jusqu'à ce que le pH soit égale à 7.2-7.4.

Dilué la solution de tampon phosphate 0.2M par 10 pour obtenir du tampon 0.02M.

Dans 1 L de tampon phosphate 0.02M, pH 7.2-7.4 ajouter 8.18 g de NaCl pour obtenir du PBS.

**Solution A** : NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O : sodium phosphate monobasique monohydrate

**Solution B** : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O : sodium phosphate dibasique monohydrate

NaCl : Chlorure de sodium

**\*Séparer le tampon en 2 volumes identiques (500 mL pour CAT et 500 mL pour MDA)\***

### **Tampon MDA**

- mélanger 1 mL de BHT (0.5M) avec 0.6 mL de probucol à 500 mL de tampon PBS

**\*Ne mélanger que la bonne quantité de BHT et de Probucol à utiliser\***

### **Préparation des tissus cibles**

- **dissection** : récupérer les organes cibles (glandes digestives), les laver et/ou perfuser avec du PBS froid
- **homogénéisation** : sur glace dans un tampon MDA
- **congélation** à -80°C si nécessaire
- dégeler les échantillons à T° pièce, idéalement sur de la glace

*Rapport-gratuit.com*  
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES 

## **PROCEDURE**

### **Préparation du réactif R1 (pour 36 analyses incluant les standards, les duplicatas)**

- ajouter 1.2 mL de méthanol 100% à 3.6 mL de R1 (stable 2 jours à 4°C)

*Pour 100 analyses (1 plaque) les volumes seront de 3.6 mL méthanol dans 10.8 mL de R1*

### **Préparation du TMOP (MDA) standard (10 mM)**

- Solution mère : dilution (1/10)

Diluer 20 µL de MDA (10mM) dans 180 µL d'eau miliQ.

- Solution fille (3284 x 10<sup>-3</sup> mg/L)

Diluer 30 µL de la solution mère de MDA dans 1470 µL d'eau miliQ (1/50).



**Courbe standard**

Volume de 20µM std, µL	Volume d'eau ou tampon, µL	Concentration µM dans les tubes	Concentration finale µM dans les puits (dilution /3)
0	400	0	0
25	375	1.25	0.416
50	350	2.5	0.833
75	325	3.75	1.25
100	300	5	1.66
150	250	7.5	2.5
200	200	10	3.33
300	100	15	5
400	0	20	6.66

- ajouter 80 µL de l'échantillon ou standard dans leur microtube respectif
- ajouter 130 µL de R1 dans chaque microtube
- agiter légèrement chaque microtube avec un vortex
- ajouter 30 µL de R2 dans chaque microtube
- fermer chaque microtube et bien mélanger en agitant avec un vortex
- incuber à 45°C pendant 60 minutes les microtubes
- centrifuger les microtubes de 500 µL contenant les échantillons et les standards à 12000rpm pendant 10 min.
- transférer le surnageant des échantillons et des standards dans les puits de la microplaque :
  - a. Transférer 180 µL du surnageant dans leur puit respectif
  - b. Attention au précipité, ne pas toucher le précipité avec l'embout
  - c. Prélèvement « one shot » sans équilibrer l'embout
- mesurer l'absorbance à 590 nm.

Du probucol peut précipiter mais ça ne causera pas de problème.

Tout précipité formé est enlevé à l'étape 7. La couleur est stable pour au moins 2 heures à la température de la pièce.

**ANNEXE 7 :**  
**Protocole de dosage de la catalase**

## **DOSAGE DE LA CATALASE avec « Amplex® Red Catalase Assay Kit »**

### **Préparation des tissus cibles**

- **dissection** : récupérer les organes cibles (glandes digestives)
- **homogénéisation** : sur glace dans un tampon PBS
- **récupération** du supernageant
- **congélation** à -80°C si nécessaire
- dégeler les échantillons à T° pièce, idéalement sur de la glace

### **PROCEDURE**

#### **Solution mère 1 SM-1 (10 mM)**

- 0,26 mg de composé A + 100 µL de DMSO (composé B)

Protéger de la lumière et placer à -20°C.

#### **Solution mère 2 SM-2 (Tampon 1X)**

- 4 mL de composé E + 16 mL de H<sub>2</sub>O milliQ

Placer à -20°C

#### **Solution mère 3 SM-3 (HRP 100U/mL)**

- composé C (HRP) + 200 µL de tampon 1X (solution mère 2)

Placer à -20°C (Aliquots)

#### **Solution mère 4 SM-4 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20mM)**

- 23 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (composé D) + 977 µL de H<sub>2</sub>O milliQ

Utiliser le plus tôt possible

#### **Solution mère 5 SM-5 (Cat 1000U/mL)**

- composé F + 100 µL de H<sub>2</sub>O

Placer à -20°C (Aliquots)

#### **Solution fille 1 SF-1 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 µM)**

- 10 µL de SM-4 + 4.99 mL de Tampon 1X

#### **Solution fille 2 SF-2 (CAT=10 U/mL)**

- 10 µL de SM-5 dans 1 mL H<sub>2</sub>O milliQ

Placer à -20°C (Aliquots)

**Courbe standard**

<b>Solution</b>	<b>Volume de la solution de catalase</b>	<b>Volume de la solution de TAMPON 1X</b>	<b>Concentration finale de la catalase dans les puits</b>
Sol A	400 µL de SF-2 (10 U/mL)	600 µL	1000 mU/mL x 4 = 4 U/mL
Sol B	500 µL de sol A	500 µL	500 mU/mL x 4 = 2 U/mL
Sol C	500 µL de sol B	500 µL	250 mU/mL x 4 = 1 U/mL
Sol D	500 µL de sol C	500 µL	125 mU/mL x 4 = 0.5 U/mL
Sol E	500 µL de sol D	500 µL	62.5 mU/mL x 4 = 0.25 U/mL
0	0 µL	1000 µL	0 mU/mL x 4 = 0 U/mL

**Phase 1**

- mettre dans chaque puit de la microplaque :  
25 µL de CAT (courbe standard) ou 25 µL des échantillons  
+ 25 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 µM
- incuber 30 min. à T° pièce (recouvrir de PARAFILM)

**Solution travail**

- 50 µL de Amplex (SM-1) + 20 µL DE HRP (SM-3) dans 4.93 mL de tampon 1X

**Phase 2**

- 50 µL de solution travail Amplex/HRP dans chaque puit de la microplaque
- incuber 30 min. à 37°C protégé de la lumière (mettre un papier aluminium sur la plaque)
- mesurer sur un lecteur de microplaque en utilisant une absorbance à 560 nm (540 nm) à différents intervalles de temps, ex. t=0, t=120 sec.
- reporter le changement de la fluorescence ou de l'absorbance en soustrayant la valeur de l'échantillon du contrôle ne contenant pas de catalase