

# Développement de réponses du métabolisme digestif et de génotoxicité chez la dreissène: validation en laboratoire par des contaminants modèles

Françoise Vincent-Hubert<sup>1\*</sup>, Frédéric Palais<sup>2</sup>, Adeline Arini<sup>1</sup>, Sylvie Biagianti-Risbourg<sup>2</sup>, Odile Dedourge-Geffard<sup>2</sup>, Guillaume Jubeaux<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Cemagref, UR Hydrosystèmes et Bioprocédés, Parc de Tourvoie, Antony

<sup>2</sup> Université de Reims Champagne Ardenne, Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne-Stress Environnement EA 2069, Laboratoire d'Eco-Toxicologie

\* personne à contacter [francoise.vincent-hubert@cemagref.fr](mailto:francoise.vincent-hubert@cemagref.fr)

1. INTRODUCTION.....	1
2. MATERIELS ET METHODES .....	2
2.1. Exposition des dreissènes à deux contaminants modèles en laboratoire.....	2
2.2. Mesure des cassures de l'ADN par le test comète alcalin.....	3
2.2.1 Développement de la méthode d'isolement des cellules.....	3
2.2.2 Optimisation du protocole du test comète .....	3
2.3. Mesure d'anomalies chromosomiques .....	3
2.4. Mesure des activités d'enzymes digestives.....	4
3. RESULTATS et DISCUSSION .....	5
3.1. Bioaccumulation du cadmium.....	5
3.2. Induction de cassures de l'ADN .....	5
3.3. Anomalies chromosomiques .....	7
3.4. Activités des enzymes digestives .....	8
4. CONCLUSION .....	9
5. REFEEENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	10

## 1. INTRODUCTION

La présence croissante des contaminants chimiques dans les eaux de surface rend nécessaire le développement de tests sensibles et fiables pour évaluer l'impact des micropolluants persistants sur les organismes aquatiques. En France, les données disponibles sur l'impact du milieu urbain sur les espèces aquatiques sont peu nombreuses. La réponse des organismes à la pression chimique du milieu peut être mesurée à l'aide de biomarqueurs non spécifiques sur des espèces sentinelles ou sur des organismes transplantés; ces derniers sont utilisés là où des espèces autochtones sont rares; c'est le cas de la dreissène sur les sites urbains du bassin de la Seine. La moule zébrée est une espèce invasive résidant dans les eaux douces d'Europe et d'Amérique du Nord qui présente toutes les caractéristiques des organismes sentinelles. Elle est utilisée en biomonitoring dans la partie amont de l'estuaire de la Seine (Minier et al., 2006).

La génotoxicité est une atteinte du matériel génétique par un agent chimique ou physique. Les conséquences de cette atteinte peuvent se traduire par des processus pathologiques (mutations, cancers) ou par le déclin de l'espèce si la génotoxicité s'exerce pendant le développement embryonnaire ou sur les cellules germinales. La génotoxicité a donc une pertinence écologique pour évaluer la vulnérabilité d'une espèce. La génotoxicité est largement utilisé pour mesurer l'impact de la

contamination du milieu, sur des espèces sentinelles en milieu marin (Parry et al., 1976) et en eau douce (Prein et al., 1978; Alink et al., 1980). La sensibilité aux agents génotoxiques a été montrée à plusieurs reprises chez la dreissène (Mersch & Beauvais, 1997; Le Goff et al., 2006). En lien avec ces travaux sur les hémocytes de dreissène, nous avons opté pour la recherche de cassures de brins d'ADN et d'anomalies chromosomiques sur les cellules de branchie, en utilisant le test comète et le test micronoyaux. La branchie est la première barrière impliquée dans la filtration des micro-polluants, elle est capable de métaboliser les molécules promutagènes en molécules réactives. Ce travail a pour objectif de développer ces tests sur les cellules de branchie de dreissène, qui constitue un modèle cellulaire intéressant en écotoxicologie, et de mesurer les effets de contaminants génotoxiques modèles.

Le métabolisme digestif constitue un processus clé dans le sens où il conditionne l'approvisionnement de l'organisme en énergie, énergie qui est consommée pour le maintien de l'organisme, sa croissance et sa reproduction. Une perturbation du métabolisme digestif peut affecter directement l'assimilation des nutriments et donc indirectement la quantité et/ou la qualité de l'énergie indispensable à la réalisation des autres grandes fonctions biologiques (Dedourge et al., 2008). Différentes études ont mis en évidence une inhibition des activités d'enzymes digestives lors d'expositions d'organismes aquatiques à des contaminants organiques (De Coen et Janssen, 1998 ; Golovanova et al, 1999 ; Simon et al, 1999) ou métalliques (Yan et al, 1996 ; Kuz'mina et al, 2002). En lien avec le régime alimentaire de *Dreissena polymorpha* (phytoplancton) le choix des enzymes étudiées s'est porté sur des glucanases. Les enzymes retenues sont, l'amylase (EC 3.2.1.1) et parmi les cellulases, l'endoglucanase (EC 3.2.1.4). N'ayant aucune donnée sur notre espèce cible, *Dreissena polymorpha*, il a tout d'abord été défini les conditions (température, pH...) permettant d'observer une activité maximale des enzymes digestives (Palais et al., 2008). Suite à cette caractérisation, l'objectif de cette nouvelle étude était de préciser l'influence de contaminants modèles sur l'activité de ces enzymes.

Une première validation terrain de ces marqueurs dans le bassin de l'Orge est présentée dans le rapport conjoint 2c-2008.

## **2. MATERIELS ET METHODES**

### **2.1. Exposition des dreissènes à deux contaminants modèles en laboratoire**

Les moules ont été prélevées en mars 2008, dans le canal de l'Est, Branche Nord, (Commercy, Meuse). Le canal de l'Est a été choisi comme site propre pour le prélèvement des moules. Les moules ont été maintenues au laboratoire pendant une semaine avant le début de l'expérience. Environ 350 moules zébrées de 22 mm à 25 mm ont été calibrées et réparties dans différents bacs en plastique, à raison de 10 moules pour 8 litres d'eau de source.

Les moules ont été exposées pendant 11 jours à deux contaminants génotoxiques de référence, le cadmium et le benzo(a)pyrène et au mélange des deux. Les concentrations utilisés ont été choisies en fonction de la littérature, il s'agit de concentrations génotoxiques faibles, soit: cadmium, 10µg/L; benzo(a)pyrène, 10µg/L. Pour le mélange, les concentrations sont: cadmium, 10µg/L et benzo(a)pyrène, 1µg/L. Deux solutions mères ont été préparées, une solution de cadmium, sous forme CdCl<sub>2</sub> dissout dans l'eau ultra pure, et une solution de benzo(a)pyrène, dissout dans du diméthylsulfoxyde à 99% (DMSO).

Les bacs ont été préalablement équilibrés, pendant 24 heures avec les milieux d'exposition correspondant aux différents contaminants, afin de limiter les effets d'adsorption des métaux et des HAP sur les parois des bacs. Les bacs témoins ont été remplis uniquement avec l'eau de source. L'eau des différents bacs a été changée tous les deux jours et à nouveau contaminée afin de maintenir une concentration en contaminants quasi constante durant toute l'exposition. Des prélèvements d'eau ont été effectués dans les bacs témoins et les bacs contaminés afin de déterminer la concentration nominale en cadmium.

## **2.2. Mesure des cassures de l'ADN par le test comète alcalin**

### **2.2.1 Développement de la méthode d'isolement des cellules**

Le protocole de dissociation mécanique est utilisé classiquement pour isoler les cellules de branchies de moules. Pour la dreissène ce protocole a généré une mortalité de l'ordre de 30%. Un protocole de dissociation enzymatique a été développé, trois enzymes ont été comparées, la dispase, la collagénase et un mélange des deux enzymes. De même plusieurs tampons ont été testés, avec ou sans piègeurs de radicaux libres et inhibiteurs enzymatiques (DMSO, N-t-butyl- $\alpha$ -phenylnitronne, EDTA); le PBS dilué au 1/3 a permis d'obtenir une viabilité cellulaire supérieure à 90%.

Les branchies de moules ont été prélevées délicatement à l'aide de pinces fines, rincées dans le PBS 3,3 mM, pH 7,4 et coupées aux scalpels en deux ou trois morceaux, afin d'augmenter la surface d'échange avec l'enzyme de digestion cellulaire. Les tissus ont été incubés en présence de l'enzyme à 37°C sous agitation à l'obscurité pendant 20 minutes. La suspension cellulaire a été conservée à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à l'inclusion dans l'agarose.

L'hémolymphe est prélevé dans le muscle adducteur postérieur à l'aide d'une aiguille hypodermique (26G). Contrairement aux cellules de branchies, l'hémolymphe des trois moules a été poolé afin d'augmenter la concentration cellulaire.

La viabilité cellulaire a été évaluée par un test d'exclusion au Bleu Trypan.

### **2.2.2 Optimisation du protocole du test comète**

Le protocole pour le test comète alcalin décrit par (Singh *et al.* 1988) a été adapté aux cellules de dreissène. Les étapes qui suivent ont été modifiées: lyse cellulaire pendant la nuit, dénaturation: 5 min, électrophorèse: 10 min. Les lames ont été déshydratées pour améliorer la lecture au microscope. Les lames ont été colorées au DAPI (0,25  $\mu$ g/ml). Elles ont été observées au Microscope optique à fluorescence, Objectif X40, et analysées en analyse d'image (caméra CCD couplée au logiciel Komet 5, Andor technology). 100 cellules sont analysées par moule. Parmi les paramètres calculés par le logiciel d'analyse d'image, cinq sont systématiquement comparés pour définir les paramètres adaptés à chaque protocole d'étude.

Trois moules par traitement (témoin, cadmium, benzo(a)pyrène et cadmium + benzo(a)pyrène), ont été utilisées pour réaliser les tests de génotoxicité, après des temps d'exposition de 0, 10 et 24 heures puis 3, 5, et 11 jours. Les branchies des trois premières moules ont été disséquées afin de préparer 3 suspensions cellulaires, comme décrit auparavant, et réaliser un test de génotoxicité permettant de mettre en évidence les variations inter-individuelles.

## **2.3. Mesure d'anomalies chromosomiques**

Le développement méthodologique du test micronoyaux a été réalisé sur les cellules de l'hémolymphe et des branchies, en se basant sur différents protocoles publiés dans la littérature pour les bivalves (Bolognesi *et al.*, 1999; Mersh & Beauvais, 1996). La difficulté à laquelle on s'est heurté est la conservation du cytoplasme intact après étalement sur lame. Le protocole que nous avons retenu utilise la fixation des cellules au Carnoy (méthanol/acide acétique, 1:1) et un marquage des noyaux au DAPI, fluorochrome plus spécifique que le Giemsa. La lecture des lames au microscope à fluorescence est réalisée 48h après coloration. Le noyau est observé en fluorescence et le cytoplasme est visualisé en lumière visible avec filtre vert en contraste de phase (objectif X100). 1000 cellules/moule ayant un cytoplasme intact ont été observées au microscope afin de déterminer la fréquence des micronoyaux, de cellules binucléées et de bourgeonnements nucléaires.

Les critères de sélection des anomalies chromosomiques que nous avons utilisés ici sont ceux définis par (Fenech *et al.* 2003). Des observations des noyaux de cellules de branchies et de cellules de l'hémolymphe ont été réalisées sur des moules zébrées maintenues au laboratoire. Différents types d'anomalies chromosomiques, détaillées ci-dessous, ont été observées.

L'analyse d'anomalies chromosomiques des moules exposées aux contaminants chimiques a été effectuée dans les hémocytes et les branchies de 3 moules. L'isolement des cellules est décrit dans la partie Matériels et Méthodes 2.2.1.

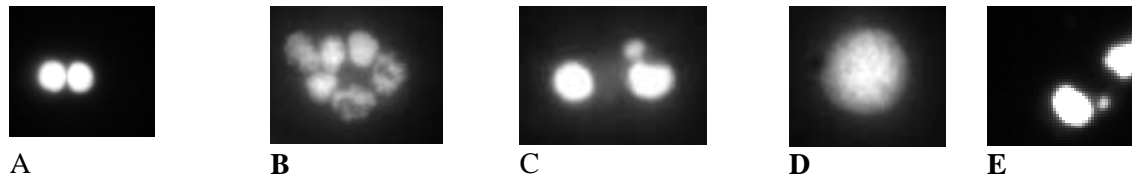


Figure 1: Anomalies nucléaire observées dans les cellules de branchies de dreissènes (X100) A: cellule binucléée; B: noyau en apoptose, stade tardif, on distingue une fragmentation nucléaire en plusieurs petits corps nucléaires; C: cellule tri-nucléés ayant un noyau de taille plus petite; D: cellule en nécrose tardive, noyau en état de dégénérescence; E: cellule ayant un micronoyau type.

## 2.4. Mesure des activités d'enzymes digestives

Dissection :

Après chaque temps d'exposition les 15 dreissènes de chaque condition sont disséquées. La glande digestive et le stylet cristallin sont directement congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C.

Préparation des extraits enzymatiques :

Après décongélation, les glandes digestives et les stylets cristallins sont regroupés en pools de cinq et broyés dans un potter en verre. Les tissus sont homogénéisés à froid (dans la glace) dans un tampon phosphate (0.01M, pH 6.5) selon un rapport de 0.2 ml de tampon par mg de stylet cristallin et 0.025 ml de tampon par mg de glande digestive. Les homogénats sont ensuite centrifugés à 15 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Les surnageants obtenus, correspondant aux extraits enzymatiques, sont utilisés pour la détermination des activités des enzymes digestives. Ces extraits sont conservés à -80°C jusqu'aux analyses.

Mesure des activités enzymatiques :

La méthode de dosage retenue pour la mesure des activités de l'amylase et de l'endoglucanase est la méthode colorimétrique de Bernfeld (1955), basée sur la quantification des sucres réducteurs (e.g. maltose) obtenus après action des enzymes sur leur substrat (amidon pour l'amylase, carboxyméthylcellulose pour l'endoglucanase). Les conditions optimales d'incubation permettant une activité maximale sont respectivement pour le pH du milieu, la concentration en substrat, la température et le temps d'incubation de 7.2, 1%, 25°C et 30 min pour l'amylase et 5.2, 2%, 50°C et 60 min pour l'endoglucanase. Ces conditions sont les mêmes pour les deux tissus digestifs (Palais *et al.*, 2008).

### 3. RESULTATS et DISCUSSION

#### 3.1. Bioaccumulation du cadmium

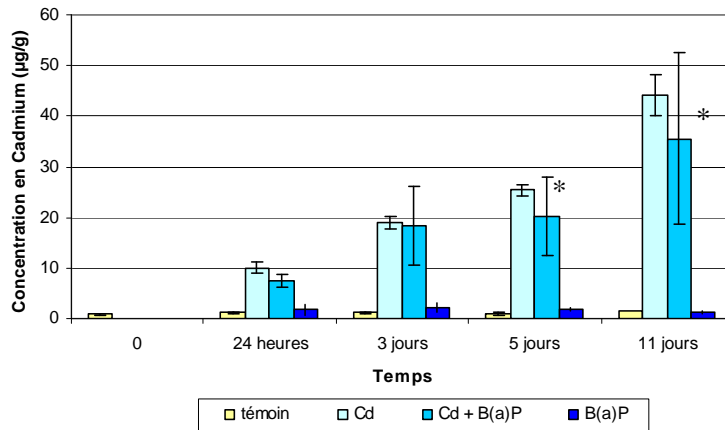


Figure 2: Concentrations en cadmium dans les dreissènes après exposition à différents contaminants z-test ( $p < 0,01$ .\*)

L'exposition en laboratoire des dreissènes au Cd et au mélange Cd+BaP entraîne une augmentation du Cd dans les tissus qui augmente avec le temps d'exposition. Après 5 jours d'exposition au mélange, la bioaccumulation du Cd tend à diminuer dans les tissus de dreissènes. La concentration en Cd dans les moules exposées au BaP est comparable au témoin.

#### 3.2. Induction de cassures de l'ADN

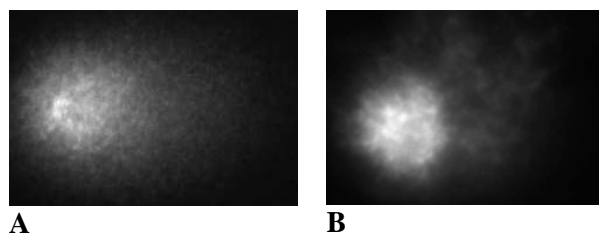


Figure 3: Photos de noyaux de cellules de branchie de moules exposées à différents contaminants pendant 10 h (X40) A: Cd (10 µg/l), B: BaP (10 µg/l). Dans les deux cas le test comète permet d'observer une fragmentation de l'ADN

Le test comète (ou single cell gel electrophoresis, gel d'électrophorèse de cellules isolées) est une méthode simple pour quantifier des cassures de brins survenant au niveau de l'ADN de cellules eucaryotes. Le test comète alcalin a été introduit par Singh *et al.* (1988). A ce pH, une augmentation de la migration de l'ADN est associée à une augmentation des cassures simple brin franches (SB), des cassures simple brin associés à une réparation incomplète de l'ADN et aux sites alcali sensibles (ALS). La plus part des agents génotoxiques induisent beaucoup plus de cassures SB et/ou des ALS que de cassures double brin; cette version du test comète à pH >13 offre une plus grande sensibilité pour identifier des agents génotoxiques.

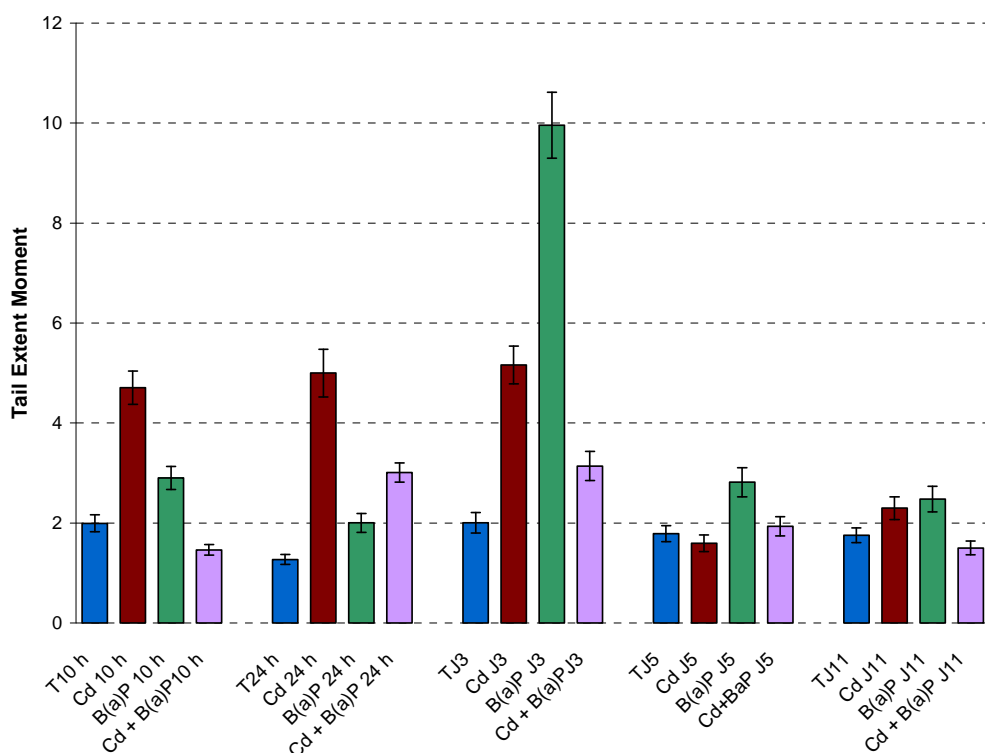


Figure 4: Indice de cassures de l'ADN exprimé par le Tail Extent Moment dans les cellules de branchies de dreissènes exposées pendant 11 jours au Cd, BaP, Cd+BaP. Les valeurs correspondent à la moyenne  $\pm$  erreur type relative.  $n=3$  moules, 300 cellules analysées par le test comète.

Les résultats concernant l'induction de cassures de l'ADN sont présentés sur la figure 4. Dans un premier temps, cinq paramètres relatifs au test comète ont été comparés, il s'agit de paramètres individuels de mesure de la queue, de la tête et de la comète. Les paramètres les plus informatifs sur les effets des contaminants étudiés sont les Tail Extent Moment, Olive Tail Moment et tail length. Nous présentons ici uniquement le Tail Extent Moment, qui est défini ainsi: Tail length – Tail%DNA/100 (Figure 4).

Le Cd induit très rapidement, dès 10 h, des dommages à l'ADN qui restent stables pendant 3 jours. Après 5 jours d'exposition, le Cd n'est plus génotoxique. Dans les cellules de l'hémolymph, les effets du Cd apparaissent plus tard et uniquement après 24 h d'exposition (résultats non présentés). Le BaP est faiblement génotoxique après 10 h d'exposition, mais c'est après 3 jours d'exposition qu'il est le plus génotoxique, de même dans les hémocytes (résultats non présentés). A J3, le BaP est deux fois plus génotoxique que le Cd. Le mélange Cd+BaP n'est pas génotoxique à 10 h; le mélange protège l'ADN de la génotoxicité du Cd. A 24 h et à J3, le mélange est génotoxique. Il est intéressant de souligner que le mélange diminue de 40 à 50% les effets génotoxique du Cd seul, comme si la présence de BaP dans le mélange protégeait l'ADN des effets génotoxiques du Cd. Il faut noter que la concentration en BaP testé dans le mélange est 10 fois moins concentrée que dans l'exposition BaP seul (1  $\mu\text{g/l}$  dans le mélange contre 10  $\mu\text{g/l}$ ).

L'exposition en laboratoire des dreissènes au Cd et au mélange Cd+BaP entraîne une accumulation du Cd dans les tissus de dreissènes qui augmente avec le temps. A partir du cinquième jour, le Cd n'est plus génotoxique, ce qui suggère une réparation plus efficace de l'ADN ou une détoxification plus efficace du Cd. Deux mécanismes semblent particulièrement impliqués dans la génotoxicité du Cd chez les vertébrés, ce sont la production de radicaux libres oxygénés et l'inhibition de la réparation de l'ADN, ce dernier mécanisme ne semble pas en cause d'après les résultats que nous

obtenons à J5. D'après nos résultats et ceux disponibles chez la moule marine (Bolognesi et al., 1999; Pruski & Dixon, 2002), il semblerait que la génotoxicité du cadmium chez la moule s'exerce sur des temps relativement court.

Ces observations confirment les travaux récents de Binelli *et al.* (2008) qui montrent un effet génotoxique du BaP chez la dreissène après 48h d'exposition. Ces résultats suggèrent que la dreissène est capable de métaboliser le BaP en métabolites réactifs, bien que l'induction des CYP-450 soit plus faible chez les bivalves que chez les vertébrés. La diminution de la génotoxicité du BaP entre J3 et J5 pourrait être expliquée par nos conditions expérimentales dans lesquelles le milieu d'exposition a été renouvelé tous les deux jours. La concentration en BaP biodisponible a pu très fortement diminuer au cours du temps, ce qui expliquerait cette diminution de la génotoxicité. Les concentrations en BaP dans l'eau n'ont pas été mesurées suite à des problèmes techniques.

### 3.3. Anomalies chromosomiques

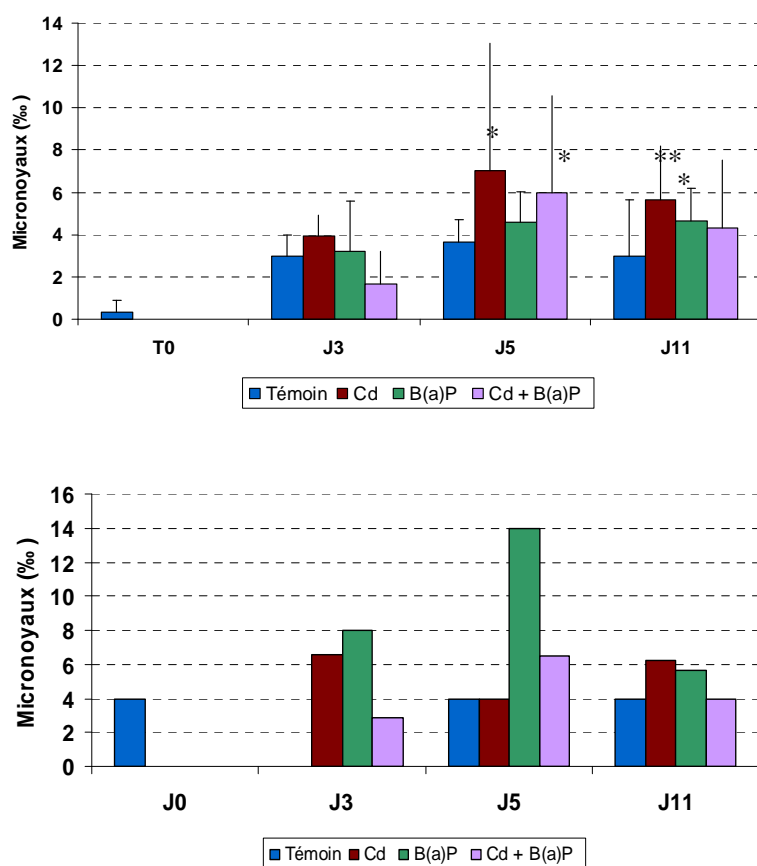


Figure 5: Taux de micronoyaux dans les branchies (A) et les hémocytes (B) de dreissènes exposées au Cd, BaP, et au mélange Cd+BaP pendant 3, 5 et 11 jours

ANOVA réalisée sur les moyennes des fréquences de MN. Comparaison entre les taux de micronoyaux dans les témoins et les dreissènes exposées. ( $P < 0,001$  : '\*\*',  $P < 0,01$  : '\*'.)

On observe sur la figure 5 une augmentation significative ( $P < 0,01$ ) du taux de micronoyaux à partir du cinquième jour d'exposition dans les cellules de branchies des dreissènes traitées au cadmium, de même pour le taux de cellules binucléées (résultats non présentés). Cet effet est plus tardif que la formation de cassures de l'ADN, révélées par le test comète. En effet, les premiers micronoyaux induits par la contamination n'apparaissent qu'après une division cellulaire. Les moules exposées au mélange Cd+BaP présente une augmentation du taux de MN à partir du cinquième jour

d'exposition, pour les cellules de branchies et d'hémolymphes. Le taux de MN augmente à J11 dans les branchies de moules exposés au BaP et à J5 dans les hémocytes.

### 3.4. Activités des enzymes digestives

Les activités enzymatiques de l'amylase et de l'endoglucanase mesurées au niveau de la glande digestive sont présentées dans la figure 6. Concernant l'amylase, les activités mesurées chez les organismes exposés au Cd ou BaP ne présentent pas de variation particulière. Chez les individus contrôles et exposés au mélange (Cd+BaP), une augmentation de l'activité est observée entre J1 et J5 puis une diminution à J11 pour revenir à un niveau similaire à celui de J1. Outre ces variations temporelles, il est à noter à J5 une activité significativement plus élevée chez les individus exposés au mélange par rapport aux contrôles. Concernant l'endoglucanase, des activités plus faibles à J3 sont observées pour les individus contrôles et exposés au Cd ou au mélange par rapport aux autres temps d'exposition. Par contre, pour chaque temps, aucune différence significative n'est observée en fonction des conditions (contrôles, Cd, BaP ou mélange).

Les mesures d'activité de ces deux enzymes au niveau du stylet cristallin n'indiquent aucune différence significative en fonction du temps et des conditions d'exposition (résultats non montrés). Cependant des activités spécifiques plus importantes sont mesurées au niveau du stylet cristallin par rapport à la glande digestive pour les deux enzymes (tableau 1).

Tableau 1: Activité moyenne (n = 15 pools) de l'amylase et de l'endoglucanase chez les individus contrôles de l'ensemble de l'étude (J0 à J11).

	<i>Glande digestive</i>	<i>Stylet cristallin</i>
Amylase	8.2 (1.6)	345 (36)
Endoglucanase	4.4 (0.7)	103 (20)

Contrairement aux observations réalisées chez différentes espèces (Yan et al., 1996 ; Sabapathy & Theo, 1992) aucune inhibition de l'activité de ces enzymes digestives n'est observée chez *Dreissena polymorpha* suite à l'exposition à du Cd et/ou BaP. Il est même observé une légère induction de l'activité de l'amylase au niveau de la glande digestive au bout de 5J d'exposition au mélange Cd+BaP. Il a couramment été observé une légère induction des activités des enzymes digestives pour les plus faibles niveaux de contamination avant d'observer une inhibition des activités pour des niveaux de contamination supérieurs (Chen & Mayer, 1998, Chen *et al.*, 2002). Nos résultats suggèrent donc une exposition trop courte (maximum 11J) vis-à-vis des concentrations testées (relativement faibles pour des expositions en conditions contrôlées à court terme) pour observer un effet biologique sur le métabolisme digestif. De plus aucune nourriture n'a été fournie durant l'exposition des individus ce qui suggère une exposition des organismes aux composés testés principalement par voie aqueuse et donc une bioaccumulation en particulier *via* les surfaces épithéliales (e.g. branchies) plutôt que *via* le tractus digestif.

Dans cette étude, des activités beaucoup plus élevées sont observées au niveau du stylet cristallin par rapport à la glande digestive, ce qui souligne son importance dans le processus de digestion. Des résultats tout à fait similaires ont été observés chez d'autres espèces de bivalves (Brock & Brock, 1989 ; Brock & Kennedy, 1992). Il est également intéressant de noter une faible variation des activités des enzymes digestives au cours des 11 jours de jeun alors que ce facteur peut engendrer chez certaines espèces (Labarta *et al.*, 2002) des variations importantes d'activités enzymatiques.



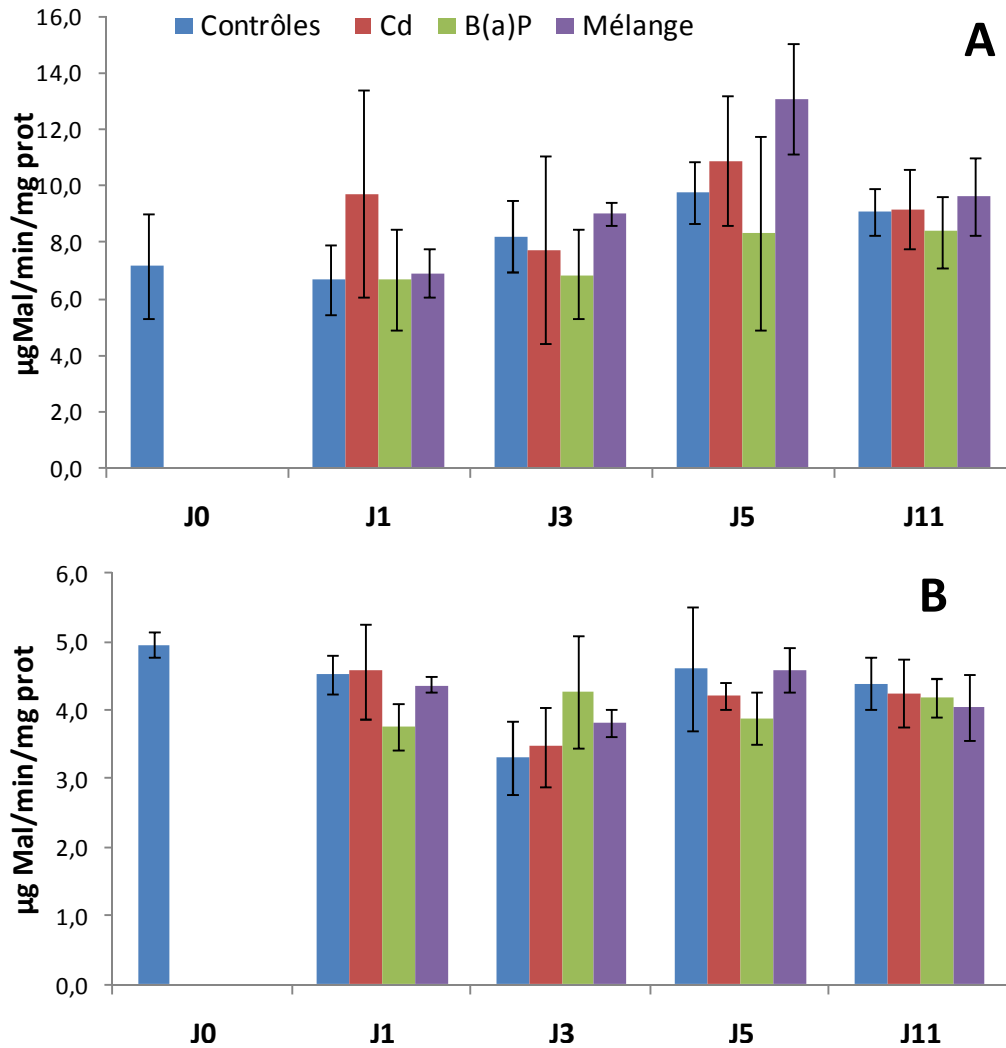


Figure 6: Activité (moyenne  $\pm$  ET, n = 3 pools) de l'amylase (A) et de l'endoglucanase (B) au niveau de la glande digestive des dreissènes exposées durant 1, 3, 5 et 11 jours à du cadmium, benzo(a)pyrène ou au mélange de deux composés.

#### 4. CONCLUSION

Suite à ces résultats, deux principaux champs d'investigation se présentent. D'une part il peut être proposé la réalisation d'autres expositions en laboratoire avec un gradient de concentrations de molécules modèles (et non une seule concentration comme dans cette étude) et sur une cinétique plus importante (ex : 21 jours). D'autre part, en complément des expérimentations en laboratoire, il peut également être proposé de réaliser des expérimentations en conditions naturelles, sur des sites caractérisés par différents types de pressions anthropiques spécifiques du milieu urbain ou du milieu agricole. Ces approches réalisées sur du long terme (ex : une année) peuvent permettre de préciser l'importance relative des facteurs de contaminations et environnementaux (facteurs de confusion) sur les activités des enzymes digestives et sur la génotoxicité. Cette dernière approche est mise actuellement en place sur deux systèmes hydriques 1) la Seine caractérisée par une pression urbaine 2) le bassin versant de la Vesle, appartenant au bassin versant de la Seine et qui est caractérisé par une pressions agri-viticole. La mesure d'adduits spécifiques du BaP est à envisager elle permettrait de suivre le devenir de ce contaminant dans les organismes exposés en laboratoire et sur le terrain en milieu urbain.

## 5. REFEEENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alink, G.M., E.M.H. Frederix-Wolters, M.A. van der Gaag, J.F.F. van der Kerckhoff, C.L.M. Poels, Induction of sister-chromatid exchanges in fish exposed to Rhine water, *Mutat. Res.* 78 (1980) 369–374.
- Binelli, A., C. Riva, D. Cogni A. Provini (2008). Assessment of the genotoxic potential of benzo(a)pyrene and pp-dichlorodiphenyldichloroethylene in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 649(1-2): 135-145.
- Bolognesi C, Landini, P., Roggieri, P., Fabbri, R. Viarengo, A. (1999) Genotoxicity biomarkers in the assesment of heavy metal effects in mussels: experimental studies. *Environ. Mol. Mutagen.* 33, 287-292.
- Brock A, Brock V ; (1989) of amylase, cellulase and laminarinase in four commercially important bivalves. In: Klekowski, R.Z., Styczy\_ska-Jurewicz, E., Falkowski, L. (Eds.), *Proceedings of the 21st European Marine Biology Symposium*, Gda\_sk, 14-19 September 1986, Zakład Narodowy im. Ossoli\_skich, Wrocław, pp. 31-40
- Brock, V., Kennedy, V.S., (1992) Quantitative analysis of crystalline style carbohydrases in five suspension- and deposit-feeding bivalves. *J. Exp. Mar. Biol .Ecol.* 159, 51-58.
- De Coen WM. Janssen CR. (1998). The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing, I. The digestive physiology of daphnids exposed to toxic stress. *Hydrobiologia*, **367**:199-209.
- Dedourge O., Geffard A. et Amiard C. (2008). Origine des perturbations du métabolisme énergétique. Amiard J.C. et Amiard-Triquet C Coord. *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*. Lavoisier Tec & Doc, Paris, 241-271.
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsh-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. (2003) HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation research* 534, 65-75.
- Golovanova IL., Kuz'mina VV., Gobzhelien TE., Pavlov DF. et Chuika GM. (1999). *In vitro* effects of cadmium and DDVP (dichlorvos) on intestinal carbohydrase and protease activities in freshwater teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, **122**:21-25.
- Kuz'mina VV., Golovanova IL. et Kovalenko E. (2002) Separate and combined effects of cadmium, temperature, and pH on digestive enzymes in three freshwater teleosts, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **69**:302-308.
- Labarta U, Fernández-Reiriz MJ, Navarro JM, Velasco A (2002). Enzymatic digestive activity in epifaunal (*Mytilus chilensis*) and infaunal (*Mulinia edulis*) bivalves in response to changes in food regimes in a natural environment. *Mar Biol*, **140** : 669-676.
- Le Goff, J., Gallois, J., Pelhuet, L., Devier, M.H., Budzinski, H., Pottier, D., André, V., Cachot, J. (2006) DNA adduct measurements in zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, Pallas. Potentiel use for genotoxicant biomonitoring of fresh water ecosystems. *Aquatic toxicol.* 79, 55-64.
- Mersch, J., M.-N. Beauvais and P. Nagel, Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mutat. Res.* **371** (1996), 47–55.
- Mersch, J. & Beauvais, M.N. (1997) The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environnements. *Mutat. Res.* 393, 141-149.
- Minier, C.A. AbarnouA. Jaouen-MadouletA. M. Le GuellecR. Tutundjian G. Bocquene, F. Leboulenger (2006). "A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary, France, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(1): 112-119.
- Palais F, Jubeaux G, Dedourge-Geffard O, Biagianti-Risbourg S, Geffard A, Studies of amylolytic and cellulolytic activities in the crystalline style and the digestive gland of the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) (en preparation)
- Parry, J.M., Tweats, D.J., Al-Mossawi, M.A.J. (1976) Monitoring the marine environment for mutagens, *Nature* 264 538–540.
- Prein, A.E., G.M. Thie, G.M. Alink, C.L.M. Poels, J.H. Koeman, (1978) Cytogenetic changes in fish exposed to water of the river Rhine, *Sci. Total Environ.* 9 287–291.

- Sabapathy U, Teo LH (1992). A kinetic study of the  $\alpha$ -amylase from the digestive gland of *Perna viridis* L. *Comp Biochem Physiol B*, **101** : 73-77.
- Simon LM., László K., Kotormán M., Vértési A., Bagi K. et Nemcsók J. (1999). Effects of synthetic pyrethroids and methidation on activities of some digestive enzymes in carp (*Cyprinus carpio* L.), *Journal of Environmental Science and Health*, **34B**:819-828.
- Singh, N. P.M. T. McCoyR. R. Tice and E. L. Schneider (1988). "A Simple Technique for Quantitation of Low-Levels of DNA Damage in Individual Cells." *Experimental Cell Research* 175(1): 184-191.
- Yan T., Teo LH. et Sin YM. (1996). Effects of metals on amylase activity in the digestive gland of the green mussel, *Perna viridis* L, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **56**:677-682.