

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**EFFETS BIOLOGIQUES D'UNE EXPOSITION PAR LES
HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP)
SUR UNE ESPÈCE BIOINDICATRICE, *MYA ARENARIA***

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

Comme exigence partielle

du programme de Maîtrise en Océanographie

PAR

NICOLAS PICHAUD

Novembre 2005

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche Jocelyne Pellerin ainsi que mon co-directeur Michel Fournier pour m'avoir fait confiance durant un an et demi, avoir prêté une oreille attentive lorsque j'en avais besoin et m'avoir transmis leur expérience dans le domaine de la recherche. Je remercie également toute l'équipe qui m'a soutenu (Florent Garnerot, Mathieu Caron, Pascal Rioux, Nicolas Lemaire, Sophie Gauthier-Clerc) même si parfois ce fut difficile de me supporter, Emilien Pelletier, Phébée Richard, Suzanne Roy, Réal Fournier, Michel Morissette, Ghislain Canuel pour leur collaboration lors de mes expériences.

Enfin je souhaite remercier ma famille, ainsi que tous mes amis d'ici (Tonio, Claudie, Pat, Guillaume, Charlot, Manu, Mel, Martin, Ana, Carcass, Ouellet, Etienne, Caro, Cyril, Kim et tous les autres) et d'ailleurs (Ju, Ben, Mich, Franck, Tom, Lulu, Sandra, Laeti, Carole, Mimi, la gang des Mourets, Disturb, NSBS et ceux que j'aurais oublié) pour m'avoir supporté et soutenu tout au long de ce périple.

Merci à tous et j'espère vous apporter ce que vous m'avez apporté.

RÉSUMÉ

Le but de ce projet fut d'estimer le stress oxydatif ainsi que les réponses immunologiques relatives à une exposition par les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), chez un organisme bioindicateur, *Mya arenaria*. Le système immunitaire, du fait de sa capacité à détruire des éléments étrangers à l'organisme et à protéger l'hôte des maladies, peut servir de marqueur utile de l'état de santé des organismes présents dans l'environnement. Certains paramètres immunitaires furent mesurés chez des myes nourries avec du phytoplancton contaminé par un mélange de HAP. L'efficacité des cellules en phagocytose ainsi que l'activité hémodocytaire furent estimées par cytométrie en flux sur microplaques grâce à l'hémolymphe prélevée dans le muscle des myes. L'estimation du stress oxydatif par la mesure de marqueurs tels que la catalase et la malondialdéhyde (MDA) fut effectuée sur la glande digestive de chaque organisme. Le stress oxydatif fut aussi évalué chez des organismes provenant d'un site témoin (Métis, Québec, Canada) et d'un site présumé contaminé par des effluents urbains (Pointe-au-Père, Québec, Canada), afin d'intégrer les variables abiotiques des variations saisonnières à nos résultats, et ainsi mieux les interpréter. Le nombre d'hémocytes a présenté une diminution lors de l'exposition, même si un faible nombre de cellules mortes fut observé pour tous les jours d'échantillonnage. Des baisses significatives furent observées entre organismes témoins et organismes contaminés aux jours 9 (dernier jour de la contamination), et 17 (8 jours après le début de la période de dépuración). La même tendance fut observée pour l'efficacité des cellules en phagocytose ainsi que pour l'activité hémodocytaire. Une différence significative entre témoins et contaminés fut aussi observée pour ces deux paramètres aux jours 2, 9 et 17. Ceci suggère que le mélange de HAP utilisé pour l'expérience affecte les processus de maturation et/ou de différenciation des hémodocytes et/ou cause une déstabilisation des membranes. Les résultats de MDA ont montré l'intervention de la peroxydation lipidique suite à l'exposition et attestent de la perturbation des membranes. Les taux de l'activité catalasique n'ont pas montré une forte activité antioxydante (pas de différences significatives), mais une faible augmentation fut tout de même notée lors de la contamination. La récupération de tous les paramètres mesurés fut observée le dernier jour de l'expérience. Le suivi *in situ* a suggéré que les myes provenant du site de Pointe-au-Père ne présentaient pas de stress oxydatif. Les taux de MDA ont cependant augmenté chez les organismes provenant du site de Métis, cette réponse étant probablement due à l'action des paramètres environnementaux.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	i
RÉSUMÉ.....	ii
TABLE DES MATIERES	iii
LISTE DES TABLEAUX	iv
LISTE DES FIGURES	v
CHAPITRE 1 :	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP).	1
1.1.1 Généralités.	1
1.1.2. Les principales sources de HAP.	1
1.1.3. Propriétés.	2
1.2. Effets des HAP chez les organismes vivants.	3
1.2.1. Le système immunitaire.	4
1.2.2. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO).	6
1.2.3. Les systèmes antioxydants.	7
1.3. Choix d'une espèce bioindicatrice pour le suivi d'une contamination.	9
1.4. Choix de biomarqueurs pour le stress oxydant.	11
1.4.1. La catalase.	12
1.4.2. La malondialdéhyde (MDA).	13
1.5. Biomarqueurs immunologiques.	14
1.5.1. Les facteurs immunitaires en tant que biomarqueurs.	14
1.5.2. La phagocytose en tant que biomarqueur.	16
1.6. Présentation du projet.	17
1.6.1. Projet global.	17
1.6.2. Projet spécifique.	18
CHAPITRE 2 : Oxidative stress and immunologic responses following an exposure to PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) in a bioindicator species Mya arenaria.....	20
ABSTRACT.	21
1. INTRODUCTION.	22
2. MATERIALS AND METHODS.	25
2.1. Experimental design.	25
2.2. Exposure protocol.	26
2.3. Immunologic analysis.	27
2.4. Biochemical analysis.	28
2.5. Statistical analysis.	29
3. RESULTS.	31
3.1. Effects of PAHs exposure on cell viability and hemocyte count.	31
3.2. Effects of PAHs exposure on phagocytosis.	31
3.3. Biochemical markers.	36
4. DISCUSSION.	45
CHAPITRE 3:	53
CONCLUSION GENERALE.	53
LISTE DES REFERENCES.....	55
ANNEXES	63

LISTE DES TABLEAUX

Table 1. Comparison of CAT activity and MDA level between control and contaminated organisms in the digestive gland of <i>Mya arenaria</i>	38
Table 2. Comparison between days of exposure for control and for contaminated organisms for the CAT activity.	40
Table 3. Comparison between days of exposure for control and for contaminated organisms for the MDA level.	42

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Effects of exposure to PAHs on the number of hemocytes..	33
Figure 2. Effects of exposure to PAHs on phagocytic activity of hemocytes..	34
Figure 3. Effects of exposure to PAHs on the efficiency of phagocytosis cells.....	35
Figure 4. Effects of exposure to PAHs on catalase activity in the digestive gland of <i>Mya arenaria</i>	39
Figure 5. Effects of exposure to PAHs on MDA level in the digestive gland of <i>Mya arenaria</i>	41
Figure 6. Catalase activity in the digestive gland of <i>Mya arenaria</i> sampled in natural environment.....	43
Figure 7. MDA level in the digestive gland of <i>Mya arenaria</i> sampled in natural environment.....	44
Figure 8. Mean values of alive hemocytes for control and contaminated organisms during the PAHs exposure.....	46

CHAPITRE 1 :

INTRODUCTION GÉNÉRALE.

1.1. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP).

1.1.1 Généralités.

Les HAP sont une famille de composés chimiques constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène dont la structure des molécules comprend au moins deux anneaux aromatiques fusionnés, chacun composé de cinq ou six atomes de carbone. Ce sont des contaminants produits par la combustion incomplète de la matière organique. Cette famille de polluants organiques comprend une centaine de substances qui diffèrent entre elles par le nombre d'anneaux et leur position respective. Ces hydrocarbures doivent leur toxicité au noyau benzénique qui est à la base de leur structure, certains sont faiblement toxiques, alors que d'autres, comme le benzo-(a)-pyrène, sont des cancérigènes reconnus depuis plusieurs années. En fait, plus d'une dizaine de molécules de HAP sont reconnues comme cancérigènes chez les animaux dont le phénanthrène, l'antracène, le pyrène, le benzo-(a)-pyrène, le fluoranthrène, etc.. Les HAP sont des contaminants ubiquistes, ils se retrouvent aussi bien au niveau atmosphérique, qu'au niveau terrestre et dans le milieu aquatique.

1.1.2. Les principales sources de HAP.

Tous les processus de combustion faisant intervenir des carburants organiques peuvent produire des HAP, les sources peuvent donc être d'origine naturelle (feux de forêt, activité volcanique) ainsi que d'origine anthropique. Les plus importantes de ces

dernières sont la combustion incomplète de matières fossiles pour chauffer les résidences et pour le transport (gaz d'échappement des véhicules automobiles), l'incinération des ordures, la fusion réductrice de l'alumine pour la production d'aluminium, le craquage catalytique du pétrole brut ainsi que la liquéfaction et la gazéification du charbon.

Au Canada les feux de forêts sont la principale source d'émission des HAP et représentent plus de 2000 tonnes de rejet par an (Environnement Canada, 2002). Au niveau anthropique, les fonderies d'aluminium représentent 925 tonnes par an de rejet de HAP dans l'atmosphère, alors qu'en milieu aquatique et terrestre, les principales sources sont les produits créosotés (jusqu'à 2000 tonnes par an), les usines métallurgiques (4 tonnes par an), les déversements de produits pétrolifères (76 tonnes par an) ainsi que la déposition des HAP contenus dans l'atmosphère (Environnement Canada, 2002).

1.1.3. Propriétés.

Les HAP à faible masse moléculaire sont composés de moins de 4 anneaux aromatiques, ils sont relativement solubles dans l'eau, volatils et se lient peu aux particules.

Les HAP à masse moléculaire élevée sont composés de 4 anneaux et plus, sont peu solubles dans l'eau, non volatils et sont fortement adsorbés sur les matières particulaires sur lesquels ils sont transportés et se dégradent lentement (Mc Elroy et al., 1989; Environnement Canada, 2002). C'est pourquoi, les sédiments lacustres et marins sont le réservoir d'accumulation des HAP.

Lorsqu'ils sont dans le sédiment, les phénomènes de remises en suspension, de bioturbation, et de diffusion, les rendent susceptibles d'être ingérés par les divers organismes benthiques et pélagiques. Les animaux aquatiques sont donc de bons organismes sentinelles pour le suivi d'une contamination par les HAP. De plus, dans les organismes, par leur faible solubilité et leur affinité pour les lipides, les HAP ont tendance à s'accumuler dans les tissus biologiques riches en lipides. Les HAP peuvent donc être bioaccumulés par les organismes et ainsi rentrer dans les réseaux trophiques où ils pourront éventuellement être bioamplifiés (Ramade, 1992; Albers et al., 1995; Grundy et al., 1996a et b; Wootton et al., 2003). De ce fait, de nombreuses espèces sont touchées et en particulier les espèces endobenthiques ou épibenthiques se nourrissant à la surface du sédiment, tels les poissons plats, certains annélides ainsi que certains mollusques bivalves (Law et al., 1999).

1.2. Effets des HAP chez les organismes vivants.

Les HAP sont absorbés directement ou indirectement par les organismes vivants. L'introduction de ces contaminants affectera leur physiologie et impliquera des réponses cellulaires et physiologiques pouvant être de nature différente (Moore, 1979 ; Bayne et al., 1985 ; Nott et al., 1985 ; Moore et al., 1987 ; Viarengo et al., 1992 ; Krishnakumar et al., 1997 ; Wootton et al., 2003). Ainsi, des dommages structuraux de l'ADN, des modifications du système immunitaire, une dysfonction de la biosynthèse des protéines, une baisse de l'activité enzymatique ou encore des dommages membranaires peuvent être observés. Dans cette étude, le stress oxydatif, le niveau de la peroxydation lipidique ainsi que certains changements immunologiques vont être

évalués afin d'estimer les réponses individuelles de certains organismes à la toxicité des HAP.

1.2.1. Le système immunitaire.

Le système immunitaire va intervenir lors d'une agression du soi par des pathogènes, des virus ou encore des xénobiotiques (Brousseau *et al.*, 1998 ; Fournier *et al.*, 2000). Ces xénobiotiques peuvent être immunotoxiques, c'est-à-dire qu'ils vont affecter les fonctions immunitaires. Cela se traduira par des conséquences variées comme l'immunodépression, l'immunostimulation, l'hypersensibilité ou l'auto-immunité (Fournier *et al.*, 2004). Les HAP sont considérés comme des substances immunodépressives, même si cette tendance n'est pas constante chez certaines espèces de bivalves telles que *Crassostrea virginica* (Sami *et al.*, 1992) ou encore *Mytilus edulis* (Grundy *et al.*, 1996a ; Brousseau *et al.*, 1998). En effet, cela dépendra de la concentration, du mode d'exposition, de la nature du contaminant et de l'espèce étudiée.

Plus un animal est évolué et plus la structure de son système immunitaire est complexe. Chez les invertébrés, les macrophages ont un rôle très important de même que pour les poissons, alors que chez les amphibiens, les reptiles, les oiseaux et les mammifères ce sont surtout les lymphocytes qui auront le plus d'importance (Cossu *et al.*, 1997 ; Fournier *et al.*, 2004). En général, les réponses immunitaires sont divisées en réponses immunitaires spécifiques et en réponses immunitaires non spécifiques.

L'immunité spécifique s'axe sur deux types de réponses :

les réponses à médiation cellulaire : chez les vertébrés, il s'agit des lymphocytes T ;
chez les invertébrés, ce sont des mécanismes de reconnaissance allogéniques dont nous

connaissions à peine les bases moléculaires (Raftos et Briscoe, 1990 ; Humphreys et Reinherz, 1994 ; Fournier et al., 2004).

Les réponses à médiation humorale : elles impliquent les lymphocytes B produisant les immunoglobulines chez les vertébrés. Chez les invertébrés, ce sont des molécules contenues dans l'hémolymphe (Schluter et al., 1994 ; Eyambe et al., 1993) ayant une activité antibactérienne telles que les agglutinines (Roitt et al., 1993).

L'immunité non spécifique repose sur l'intervention de cellules spécialisées reconnaissant les éléments du non soi sans aucune spécificité. Il existe deux processus essentiels à cette non spécificité : la phagocytose et les réactions inflammatoires (Cossu et al., 1997). La phagocytose est un mécanisme permettant l'ingestion et la destruction des éléments étrangers et faisant intervenir différentes variétés de cellules selon les espèces. Ainsi, chez les mammifères, ce sont des cellules circulantes tels que des granulocytes neutrophiles mais aussi des cellules fixées ou mobiles présentes dans les organes et les tissus : les macrophages (Cossu et al., 1997). Chez les invertébrés, la phagocytose est le mécanisme de défense prédominant, elle fait intervenir des cellules mobiles, les amibocytes chez les acoelomates, alors que chez les coelomates, ce sont les hémocytes dans le sang ou l'hémolymphe ainsi que les coelomocytes dans la cavité coelomique (Grassé et al., 1970). Chez les mollusques bivalves, les hémocytes circulant dans l'hémolymphe représentent la composante principale du système immunitaire.

Les hémocytes exercent différentes activités pour assurer le maintien de l'intégrité de l'organisme en présence de xénobiotiques tels que les HAP dont la phagocytose ainsi que la production d'intermédiaire réactifs de l'oxygène.

1.2.2. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Ces espèces sont présentes dans les organismes et sont des intermédiaires clés dans les réactions métaboliques normales et pour la production d'énergie (Cossu et al., 1997). Cependant, leur abondance est contrôlée par l'organisme car lorsque leur concentration est trop élevée, elles peuvent engendrer un stress oxydant. Un stress oxydant est un déséquilibre entre les systèmes prooxydants et antioxydants en faveur des premiers, source d'effets toxiques potentiels et est synonyme de dommage (Halliwell, 1987 ; Sies, 1991). Les xénobiotiques, tels que les HAP, perturbent le transfert d'électron au niveau des membranes microsomales ce qui va provoquer la formation des radicaux libres et ainsi engendrer un stress oxydant (Cossu et al., 1997; Pellerin et al., 2004).

Les formes les plus réactives de l'oxygène sont notamment :

- L'anion superoxyde O_2^- produit lors de réactions d'oxydation enzymatiques ou spontanées. Il peut endommager les cellules directement ou par le biais des autres formes radicalaires qu'il engendre. Notamment il participe à la destruction des phospholipides membranaires en se dismutant en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), réaction catalysée par certaines enzymes, les superoxydes dismutases (Cossu et al., 1997).
- Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 : l'anion superoxyde se couple à un électron libre pour donner l'ion peroxyde O_2^{2-} qui, dans les conditions de pH physiologique formera immédiatement de l' H_2O_2 , très diffusible et franchissant les barrières membranaires (Cossu et al., 1997).

Ces espèces réactives de l'oxygène vont induire des processus aboutissant à des dommages sur l'ensemble des constituants cellulaires telles la peroxydation lipidique

conduisant à la fragilisation des membranes lysosomales ou la dénaturation oxydante des acides aminés et des bases azotées (Tremblay et Pellerin-Massicotte, 1997 ; Regoli, 2000). La peroxydation lipidique notamment va perturber les fonctions membranaires, ce qui se traduira par une diminution de la fluidité des membranes et par l'inactivation des enzymes situées à leur niveau et va affecter l'activité phagocytaire. De plus, si les radicaux libres sont générés régulièrement et continuellement, mais à des concentrations modérément plus élevées que la concentration basale, il sera plus probable d'assister à une cancérisation des tissus, à un vieillissement prématuré ou encore à des néoplasies (Ribera et al., 1991 ; Winston et al., 1991 ; Cossu et al., 1997).

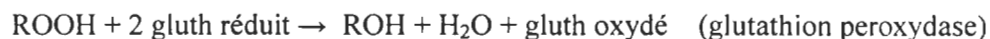
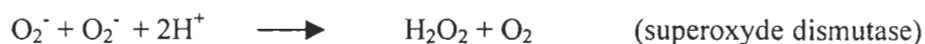
Afin de contrôler la production des ERO, des systèmes antioxydants vont intervenir dans les cellules afin de détoxifier les organismes soumis à un stress induit par des substances xénobiotiques telles que les HAP. Ces systèmes ont été mis en évidence chez un grand nombre d'organismes vivants. Un stress oxydant, peut donc être soit induit par des substances xénobiotiques présentes dans le milieu, soit par un déficit de l'action de ces systèmes antioxydants.

1.2.3. Les systèmes antioxydants.

Il y a plusieurs mécanismes d'action antioxydante développés par les organismes vivants. Ces mécanismes vont servir entre autre à inactiver les intermédiaires clés que sont O_2^- et H_2O_2 (Cossu et al., 1997). Différentes molécules vont ainsi intervenir au niveau de la détoxification cellulaire, celles-ci étant soit des systèmes enzymatiques, soit des systèmes non-enzymatiques.

Au niveau des systèmes enzymatiques, il existe trois types d'enzymes antioxydantes majeures : les superoxydes dismutases, les catalases et les peroxydases

(Hoffman et al., 1995 ; Cossu et al., 1997 ; Newman et al., 1998). Les superoxydes dismutases vont faire baisser les taux de radical superoxyde par une catalyse de type Haber-Weiss (Newman et al., 1998) ; alors que les catalases et les peroxydases telles que la glutathion peroxydase vont réduire les taux de peroxyde d'hydrogène :



Les systèmes non-enzymatiques viennent renforcer l'action de ces enzymes en agissant comme un réducteur ou un capteur de radicaux (Cossu et al., 1997). Il s'agit de molécules telles la vitamine E (l' α -tocophérol), la vitamine C, la vitamine A (le β -carotène), les catécholamines, le glutathion, et l'acide urique (Winston et Di Giulio, 1991).

Ces systèmes antioxydants, de même que le système immunitaire, vont être représentatifs de l'état physiologique de l'organisme, ce qui va permettre une meilleure connaissance du milieu dans lequel il évolue. Cependant, de nombreuses variations sont observées chez les animaux, et tous ne sont pas considérés comme des espèces sentinelles capables de nous renseigner sur les processus intervenant lors de la présence de HAP ou de tout autre polluant.

C'est pourquoi, le choix d'une espèce dite bioindicatrice, c'est-à-dire réagissant aux variations biotiques et abiotiques du milieu dans lequel elle vit, est indispensable pour une étude écotoxicologique impliquant des phénomènes anthropiques telle que l'introduction de HAP dans l'environnement.

1.3. Choix d'une espèce bioindicatrice pour le suivi d'une contamination.

Se limiter à la mesure des concentrations en polluant dans un biotope donné sans évaluer leurs effets écologiques et toxicologiques conduit à ignorer l'essentiel des problèmes (Ramade 1992). L'évaluation des quantités et de la distribution de polluants tels que les HAP chez les individus d'espèces choisies pour leurs particularités bioécologiques présente un grand nombre d'avantages. En effet, de nombreux polluants sont à des concentrations nettement supérieures dans les organismes que dans le milieu, du fait des processus de bioaccumulation et de bioamplification. De plus, dans les organismes ayant subi une exposition à un contaminant, ce dernier sera présent durant une période plus importante que dans les constituants abiotiques du milieu (Ramade, 1992).

Ainsi, l'analyse de ces organismes sentinelles peut nous permettre de connaître la biodisponibilité des contaminants, c'est-à-dire leur disponibilité vis-à-vis de la biomasse. De très nombreux travaux ont été publiés sur l'utilisation de certaines espèces en tant qu'indicateur du milieu, la variété et la diversité des groupes taxonomiques utilisés étant très vastes. Certains poissons ainsi que de nombreux mollusques bivalves ont souvent été retenus en tant qu'espèces sentinelles (Kirchoff et al., 1999 ; Pellerin-Massicotte, 1997 ; Gauthier-Clerc et al., 2002).

Les bivalves étant des filtreurs, des organismes sédentaires ou à mobilité réduite du fait de leur particularité biologique d'organismes sessiles, accumulent des polluants à des concentrations plus élevées que celle retrouvées dans les eaux environnantes (NOAA, 1993 ; O'Connor et Beliaeff, 1995 ; Oliver et al., 1999). Les mollusques bivalves sont en effet capables d'accumuler de très fortes concentrations en polluants, et par leur longévité, ils sont très utiles pour un suivi écotoxicologique. De plus, étant peu

mobiles, ils sont représentatifs des contaminants présents dans un site. De ce fait, la mesure des contaminants dans les tissus de mollusques bivalves peut être utilisée pour estimer le type et la quantité relative de ces contaminants dans la colonne d'eau (Bayne et al., 1980 ; Phillips, 1986). De nombreux travaux privilégient les mollusques bivalves comme modèle biologique. Nous citerons notamment les travaux sur *Crassostrea* (Moore et al., 1984 ; Sami et al., 1992), sur *Mytilus* (Rizebrough et al., 1976 ; Viarengo et al., 1990 ; Pellerin-Massicotte, 1994 et 1997 ; Grundy et al., 1996a et b) et sur *Mya* (Mayrand et al., 1994 ; Tremblay et Pellerin-Massicotte, 1997 ; Brousseau et al., 2000 ; Fournier et al., 2002 ; Camus et al., 2003).

Pour cette étude sur les effets des HAP, nous avons choisi *Mya arenaria*, qui est une espèce très appropriée pour une estimation de la contamination du milieu car c'est une espèce vivant dans le sédiment où les HAP peuvent être retrouvés en grande quantité. *Mya arenaria* est un mollusque bivalve pélecypode, c'est une espèce fouisseuse vivant enfoncée dans les 20 premiers cm de sédiment tels que de la vase ou du sable. De plus c'est un organisme filtreur, suspensivore vivant en zones intertidales, à l'interface eau-sédiment. Elle possède deux siphons contractiles, l'un exhalant, l'autre inhalant, capables d'une extension considérable pour atteindre la surface des sédiments et ainsi respirer et se nourrir. Elle rétracte rapidement ses siphons sous la surface si elle est perturbée et éjecte un jet d'eau. Elle est ubiquiste dans l'hémisphère Nord (Abbott, 1968) et appartient à la communauté boréoatlantique à *Macoma baltica* au Québec (Desrosiers et Brêthes, 1984).

C'est une espèce ayant une grande tolérance aux faibles salinités et à la pollution, et c'est pourquoi elle est caractéristique de milieux estuariens. En effet, ces organismes réagissent à la toxicité d'un grand nombre de polluants tels que les

butylétains (Bryan et Gibbs, 1986 ; Bouchard et al.,1999), les PCB (Livingstone et al., 1993), le mercure (Fournier et al., 2001) ainsi que bien entendu les HAP (Camus et al., 2003). Les réponses de *Mya* à des polluants vont dépendre de la nature et de la concentration des contaminants. Ces réponses vont pouvoir être mesurées par l'intermédiaire de biomarqueurs. Les biomarqueurs sont des réponses biologiques d'organismes exposés à des polluants et dont la mesure permet d'évaluer la toxicité du ou des polluants en question.

1.4. Choix de biomarqueurs pour le stress oxydant.

Les marqueurs de stress sont des signaux cellulaires à l'échelle moléculaire, biochimique ou physiologique dont les caractéristiques structurales ou fonctionnelles peuvent être rapidement modifiées à la suite de contraintes environnementales ou de l'exposition à des polluants (Pellerin et al., 2004). Comme dit précédemment, la formation d'oxydants et le déficit de l'action des antioxydants sont des signes potentiels de toxicité et ils constituent donc des indicateurs précoces d'une agression toxique. C'est pourquoi, la mesure de ces paramètres peut s'avérer pertinente pour évaluer le niveau de toxicité chez les organismes. En effet, parmi les différentes réponses biochimiques, l'induction des enzymes antioxydantes est l'une des méthodes les plus largement acceptées pour la détection d'une pollution organique en milieu aquatique (Livingstone et al., 1992 ; Doyotte et al., 1997). Les systèmes antioxydants agissent pour prévenir le stress oxydant en éliminant les ERO et ils peuvent être considérés comme une réponse adaptative après une exposition aux HAP, permettant à l'organisme de contrer partiellement ou totalement le stress oxydant dans un milieu pollué (Di Giulio et al., 1989 ; Livingstone et al., 1990 ; Winston et Di Giulio, 1991). Ces systèmes

sont présents dans les cellules eucaryotes, mais leur mesure est complexe et peut varier du fait de la variété des tissus. La glande digestive est un organe entrant dans de nombreux processus métaboliques chez les mollusques bivalves, assurant notamment les fonctions hépatiques, pancréatiques et digestives et c'est un site d'entreposage et de transfert des réserves énergétiques. De ce fait, l'absorption de polluants se traduira par des modifications physiologiques et cellulaires dans cet organe. De plus, les HAP, par leur affinité pour les lipides, vont s'accumuler dans la glande digestive, ce qui en fait un organe cible pour l'évaluation de la toxicité.

Au niveau des systèmes enzymatiques, plusieurs activités peuvent être mesurées. En effet, la superoxyde dismutase, la catalase ou encore la glutathion peroxydase interviennent lors de l'exposition à un contaminant, et vont donc pouvoir être considérés comme de bons biomarqueurs (Cossu et al., 1997 ; Pellerin et al., 2004).

1.4.1. La catalase.

La catalase est une hémoprotéine tétramérique, de poids moléculaire de 240000 daltons, avec un atome de fer par sous-unité. Comme dit précédemment, c'est une enzyme qui catalyse la réaction de dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène et est présente chez tous les organismes aérobies. Dans les cellules eucaryotes, elle se trouve localisée dans les peroxysomes (au niveau des cellules hépatiques et rénales) ou dans les organelles de taille plus réduite appelés les microperoxysomes (dans les autres tissus). La catalase est une enzyme à spécificité forte pour les peroxydes : en effet, mis à part le peroxyde d'hydrogène, seuls les peroxydes de méthyle et d'éthyle provoquent une activité enzymatique détectable.

La catalase fonctionne en association avec la superoxyde dismutase, c'est pourquoi les réponses de leur activité enzymatique présentent souvent les mêmes tendances. Les augmentations de l'activité catalasique sont cependant plus nettes et plus précoces que celles de la superoxyde dismutase (Di Giulio et al., 1993). En effet, une augmentation de l'activité catalasique a été observée chez la moule en réponse à un surplus de production des espèces réactives de l'oxygène (Pellerin-Massicotte, 1997).

De plus, des augmentations similaires ont été remarquées lors d'exposition au benzo-(a)-pyrène chez la moule bleue (Garcia-Martinez et al., 1995), de même qu'en présence de sédiments contaminés par les HAP (Livingstone et al., 1993).

L'activité catalasique présente des avantages évidents en tant que biomarqueur. Cependant, la présence de grandes quantités de polluants peut surpasser les systèmes oxydants, ce qui va provoquer des dommages aux membranes cellulaires. Cependant, les relations dose-effet sont difficiles à mettre en évidence en milieu naturel et les réponses peuvent être influencées par d'autres facteurs que les polluants (Livingstone et al., 1995) tels que la température et l'exposition à l'air (Pellerin-Massicotte., 1997). La peroxydation lipidique, notamment, traduit l'inefficacité des systèmes antioxydants à enrayer une agression toxique. Les teneurs en malondialdéhyde constituent un biomarqueur très approprié de la peroxydation lipidique subséquente à un stress oxydant.

1.4.2. La malondialdéhyde (MDA).

C'est un des produits finaux de la dégradation des acides gras. C'est un agent alkylant puissant capable de réagir avec les macromolécules biologiques. Le taux de MDA est proportionnel à l'extension de la peroxydation lipidique (Aust et al., 1985). En

effet, la peroxydation lipidique résulte en la dénaturation des acides gras polyinsaturés composant les membranes. Ainsi, lors d'un stress causé par l'introduction d'un polluant, lorsque les systèmes anti-oxydants deviennent inefficaces, les dommages cellulaires peuvent être estimés par le taux de MDA. De ce fait, cela constitue un bon biomarqueur pour la mesure du stress oxydant.

De forts taux de MDA ont déjà été observés chez des mollusques bivalves ayant été exposés à la présence de polluants dans le milieu tels que *Mytilus edulis* (Pellerin-Massicotte, 1994) et *Unio tumidus* (Cossu et al., 2000). De plus, la présence de benzo(a)-pyrène révèle une augmentation de MDA chez *Mytilus galloprovincialis* (Viarengo et al., 1990), de même que les HAP en général chez *Perna viridis* (Cheung et al., 2001 et 2004).

Comme signalé précédemment, les systèmes antioxydants ne vont pas être les seuls à réagir lors d'une contamination. En effet, le système immunitaire va aussi intervenir.

1.5. Biomarqueurs immunologiques.

Lors de la présence de xénobiotiques tels que les HAP, le système immunitaire va réagir par des réponses immunitaires non spécifiques. La présence d'un antigène va déclencher la migration des hémocytes suivie de la phagocytose et de la destruction de l'agent étranger sous l'action d'enzymes (Pipe, 1990).

1.5.1. Les facteurs immunitaires en tant que biomarqueurs.

Chez les organismes bivalves, les hémocytes circulant dans l'hémolymphe représentent la composante principale du système immunitaire. Ils sont regroupés en deux sous-populations de cellules : les granulocytes représentant 80 à 85% des

hémocytes et ayant la forme de petites cellules granulaires avec un petit noyau ; ainsi que les hyalinocytes qui sont agranulaires avec un noyau central entouré par peu de cytoplasme (Pampanin et al., 2002).

Les hémocytes contiennent des granules appelées lysosomes qui sont le lieu de stockage des enzymes de dégradation. Ces lysosomes contiennent une trentaine d'enzymes hydrolytiques et peuvent séquestrer plusieurs contaminants (George, 1983). Lors d'une perturbation du milieu, les hémocytes vont être recrutés afin de contrer cette agression. Cependant, lorsque le stress sera trop grand, cela va conduire à la peroxydation lipidique qui va déstabiliser les lipoprotéines des membranes lysosomales. Ainsi, les enzymes hydrolytiques vont être libérées dans le cytoplasme et vont provoquer la dégradation des réserves énergétiques (Moore et al., 1979) ce qui va augmenter les dommages cellulaires.

Les hémocytes peuvent être affectés par divers facteurs environnementaux tels les pathogènes (Anderson et al., 1992 ; Coles et al., 1994) et certains contaminants environnementaux (Cheng, 1988 ; Renwranz, 1990 ; Pipe et al., 1995 ; Fisher et al., 2000). Par exemple, une augmentation du nombre d'hémocytes a été observée suite à une contamination par des xénobiotiques (Anderson et al., 1992 ; Coles et al., 1994), mais une diminution a aussi été observée pour de fortes concentrations en contaminants (Suresh et Mohandas, 1990). De plus, une diminution du nombre d'hémocytes a été observée chez les bivalves suite à une exposition à des HAP, mais à des concentrations de contaminants qui ne sont pas retrouvées dans l'environnement (Sami et al., 1992 ; Grundy et al., 1996 ; Fournier et al., 2002). Donc, lorsque les systèmes antioxydants sont assez efficaces, le nombre d'hémocytes va augmenter, mais lorsque la

peroxydation lipidique intervient, il faudrait plutôt s'attendre à une diminution de leur nombre, ce qui va permettre d'estimer le degré d'effets dus à la contamination.

Le nombre d'hémocytes, ainsi que leur viabilité dans les organismes exposés constitueraient donc de bons biomarqueurs de toxicité lors d'une contamination par les HAP.

De plus, comme dit précédemment, les hémocytes vont effectuer la phagocytose, qui peut être évaluée par l'activité hémocytaire.

1.5.2. La phagocytose en tant que biomarqueur.

La phagocytose va être prédominante chez les mollusques bivalves en tant que système de défense immunologique. Un corps étranger sous forme solide ou une substance dissoute peut être intégré par les cellules par une invagination de la membrane cellulaire qui forme une vacuole phagocytaire. Des lysosomes vont ensuite fusionner avec ces vacuoles et vont décharger leur contenu enzymatique qui va dégrader ces composantes du non-soi. Une diminution de l'activité phagocytaire a déjà été observée lors de l'exposition à divers contaminants chez la moule de méditerranée (Pipe et al., 1995). De plus, parallèlement à la diminution du nombre d'hémocytes comme citée précédemment, de nombreuses études ont montré une inhibition de l'activité phagocytaire d'organismes exposés à des sédiments contaminés aux HAP (Sami et al., 1992 ; Grundy et al., 1996 ; Fournier et al., 2002). Cependant, cette inhibition n'est pas constante et se produit lors d'une exposition à des concentrations en HAP élevées (500 µg par litre par jour) que l'on ne retrouve généralement pas en milieu naturel, même dans les sédiments qui en sont les réservoirs privilégiés d'accumulation (Grundy et al., 1996).

Le fait que la phagocytose soit une réponse sensible à l'exposition aux xénobiotiques de l'environnement et le rôle critique que joue ce processus dans l'élaboration de plusieurs réponses immunitaires, en fait un biomarqueur de choix chez les mollusques bivalves pour la mesure de l'immunotoxicité (Cossu et al., 1997 ; Brousseau et al., 1998).

L'étude d'une contamination se base donc sur le choix d'organismes bioindicateurs qui, exposés à des contraintes anthropiques, vont réagir par des processus physiologiques et cellulaires dont les réponses vont pouvoir être mesurées et ainsi renseigner sur la toxicité du milieu. Dans le cas d'une exposition aux HAP, les mollusques bivalves sont de bons bioindicateurs et leur glande digestive un bon organe cible pour la mesure de la toxicité. De plus, les réponses des systèmes antioxydants et l'état du système immunitaire sont des biomarqueurs pertinents pour le suivi de la contamination par des HAP. Parmi les réponses pouvant être mesurées, l'activité de la catalase, le taux de malondialdéhyde, le nombre et la viabilité des hémocytes ainsi que le taux de l'activité phagocytaire vont être retenus.

1.6. Présentation du projet.

1.6.1. Projet global.

Ce projet s'axe sur plusieurs composantes, l'objectif principal étant de développer un réseau trophique modèle permettant de tester l'hypothèse d'un transfert possible 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. Cela signifie qu'à partir de mésocosmes

expérimentaux les plus proches possibles des conditions naturelles, un suivi de la contamination par les HAP sera réalisé ainsi que l'étude de leur possible interaction avec les variables biologiques.

Pour cela, les divers vecteurs représentés par les niveaux trophiques ont été séparés selon plusieurs équipes de recherche afin d'étudier le transfert et la mesure des effets toxiques chez *Fundulus heteroclitus*, de faire une estimation de la bioaccumulation chez les bivalves (*Mya arenaria* et *Mytilus edulis*) et de suivre la cinétique d'accumulation de HAP radiomarqués.

Notre étude concerne le vecteur benthique suspensivore représenté par *Mya arenaria* : sa capacité à réagir à une exposition aux HAP et les effets biologiques de ces derniers sur sa physiologie.

1.6.2. Projet spécifique.

Les objectifs de ce projet sont de quantifier le transfert des HAP des particules en suspension vers un vecteur benthique suspensivore *Mya arenaria*, et d'examiner les réponses toxicologiques induites par le transfert d'un mélange complexe de HAP chez cette espèce. Plus spécifiquement, les réponses de l'activité catalasique, des taux de MDA, du nombre d'hémocytes et de l'activité phagocytaire seront mesurées afin d'estimer les effets biologiques d'une exposition aux HAP chez *Mya arenaria*.

Le projet se divise en deux parties :

- En mésocosme : exposition des organismes dans des aquariums alimentés en eau de mer par l'intermédiaire de phytoplancton contaminé aux HAP, à des concentrations proches de celles retrouvées dans les particules en suspension en milieu naturel (Système St. Laurent – Saguenay), les réponses étant mesurées pendant 45 jours.
- Dans le milieu naturel : comparaison des réponses de l'activité catalasique et des taux de MDA entre deux sites, l'un témoin (Métis sur mer) et l'autre supposé contaminé (Pointe-au-Père) afin de pouvoir intégrer aux expériences les variables abiotiques explicatives des variations saisonnières.

La contamination par les HAP nous amène à comparer les traitements entre eux. Plusieurs hypothèses seront testées : la première est qu'aucune différence significative apparaît entre les individus témoins et les individus contaminés, la deuxième étant que l'état physiologique des myes contaminées va subir des changements au niveau immunologique et des systèmes oxydatifs; la troisième hypothèse sera que *Mya arenaria* aura la même sensibilité à la contamination au niveau immunologique et au niveau oxydatif.

**CHAPITRE 2 : Oxidative stress and immunologic responses
following an exposure to PAHs (Polycyclic Aromatic
Hydrocarbons) in a bioindicator species *Mya arenaria*.**

N. Pichaud, M.Fournier, S.Gauthier-Clerc, E.Pelletier and J.Pellerin

ABSTRACT.

The aim of this project was to investigate oxidative stress and immune responses following an exposure to PAHs in a bioindicator organism, *Mya arenaria*. The immune system, in its capacity to destroy foreign particles and to protect the host against diseases, can serve as a useful marker of the health status of environmentally stressed organisms. Immune parameters of *Mya arenaria* fed with PAHs contaminated phytoplankton were estimated. Efficiency of phagocytosis and hemocytes activity were monitored using a microplate modified cytometric method with 100 μ L of hemolymph and a ratio of 30 fluorescent beads for one hemocyte, using a FACSCAN cytometer. Assessment of oxidative stress using catalase activity and levels of malondialdehyde was performed on the digestive gland. Oxidative stress was also measured on organisms from a control site (Metis Beach, Quebec, Canada) and from a site presumed to be contaminated by urban effluents (Pointe-au-Père, Quebec, Canada), to integrate the effects of abiotic variables related to seasonal variations to better interpret our results. The number of hemocytes decreased during the exposure experiment even if a low number of dead cells was observed for all sampling days. Significant decreases were observed between control and contaminated organisms at days 9 (last day of the contamination) and 17 (8 days after the beginning of the depuration period). The same trend was observed for the activity of hemocytes and the efficiency of phagocytic cells. A significant difference between control and contaminated clams was also observed for these two parameters at days 2 and 9 of the contamination period and at day 17. These results suggest that the PAH mixture may interfere within the maturation and/or differentiation processes of hemocytes or cause a destabilization of membranes. The results of MDA showed that the lipid peroxidation occurred following the exposure and attested the physiological disturbance of the membrane. The levels of CAT activity did not show a great antioxidant activity (no significant differences) but in contrast, a small increase was observed during the contamination. Recovery was noted for all measures at the end of the experiment. The *in situ* survey suggested that clams from Pointe-au-Père site did not show any oxidative stress. MDA levels increased however in organisms from Metis beach, a response probably due to some environmental parameters like exposure to air and variations temperature due to the location on the tidal flat .

1. INTRODUCTION.

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous in the environment. PAHs are produced by incomplete combustion of solid and liquid fuels. High molecular weight PAHs are predominantly adsorbed on soot and particulate matter and thus are found in sediments (Mc Elroy et al., 1989). Bioavailability to marine organisms was reported to be due to different mechanisms like bioturbation, sediment resuspension and diffusion. Bivalve molluscs are suitable species to assess toxicity in the environment due to their sedentary nature, filter-feeding behavior and ability to bioaccumulate pollutants like PAHs (Grundy et al., 1996a and b; Wootton et al., 2003). Exposure to PAHs can lead to toxic effects in *Mytilus edulis* (Moore, 1979; Nott et al., 1985 ; Moore et al., 1987 ; Livingstone et al., 1992; Krishnakumar et al., 1997 ; Wootton et al., 2003), *Mytilus galloprovincialis* (Livingstone et al., 1995; Viarengo et al., 1992), *Unio tumidus* (Cossu et al., 2000), *Mya truncata* (Camus et al., 2003) and *Perna viridis* (Cheung et al., 2001 and 2004). The presence of xenobiotics like PAHs increases the formation of reactive oxygen species (ROS) which affect immune functions and induce detoxification systems like antioxidant defense systems present in all aerobic cells (Di Giulio et al., 1989; Viarengo et al., 1992; Brousseau et al., 1998 ; Fournier et al., 2000). Therefore modifications of those defense systems can be used as biomarkers (Livingstone et al., 1992; Pellerin-Massicotte, 1994; Cossu et al., 1997; Cheung 2004). Thus, different antioxidant parameters like the antioxidative enzymes including superoxide dismutase, glutathion peroxidase and catalase (CAT) are commonly used to assess the toxicity in animals. Particularly, catalase is an enzyme that promotes the conversion of hydrogen peroxide (H₂O₂) to water and molecular oxygen and can be

used as a biomarker of oxidative stress in bivalves. Few studies reported an increase of superoxide dismutase and catalase activities when an excess of ROS was observed in bivalves (Pellerin-Massicotte, 1997; Cheung 2004). Lipid peroxidation attesting cytotoxicity was detected when the antioxidant defenses were the lowest, which can be used as biomarkers for toxicity (DiGiulio et al., 1993; Livingstone et al., 1993; Tremblay and Pellerin-Massicotte, 1997; Regoli, 2000). Malondialdehyde (MDA) is one of the final products of the membrane fatty acid degradation and is considered as a good biomarker of lipid peroxidation and consequently of oxidative stress (Pellerin-Massicotte, 1997; Cheung et al., 2001 and 2004). The presence of pollutants in the environment caused an increase in the CAT activity and the MDA level in bivalves (Pellerin-Massicotte, 1994; Cossu et al., 2000). More specifically, exposure with sediment contaminated by PAHs showed the same trend in *Mytilus galloprovincialis* (Viarengo et al., 1990), *Mytilus edulis* (Garcia-Martinez et al., 1995) and *Perna viridis* (Cheung 2004).

Because of lipid peroxidation and membrane destabilization, immune functions can be affected. Hemocytes and phagocytosis are the main components of the immune system in bivalves and may represent an ideal biological endpoint (Wong et al., 1992; Brousseau et al., 1998; Fournier et al., 2002). An increase in the number of hemocytes has been observed after TBT contamination in *Crassostrea virginica* (Anderson et al., 1992) and fluoranthene in *Mytilus edulis* (Coles et al., 1994). However, a diminution has been observed with high concentrations of copper in *Sunetta scripta* and *Villorita cyprinoides* var. *cochinensis* (Suresh and Mohandas, 1990). Sediment contaminated by PAHs have decreased the number of hemocytes and inhibited phagocytic activity in exposed *Crassostrea virginica* (Sami et al., 1992) and *Mytilus edulis* (Grundy et al.,

1996a and 1996b). These responses were then dependant on the species and the type of contaminant studied even if concentrations were higher (more than 500 µg per litre per day, Grundy et al., 1996) than those found in the environment (Sami et al., 1992; Grundy et al., 1996a; Fournier et al., 2002). This study report PAH effects on immune parameters and oxidative stress in *Mya arenaria*. Originality of this work was to expose clams to dietary PAHs using contaminated phytoplankton and to follow simultaneously immune parameters and induction of oxidative stress. Catalase activities and MDA levels were also surveyed in clams in natural conditions during the experimental exposure to PAHs.

2. MATERIALS AND METHODS.

2.1. Experimental design.

In June 2004, sediment and soft shell clams (*Mya arenaria*) were collected on the south shore of the St. Lawrence Estuary, in Metis Beach (48°40'N, 68°00'W), a site exempt of direct sewage inputs or harbor activity (Fournier et al., 2002). Organisms were randomly sampled at low tide and sediments were taken in the first 10 cm. Sediments were sieved through a 1mm mesh array. Clean sediments were divided in 10 aquaria installed at the Pointe-au-Père station and each aquarium was supplied with seawater (8-10°C) at a constant flow rate of 500 mL per min to maintain a high renewal rate. Organisms (n=36 per aquarium) were transferred in each aquarium and prior to the beginning of the experiment, were acclimated during 14 days to reduce their stress due to handling and container effects. Clams were fed during the last week of the acclimation period with phytoplankton *Asterionnella* diluted in seawater filtered with a 0.7 µm membrane. Algae concentration was of 20 millions cells per mL with a flow rate of 2 mL per min.

Clams from the control site and from a site presumed to be contaminated by urban effluents, Pointe-au-Père (48°31'N, 68°29'W), were also sampled (n=20 per site) during five months (20 May to 4 October 2004, every two weeks), in order to measure stress responses in the natural environment and compare with our experimental results. Clams from the contaminated site were sampled in the salt marsh of Pointe-au-Père at the vicinity of the city of Rimouski (Quebec, Canada) near the sporadic urban sewage outfall.

2.2. Exposure protocol.

A complex mixture of PAHs was prepared with 0,061g of 2-methyl phenanthrene, 0,102g of naphthalene, 0,099g of 2-methylphenanthrene, 0,222g of phenanthrene, 0,102g of anthracene, 0,314g of pyrene, 0,097g of benzo-(a)-pyrene and 0,252g of fluoranthrene and added to a solution of phytoplankton (20 millions cells per mL at an output of 2 mL per min) for a final concentration of PAHs of 47,6ng/L per aquarium every day. Each aquarium was also supplied in seawater at a debit of 500 mL per min. These concentrations are representative of measures of PAHs in the St. Lawrence – Saguenay system suspended particulate matter (Curtosi and Pelletier, personal communication) and to be close to environmental parameters of this system. Thus, natural conditions were reproduced as possible as they can be and results will be considered to represent a good assessment of the environment toxicity. Clams (n=180) were placed randomly in five aquaria supplied with phytoplankton and used as controls. Contaminated animals consisted of clams placed in 5 other aquaria and fed with phytoplankton contaminated with the complex mixture of PAHs.

Organisms were exposed to PAHs during 9 days. Contamination was stopped 36 days to study the biomarkers responses during the depuration process. Control and contaminated clams (n=12, respectively) were collected randomly in each series of aquarium and organisms were replaced by control organisms from Metis Beach to keep the same biomass and filtration volume throughout the experimental period. PAHs were considered as the dependant variable between aquaria since conditions in each aquarium were similar and verified daily (temperature, flow rate of phytoplankton and of seawater) and sediments identical in all the aquaria (from Metis beach, sieved and thoroughly mixed). Randomization of sampling in Metis beach and during the

experimental protocol as well as the high number of clams sampled initially (n=360) did not guarantee avoidance of confounding but certainly made it less likely (Quinn and Keough, 2002). Clams were sampled at day 0 just before the beginning of contamination, at days 2, 5 and 9 during the contamination period and at days 17 and 45 during the depuration period. After each sampling, the organisms were placed on ice bath and brought to the laboratory for analysis. Data at day 5 were removed due to nitrogen in the circulating system of seawater just before the sampling and influenced the measures of parameters chosen. Indeed, a problem in the seawater filter was detected at the Pointe-au-Père station and has certainly caused a bias in the results of this day.

2.3. Immunologic analysis.

Hemolymph containing hemocytes was punctured from the adductor muscle of clams using a 3 mL sterile syringe with a 23G needle (Pipe et al., 1996) and kept on ice. The number and the viability of hemocytes were evaluated microscopically on a Neubauer hemacytometer with blue Trypan solution, dead hemocytes being coloured in blue.

Phagocytosis was monitored using a microplate modified cytometric method (Brousseau et al., 1998 and 2000; Fournier et al., 2002). For each organism, 100 μ L of hemolymph was placed in duplicata in a 96 well microplate. A number of approximately 30 fluorescent beads, 1.716 μ m diameter, (Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA) were added for each hemocyte. After a 230 \times g centrifugation, samples were incubated at dark 18h at room temperature. Following incubation, hemocytes were put on 3 mL of a 3% bovine serum albumine (BSA) gradient, mixed

and centrifuged 10 minutes at 110×g. Gradient and the free beads were removed by vacuum suction. Cells with phagocytised beads were mixed in 200µl of a solution including 50mL of flow cytometric solution, hemataill (Fisher, Montreal, Canada) mixed with 100mg of sodium azide and 0,250mL of formaldehyde. Acquisitions of phagocytic parameters were performed with a FACScan cytometer (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, Mountain View, CA, USA). Briefly, an air cooled argon laser was used to provide an excitation at 488nm. Fluorescent emissions emitted by the beads were collected at 520nm. Hemocyte populations were defined based on their forward (FSC) and right angle scatter (SSC) properties. A total of 10 000 events were acquired for each sample. The fluorescence (FL1) frequency distribution histogram of the hemocyte populations was obtained with the initial conditions data analysed for two parameters: the complexity (SSC) and the cell size (FSC). Data collection and analysis were performed with the LYSIS-II program (Brousseau et al., 1998). The results were expressed as the percent of phagocytic cells having engulfed one bead and more, representing the hemocytes activity, and three beads and more as a marker of efficiency of phagocytic cells.

2.4. Biochemical analysis.

The digestive gland of each organism was dissected and divided in two parts, each part was preserved and homogenised on ice in buffer (50mM potassium phosphate buffer, 1mM EDTA, pH 7.4) and in KCl buffer (154mM) for CAT and MDA analysis respectively and stored at -80°C.

The catalase activity was evaluated by following the disappearance of peroxide spectrophotometrically at a wavelength of 240 nm with a UV spectrophotometer. One

unit decomposes one micromole of H_2O_2 per minute at 25°C and pH 7.0 under the specified conditions. Results of catalase were expressed as μmol per min per mg protein. Protein concentration was determined colorometrically using the Bradford method (1976) modified at a wavelength of 595 nm. The colour reagent was purchased from BIORAD, Mississauga, ON and Bovine Serum Albumin (BSA, fraction V) from Sigma was used as the protein standard.

Concentrations of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) are an index of lipid peroxidation and oxidative stress. MDA is one of these substances and the method used 1,1,3,3-tetraethoxypropane as standard (Miller and Aust, 1989). The MDA formed was estimated spectrophotometrically at 532, 508 and 556 nm (corrected absorbance = $\text{Ab}_{532} - \text{Ab}_{508} + \text{Ab}_{556}$) and results were expressed as nmol per g wet tissue.

2.5. Statistical analysis.

The results were analysed using a statistical analyses package, SigmaStat 2.03 (Jandel, Scientific software, San Rafael, CA). The normality (Kolmogorov-Smirnov test) and the homogeneity of variance (Levene Median Test) were tested. A one way analysis of variance (ANOVA) was performed to determine differences in mean values among the two groups when the normality test passed. A non-parametric (Kruskall-Wallis) one way ANOVA was performed on data depending when the normality test failed. Significance was defined at $P < 0,05$, and when significant differences were found, a Multiple Pairwise Comparison (Tukey's test) was used to isolate the different groups (significance when $P < 0,05$). Finally, a linear regression analysis with the

Pearson's correlation coefficient was performed to illustrate possible relations between the PAHs exposure period and the biomarkers used.

3. RESULTS.

3.1. Effects of PAHs exposure on cell viability and hemocyte count.

Viability of hemocytes was above 98% for the two groups and for all samplings. For hemocyte counts (Figure 1), a slight reduction in the number of hemocytes in the contaminated group was observed during the exposure from days 2 to 17 with significant decreases at days 9 and 17. Comparison between days of exposure showed no significant differences for control and contaminated clams at days 0, 2 and 9. For control organisms, there were significant decreases between days 0 and 17 ($P=0.001$), days 2 and 17 ($P=0.031$), days 0 and 45 ($P= <0.001$), days 2 and 45 ($P= <0.001$), days 9 and 45 ($P=0.003$), and days 17 and 45 ($P=0.029$). For contaminated clams, there were significant decreases between days 0 and 17 ($P=0.013$), days 2 and 17 ($P=0.016$), days 0 and 45 ($P=0.026$), and days 2 and 45 ($P=0.040$). For the last day of the experiment, the number of contaminated hemocytes was close to the number of control hemocytes with a ratio near one.

3.2. Effects of PAHs exposure on phagocytosis.

Phagocytic activity representing the percentage of hemocytes having engulfed one bead or more is illustrated in figure 2. A significant inhibition of phagocytosis was observed for contaminated clams at days 2 and 9 during the contamination and at day 17, being 8 days after the beginning of the depuration process. Figure 3 shows efficiency of phagocytic cells represented by the percentage of cells having engulfed three beads or more. There was a significant decrease of efficiency of phagocytic cells in contaminated organisms at days 2, 9 and 17. For the fifth day, significant increases were observed in contaminated animals comparatively to days 2, 9 and 17, like for the

phagocytic activity. At the end of the experiment, the phagocytic activity of contaminated clams returned to the same level than the controls.

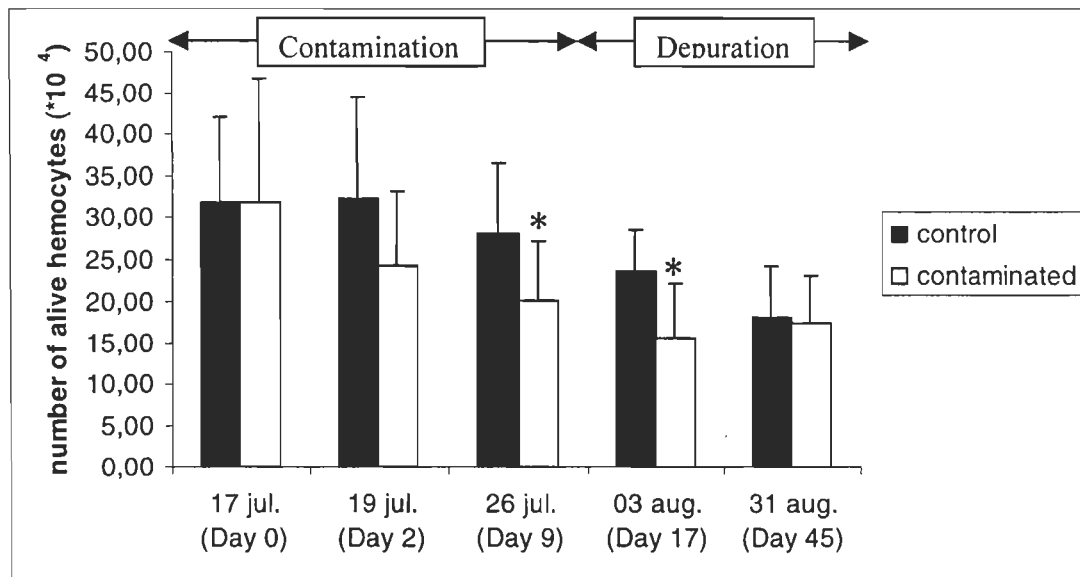


Figure 1. Effects of exposure to PAHs on the number of hemocytes. Results are expressed as the mean number of alive hemocytes (10^4) per 12 clams, in hemolymph collected from control and contaminated organisms. Organisms were exposed to PAHs during 9 days and the contamination was stopped for the remaining 36 days. Significant differences between control and contaminated clams are represented by * for $P < 0,05$. Error bars represent S.E.M.

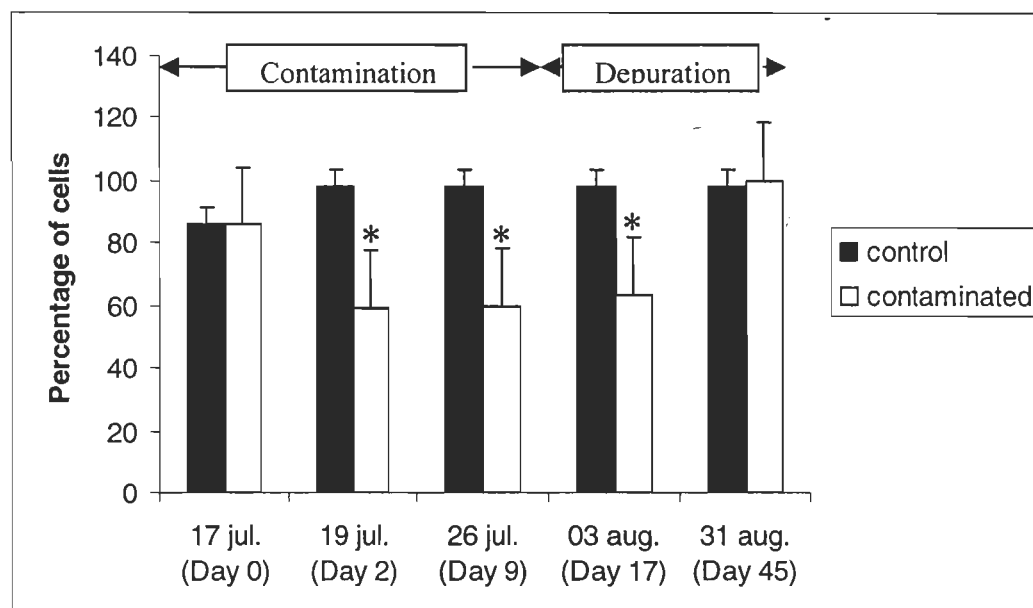


Figure 2. Effects of exposure to PAHs on phagocytic activity of hemocytes. Results are expressed as percentage of hemocytes, collected from *Mya arenaria*, having engulfed one bead or more. Organisms were exposed to PAHs during 9 days and the contamination was stopped for the remaining 36 days. Significant differences between control and contaminated clams are represented by * for $P < 0,05$. Error bars represent S.E.M.

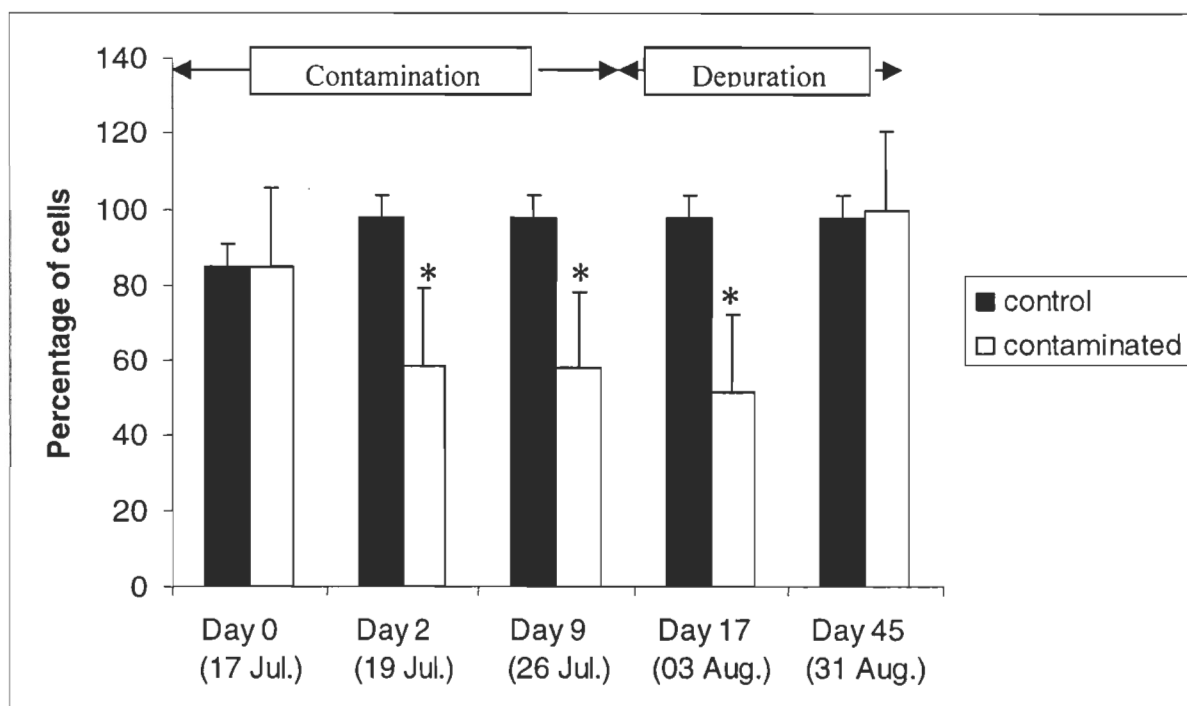


Figure 3. Effects of exposure to PAHs on the efficiency of phagocytic cells. Results are expressed as percentage of hemocytes, collected from *Mya arenaria*, having engulfed three beads or more. Organisms were exposed to PAHs during 9 days and the contamination was stopped for the remaining 36 days. Significant differences between control and contaminated clams are represented by * for $P < 0,05$. Error bars represent S.E.M.

3.3. Biochemical markers.

Catalase activity following PAHs exposure (Figure 4) showed no significant differences between control and contaminated organisms (Table 1). However, significant differences were observed between days of the experiment (Table 2).

For contaminated clams, significant increases were observed between days 0 and 9 ($P= 0,017$) and between days 2 and 9 (Kruskall-Wallis test, $H= 3,853$, $P= 0,05$) for the contamination period. During the last day of the depuration period (day 45), levels of CAT activity for contaminated clams returned near those of the both first days of the experiment, with significant decreases between days 9 and 45 ($P= 0,028$).

However, for control organisms, significant increases were noted between days 0 and 9 ($P= 0,002$), between days 0 and 17 ($P= 0,011$) and between days 2 and 9 ($P= 0,02$) while significant decreases were observed between days 9 and 45 ($P=<0,001$) and between days 17 and 45 ($P= 0,005$).

Lipid peroxidation assessed by the MDA levels (Figure 5) showed no significant differences (Table 1). For the comparison between days of the experiment (Table 3), day 2 presented significant differences with day 0 in control (Kruskall-Wallis test, $H= 5,07$, $P= 0,024$) and in contaminated ($P= 0,024$) organisms. Significant decreases were observed in control animals between days 2 and 5 ($P= < 0,001$).

For control clams in day 9, MDA levels returned to those detected in days 0 and 2. During the depuration period, MDA decreased significantly between days 0 and 17 ($P= 0,021$), days 2 and 7 ($P= 0,004$), days 0 and 45 ($P= 0,007$) and between days 2 and 45 ($P= <0,001$).

For contaminated clams, significant increases were noted between days 0 and 9 ($P= 0,017$). Significant decreases were observed during the depuration period between days 2 and 17 ($P= 0,002$), days 2 and 45 ($P= 0,002$), days 9 and 17 ($P= 0,003$) and between days 9 and 45 ($P= 0,003$) levels of MDA returning to initial levels at the end of the experimental protocol.

Samples from Pointe-au-Père and Metis beach showed no significant differences for CAT (Figure 6). The levels of CAT activity were similar for both sites.

For MDA level, among 11 sampling days, 8 of them showed significant differences between sites (Figure 7). Levels were significantly higher in the site of Metis during sampling days 2 (June the 01th) (Kruskal-Wallis test, $H= 6,604$, $P= 0,01$), 3 (June the 15th) (Kruskal-Wallis test, $H= 15,384$, $P= <0,001$), 4 (June the 30th) ($P= <0,001$), 6 (July the 28th) ($P= <0,001$), 7 (August the 10th) (Kruskal-Wallis test, $H= 14,963$, $P= <0,001$), 9 (September the 12th) ($P= <0,001$) and 11 (October the 04th) (Kruskal-Wallis test, $H= 27,539$, $P= <0,001$). For August the 26th (sample 8), levels at Metis were significantly lower than in Pointe-au-Père ($P= <0,001$).

No correlations were found using the Pearson's coefficient between PAH exposure and the biomarkers responses measured.

		CAT activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	MDA level (nmol/g tissue)	Significant difference for CAT activity	Significant difference for MDA level
17 Jul. (Day 0)	Controls	81,44 (SD= 11,88)	91,95 (SD= 18,48)	No (P=0,890)	No (P=0,109)
	Contam.	82,31 (SD= 18,19)	79,83 (SD= 17,06)		
19 Jul. (Day 2)	Controls	88,5 (SD= 5,98)	97,78 (SD= 11,82)	No (P=0,868)	No (P=0,550)
	Contam.	87,62 (SD= 17,25)	94,72 (SD= 12,82)		
26 Jul. (Day 9)	Controls	95,43 (SD= 7,45)	85,64 (SD= 18,73)	No (P=0,422)	No (P=0,099)
	Contam.	98,89 (SD= 12,66)	99,05 (SD= 19,38)		
03 Aug. (Day 17)	Controls	93,73 (SD= 9,54)	81,17 (SD= 13,66)	No (P=0,526)	No (P=0,402)
	Contam.	91 (SD= 11,19)	76,61 (SD= 12,49)		
31 Aug. (Day 45)	Controls	79,9 (SD= 11,86)	72,61 (SD= 12,51)	No (P=0,071)	No (P=0,555)
	Contam.	88,19 (SD= 9,40)	75,87 (SD= 14,12)		

Table 1. Mean values and comparison of CAT activity and MDA levels between control and contaminated organisms in the digestive gland of *Mya arenaria*. . Organisms were exposed to PAHs during 9 days and the contamination was stopped for the remaining 36 days. Significance was defined for $P < 0,005$. SD represent standard deviation.

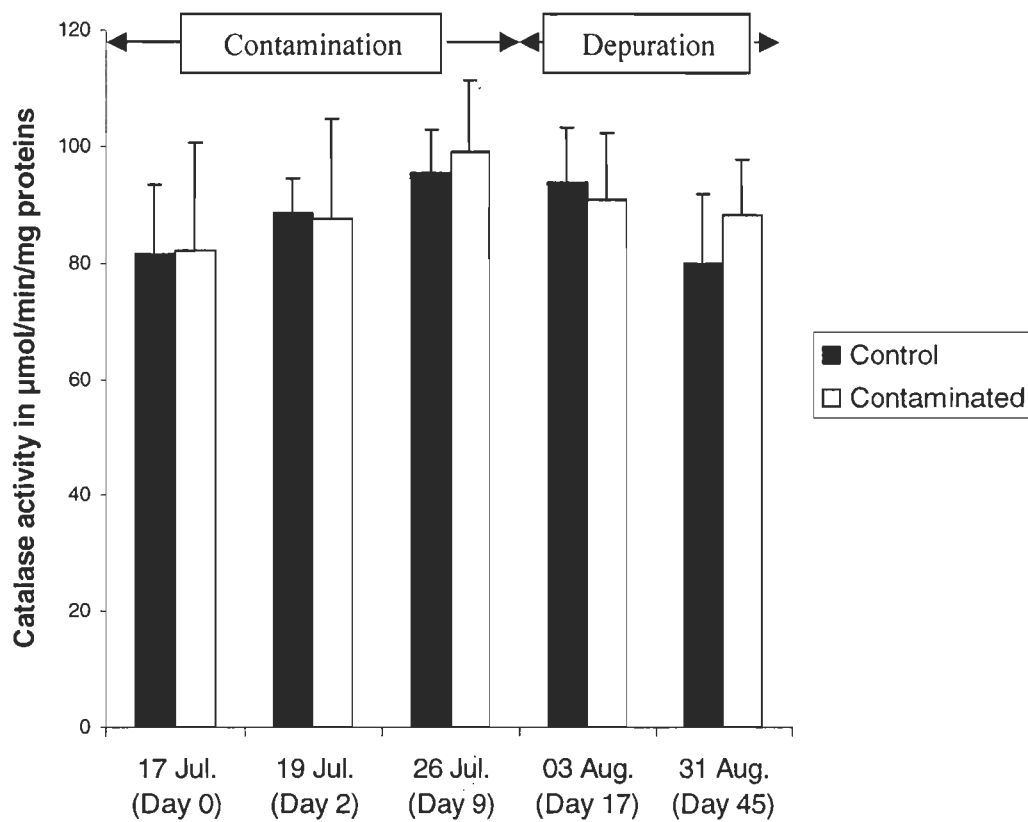


Figure 4. Effects of exposure to PAHs on catalase activity in the digestive gland of *Mya arenaria*. Results are expressed as μmol per min per mg protein. Organisms were exposed to PAHs during 9 days and the contamination was stopped for the remaining 36 days. No significant differences were observed between control and contaminated. Error bars represent S.E.M.

		CONTROL				
		17 Jul (Day 0)	19 Jul (Day 2)	26 Jul (Day 9)	03 Aug. (Day 17)	31 Aug. (Day 45)
CONTAMINATED	17 Jul (Day 0)	/	No (P=0,079)	Yes (P=0,002)	Yes (P=0,011)	No (P=0,754)
	19 Jul (Day 2)	No (P=0,471)	/	Yes (P=0,020)	No (P=0,122)	No (P=0,083)
	26 Jul (Day 9)	Yes (P=0,017)	Yes (P=0,050)	/	No (P=0,631)	Yes (P=<0,001)
	03 Aug. (Day 17)	No (P=0,173)	No (P=0,575)	No (P=0,120)	/	Yes (P=0,005)
	31 Aug. (Day 45)	No (P=0,331)	No (P=0,921)	Yes (P=0,028)	No (P=0,513)	/

Table 2. Comparison of CAT activities between control and contaminated organisms during the PAH exposure period. Organisms were exposed to PAHs during 9 days and the contamination was stopped for the remaining 36 days. Significance was defined for $P < 0,05$.

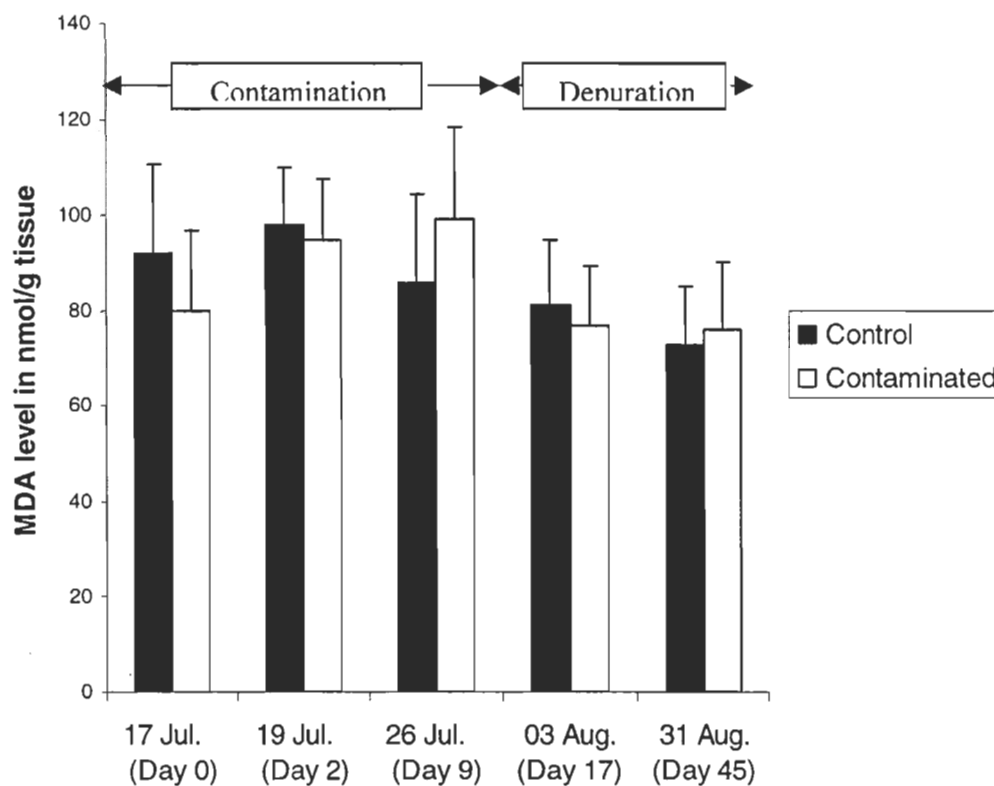


Figure 5. Effects of exposure to PAHs on MDA levels in the digestive gland of *Mya arenaria*. Results are expressed as nmol per g wet tissue. Organisms were exposed to PAHs during 9 days and the contamination was stopped for the remaining 36 days. No significant differences were observed between control and contaminated clams. Error bars represent S.E.M.

		CONTROL				
		17 Jul. (Day 0)	19 Jul. (Day 2)	26 Jul. (Day 9)	03 Aug. (Day 17)	31 Aug. (Day 45)
CONTAMINATED	17 Jul. (Day 0)	/	Yes (P=0,024)	No (P=0,415)	Yes (P=0,021)	Yes (P=0,007)
	19 Jul. (Day 2)	Yes (P=0,024)	/	No (P=0,071)	Yes (P=0,004)	Yes (P=<0,001)
	26 Jul. (Day 9)	Yes (P=0,017)	No (P=0,526)	/	No (P=0,512)	No (P=0,057)
	03 Aug. (Day 17)	No (P=0,603)	No (P=0,603)	Yes (P=0,003)	/	No (P=0,123)
	31 Aug. (Day 45)	No (P=0,542)	No (P=0,542)	Yes (P=0,003)	No (P=0,893)	/

Table 3. Comparison of MDA levels between control and contaminated organisms during the PAHs exposure period. Organisms were exposed to PAHs during 9 days and the contamination was stopped for the remaining 36 days. Significance was defined for $P < 0,05$.

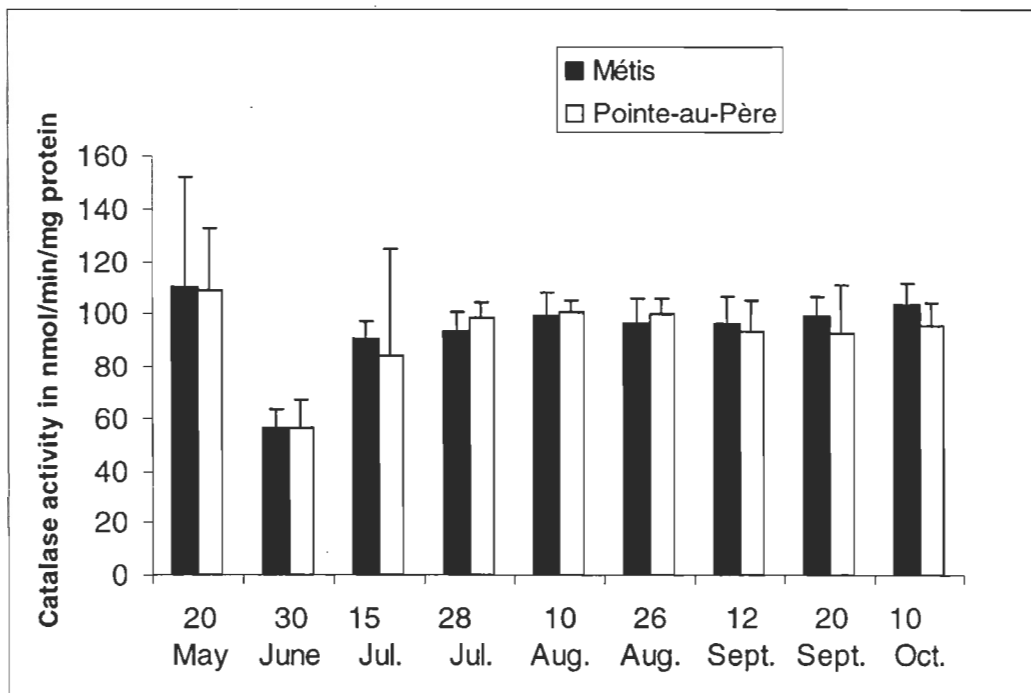


Figure 6. Catalase activity in the digestive gland of *Mya arenaria* sampled in natural environment. Results are expressed as $\mu\text{mol per min per mg protein}$. No significant differences were observed between control and contaminated clams. Error bars represent S.E.M.

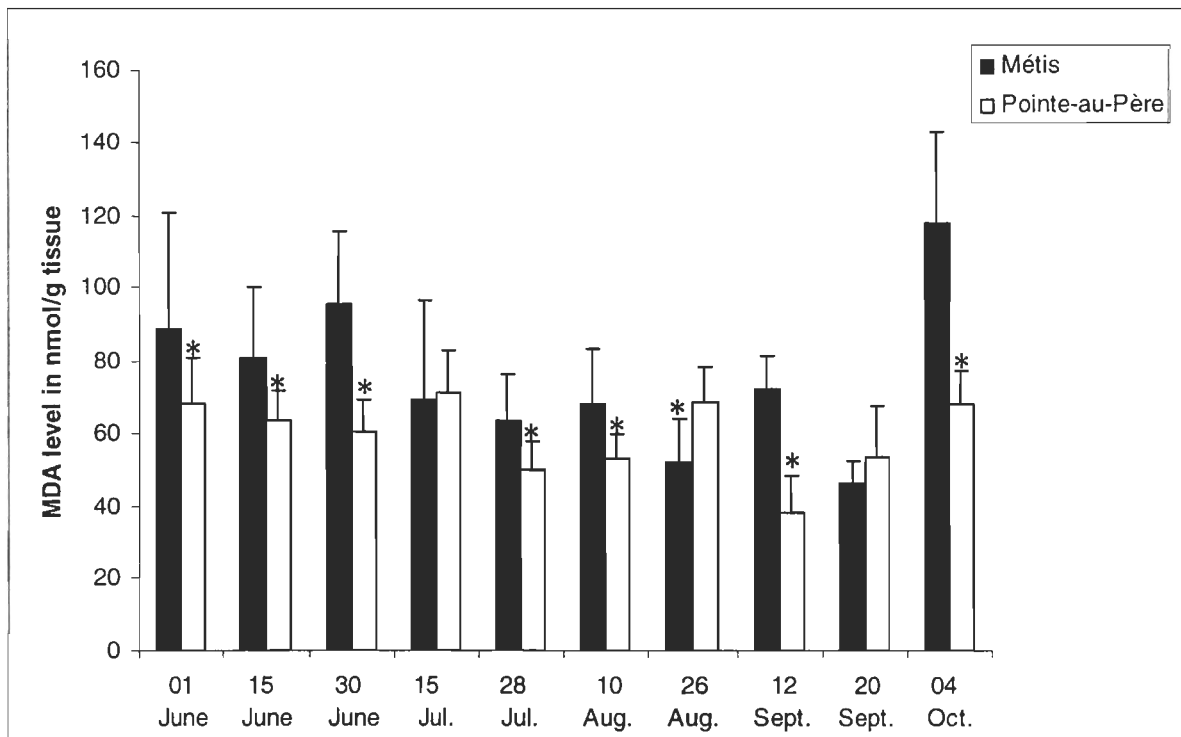


Figure 7. MDA levels in the digestive gland of *Mya arenaria* sampled in natural environment. Results are expressed as nmol per g tissue. Significant differences between control and contaminated clams are represented by * for $P < 0,05$. Error bars represent S.E.M.

4. DISCUSSION.

An increase in the number of circulating hemocytes is commonly observed in bivalves after an exposure to a large variety of environmental stressors or to toxic substances (Cheng, 1988; Renwranz, 1990; Anderson et al., 1992; Coles et al., 1994). However, other studies have reported a decrease in hemocytes counts but for higher contaminant levels not found in the natural environment (Grundy et al., 1996a). Sami et al. (1992) have shown that the count of hemocytes from American oyster *Crassostrea virginica* could be modulated following an *in situ* exposure to PAHs. In our case, significant differences were observed in days 9 and 17 between the count of hemocytes of control and contaminated organisms. A slight decrease was also observed during the exposure even though the contamination level was close to the environmental levels. There was an effect of PAHs on the number of circulating hemocytes. Interestingly, at the beginning of the experiment, no significant differences were detected between controls and contaminated until the ninth day. The hemocyte number continued to significantly decrease at day 17 in contaminated animals whilst the contamination was stopped at the ninth day. However, even if significant decreases were observed for control organism from day 17 to the end of the experiment, the hemocyte number also decreased for contaminated clams (Figure 8). For the last day of the experiment, the number of circulating hemocytes was very low comparatively to the other sampling days but the ratio contaminated hemocytes: control hemocytes was near 1. PAHs could possibly have affected directly the production of hemocytes in *Mya arenaria* but the diminution in control clams precludes from such a conclusion.

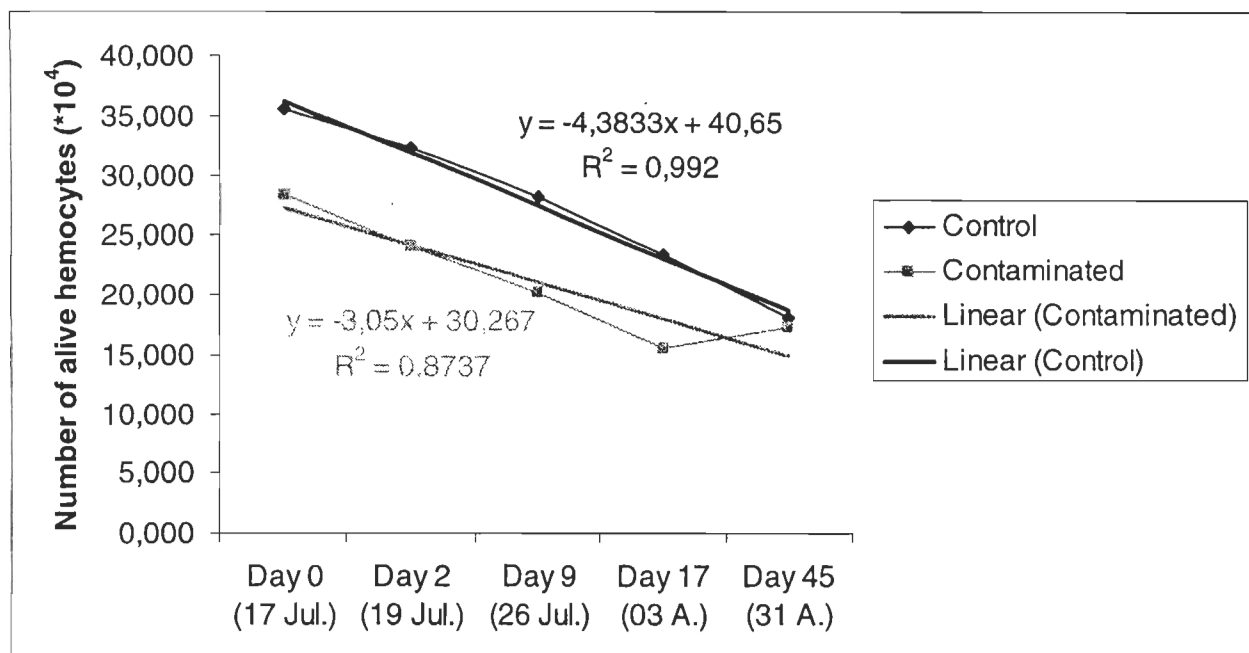


Figure 8. Mean values of alive hemocytes for control and contaminated organisms during the PAHs exposure. Organisms were exposed to PAHs during 9 days and the contamination was stopped for the remaining 36 days.

PAH exposure has been shown to significantly suppress phagocytic activity in *Mytilus edulis* (Grundy et al., 1996a and b), *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* (Fournier et al., 2002). However, long-term exposure to benzo-(a)-pyrene slightly stimulated phagocytic activity in *Mercenaria mercenaria* (Anderson, 1981). Moreover, exposure to low concentrations of PAHs may stimulate phagocytic activity whereas increasing levels could suppress phagocytosis in *Mya arenaria* (Bouchard et al., 1999; Brousseau et al., 2000; Fournier et al., 2002). Phagocytosis in bivalves exposed to PAHs tended to decrease with increasing concentrations of contaminants (Anderson et al., 1981; Mc Cormick-Ray, 1987; Grundy et al., 1996a and b; Wooton et al., 2003). In this work, a significant difference was observed just after the first day of the contamination showing the acute effects of PAHs on hemocyte activity (cells having engulfed one bead or more) and on the efficiency of phagocytosis (cells having engulfed three beads or more), this threshold assessing the more active populations of hemocytes in phagocytosis (Brousseau et al., 1998 and 2000; Bouchard et al., 1999; Fournier et al., 2000; Sauvé et al., 2002).

There were significant differences in phagocytosis between controls and contaminated clams at days 9 and 17. Day 45 showed a return to initial conditions with a percentage of cells having engulfed one bead or more and three beads or more near to 100% attesting a great efficiency. This trend showed a strong recovery of clams. PAHs caused phagocytic inhibition at concentrations near those reported in the environment. Phagocytosis is a membrane-dependent process. The most obvious explanation is that PAHs affected directly the membrane stability resulting in physical disturbance of the lysosome membrane and further disrupted immune function. Other studies have already demonstrated this reduction in the lysosomal membrane stability of hemocytes of

bivalves species like *Mytilus edulis* (Coles et al., 1995; Grundy et al., 1996a and b) and *Mya arenaria* (Brousseau et al., 2000; Fournier et al., 2002), associated with the inhibition of phagocytic activity. PAHs may also interfere within the maturation and/or differentiation processes of hemocytes (Brousseau et al., 2000). Recovery of the immune function in *Mya arenaria* during the depuration process showed that the effects of PAHs at concentrations used for this experiment were reversible.

PAHs are known to increase production of ROS leading to oxidative stress (Winston and Di Giulio, 1991). Oxidative stress results in increased levels of the CAT activity, an antioxidant enzyme used by the organism to detoxify cells (Pellerin-Massicotte, 1997). This oxidative stress can lead to cell damages caused by lipid peroxidation which can be assessed by the level of MDA (Pellerin-Massicotte, 1994; Cossu et al., 2000). In bivalves, several studies have associated the antioxidant activity with a contamination by PAHs (Livingstone et al., 1993; Garcia-Martinez et al., 1995; Cheung et al., 2004). For this work, the experiment showed no significant differences between control and contaminated organisms. However, for contaminated clams, there was a small increase in the level of CAT activity until the day 9, with significant increases between day 0 and day 9 and between day 2 and day 9. CAT activity showed that the mixture of PAHs had an effect in the organisms during the contamination but this response is not really clear due to the significant increases observed in control organisms between values of day 0 and day 9 and between values of day 2 and day 9. As for the phagocytic activity, the small increases in the CAT activity during the contamination suggested cellular damages. The activity of this antioxidant system was increased under chemical stress, but responses of CAT activity are not well defined. Thus, another antioxidant system may be involved. An increase in the level of

the superoxide dismutase enzyme was observed in bivalves as well as for catalase after an exposure by PAHs (Garcia-Martinez et al., 1995; Livingstone et al., 1993). Moreover, the superoxide dismutase works in association with the catalase, both of them showing the same trend. The most obvious possibility is that glutathion peroxidase was used to detoxify cells in presence of this complex mixture of PAHs. For the depuration process (days 17 and 45), the CAT activity presented significant decreases in contaminated clams between day 9 and day 45. The return to initial conditions was observed suggesting a recovery in clams.

MDA concentration increases generally when stress overwhelms the antioxidant systems (Aust, 1985). An increase in MDA levels was observed the second day of the experiment showing the rapid effects of an exposure by PAHs. The ninth day, MDA returned to a high level particularly for contaminated organisms. During the depuration process, levels returned to initial conditions. These results confirmed the hypothesis of the membrane destabilisation or of interference within the maturation and/or differentiation processes of hemocytes caused by PAHs as seen with the phagocytic activity. Lipid peroxidation has then occurred during the exposure. These results confirmed also the inefficiency of CAT for the detoxification of cells during exposure to PAHs. Glutathion peroxidase could be important in this case to remove ROS. The levels of CAT activity did not increase significantly but as shown by MDA levels, there were membrane damages. PAHs induced membrane destabilisation during the contamination while recuperation was observed during the depuration process. There was a little bioaccumulation in organisms during the contamination period (Richard and Pelletier, personal communication) but the capacity of clams to biotransform PAHs and to

detoxify cells during the depuration period confirmed the strong recovery potential of *Mya arenaria*.

For comparison purpose between Metis and Pointe-au-Père, CAT activity showed no significant differences. However, for the exposure experiment, the mean of CAT activity values were lower than those of the two sites. Clams exposed to PAHs in mesocosm showed a CAT activity of 90,97 nmol/min/mg protein while clams from Pointe-au-Père showed a CAT activity of 92,47 nmol/min/mg protein. Interestingly, control organisms in the exposure experiment had a CAT activity of 87,87 nmol/min/mg protein while CAT activity of organisms from Metis was of 94,19 nmol/min/mg protein. In natural environment, a greater stress was observed. Clams from the two sites were exposed to natural conditions like air exposure, temperature, tides and sunshine which can cause stress and increase CAT activity in bivalves (Pellerin-Massicotte, 1997), contrary to the stable conditions in aquaria for the exposure experiment. MDA levels were lower in natural environment comparatively to those observed in mesocosm. MDA levels were significantly higher in Metis than in Pointe-au-Père for 7 samples attesting the lipid peroxidation. In the site of Pointe-au-Père, no contamination effects appeared from our results comparatively to Metis. Higher levels of CAT activity and of MDA levels in Metis can be explained by the slope of the intertidal zone where clams were more exposed to air, wave action and variations in temperature due to on the situation of the tidal flat. The only exception was in August 26 (sample 8) where MDA levels in Metis were significantly lower because sampling occurred when the site was partially immersed due to the tidal period, and abiotic variables had less effects.

In summary, the exposure to a mixture of PAHs led to destabilisation of membranes and affected processes of hemocytes production confirmed by the immunologic results. The number of hemocytes decreased in control and contaminated organisms during the experiment even if dead cells were scarce throughout the sampling days. For the hemocytes activity and the efficiency of phagocytosis cells, the same trend was observed. A decrease for these two parameters was noted during the contamination and during the first day of the depuration process attesting of membrane damages. In the last day of the experiment recovery was observed for all the immunologic parameters measured. The results of MDA showed that the lipid peroxidation occurred following the exposure and confirmed the physiological disturbance observed for the membrane stability. The level of CAT activity did not show a great antioxidant activity but a small increase was observed during the contamination. For the measures of the oxidative stress with MDA and CAT, recuperation was also noted in spite of the bioaccumulation observed during the contamination period (Richard et al., 2005). It showed that *Mya arenaria* was able to transform PAHs used for this experiment really efficiently since after the exposure has been stopped the levels of all the parameters measured began to return to normal conditions. The results of the last day of the experiment showed a total recuperation after 36 days of depuration. However, we will have more evidence of recuperation when the measures of the metabolites released by organisms after the biotransformation of PAHs will be completed.

Results of MDA levels from organisms sampled in Pointe-au-Père showed that lipid peroxidation was lower than for the exposure experiment for contaminated clams. CAT activities and MDA levels showed a stress in clams from Metis. A higher stress in animals from Metis was observed because organisms from this site were more exposed

to environmental parameters. However, clam population in Pointe-au-Père salt marsh was evidenced as contaminated.

CHAPITRE 3:

CONCLUSION GENERALE.

Nos résultats ont démontré la pertinence de l'utilisation de l'activité catalasique, des taux de MDA et de l'activité phagocytaire en tant que biomarqueurs pour la mesure de la toxicité chez un mollusque bivalve *Mya arenaria* après une exposition à un mélange complexe de HAP. Le transfert de ces HAP dans la mye par l'intermédiaire de phytoplancton contaminé représentant les particules en suspension dans le milieu a ainsi été observé. Cela se traduit par un stress oxydatif confirmé par les résultats de l'activité catalasique même si les taux restent très faibles. Ce stress oxydatif va causer des dommages cellulaires par l'action de la peroxydation lipidique estimée par les taux de MDA. Ces dommages cellulaires ont aussi été observés par la mesure des paramètres immunologiques c'est-à-dire par le compte des hémocytes ainsi que par leur activité et par l'efficacité des cellules en phagocytose. L'hypothèse la plus probable est que ce mélange de HAP va affecter les membranes cellulaires en les déstabilisant ainsi que les processus de production des défenses immunitaires ce qui va se traduire par les modifications physiologiques observées à partir des paramètres mesurés. Au niveau des échantillonnages effectués en milieu naturel aux sites de Pointe-au-Père et de Métis, les résultats montrent pour l'activité catalasique et les taux de MDA un plus grand stress au niveau du site de Métis. Ceci peut s'expliquer par des contraintes environnementales plus élevées à Métis dues à une plus grande exposition aux facteurs abiotiques à marée basse. En comparant ces résultats à ceux obtenus en mésocosme, aucune contamination du site de Pointe-au-Père n'apparaît. Cependant les taux de MDA observés dans ces

deux sites étant plus bas que ceux obtenus en aquarium après l'exposition aux HAP laissent supposer que le cocktail de HAP utilisé pour l'exposition cause de plus grands dommages cellulaires qu'en milieu naturel. Lors de la dépuration commençant le neuvième jour après la contamination, les résultats commencent à se rapprocher des conditions initiales pour atteindre une presque totale récupération pour toutes les mesures des biomarqueurs utilisés. Cela atteste du potentiel de récupération de *Mya arenaria*, capable de retrouver un état physiologique presque normal lorsqu'il n'y a pas de polluants dans le milieu. La capacité de *Mya arenaria* à biotransformer les HAP lors de la dépuration en fait une espèce très intéressante dans le suivi d'une contamination induite par des xénobiotiques tels que les HAP. Les résultats de l'activité catalasique montrent de faibles variations non significatives chez les organismes même si ces variations témoignent d'un stress oxydatif. Il est donc possible que cette détoxification se fasse par l'intermédiaire d'autres systèmes antioxydants tel que la glutathion peroxydase. De plus, la biotransformation de ces HAP chez les myes va induire le relargage de métabolites dans le milieu qui vont ainsi pouvoir être biodisponibles pour d'autres organismes. Une bioamplification va donc être probable au niveau des chaînes trophiques à partir des particules en suspension. Une étude sur ces métabolites serait donc très appropriée pour compléter cette étude.

LISTE DES REFERENCES

- Abott, R. T., 1968. Guide des coquillages de l'Amérique du Nord. Guide d'identification sur le terrain. Broquet, Canada, Québec, 288p.
- Albers, P. H., 1995. Petroleum and individual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. pp. 330-355. In Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Burton, G. A. Jr., & Cairns, J. Jr., Handbook of ecotoxicology. Lewis, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Anderson, R. S., Giam, C., Ray, L., Tripp, M. R., 1981. Effects of environmental pollutants on immunological competency of the clam, *Mercenaria mercenaria*: impaired bacterial clearance. *Aquatic Toxicology* 1: 187-195.
- Anderson, R. S., Paynter, K. T., Bureson, E. M., 1992. Increased reactive oxygen species intermediate production by hemocytes withdraw from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus Marinus*. *Biology Bulletin* 183: 476-481.
- Aust, S. D., Morehouse, L. A., Thomas, C. E., 1985. Role of metals in oxygen radical reactions. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine* 1: 3-25.
- Bayne, B. L., Brown, D. A., Burns, K., Dixon, D. R., Ivanovici, A., Livingstone, D. R., Lowe, D. M., Moore, M. N., Stebbing, A. R. D., Widdows, J., 1985. The effects of stress and pollution on marine animals. Praeger Scientific, New York.
- Bayne, B. L., Brown, D. A., Harrison, F., Yevich, P. D., Varela, G., Webber, D. L., 1980. Mussel Health. In *The International Mussel Watch*. National Academy of Sciences, Washington, DC, pp. 163-165.
- Becker, S., Madden, M. C., Newman, S. L., Devlin, R. B., & Koren, H. S., 1995. Modulation of human alveolar macrophage properties by ozone exposure *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 110 n°3: 403-415.
- Bouchard, N., Pelletier, E., & Fournier, M., 1999. Effects of butyltin compounds on phagocytic activity of hemocytes from three marine bivalves. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 519-522.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brousseau, P., Payette, Y., Blakley, B., Boermans, H., Flipo, D., Tryphonas, H., Fournier, M., 1998. *Manual of immunological Methods*. CRC Press, Boston, USA, p-141.
- 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.
- Bryan, G. W., Gibbs, P. E., Hummerstone, L. G., & Burt, G. R., 1986. The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around South-West England: Evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biology Association (United Kingdom)* 66: 611-640.
- Camus, L., Birkely, S. R., Jones M. B., Borseth, J. F., Grosvik, B. E., Gulliksen B., Lonne, O. J., Regoli, F., Depledge, M. H., 2003. Biomarker responses and PAH uptake in *Mya truncata* following exposure to oil-contaminated sediment in an Arctic fjord (Svalbard). *The Science of the Total Environment* 308: 221-234.
- Cheng, T. C., 1988. *In vivo* effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: total and differential cell counts. *Journal of Invertebrate Pathology* 51: 207-214.
- Cheung, C. C. C., Siu, W. H. L., Richardson, B. J., De Luca-Abbott, S. B., Lam, P. K. S., 2004. Antioxidant responses to benzo-(a)-pyrene and aroclor1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna Viridis*. *Environmental Pollution* 128: 393-403.
- Cheung, C. C. C., Zheng, G. J., Li, A. M. Y., Richardson, B. J., Lam, P. K. S., 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussel, *Perna viridis*. *Aquatic Toxicology* 52: 189-203.
- Coles, J. A., Farley, S. R., Pipe, R. K., 1994. Effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 30: 367-379.
- Coles, J. A., Farley, S. R., Pipe, R. K., 1995. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Diseases of Aquatic Organisms* 22: 59-65.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.-C., & Vasseur, P., 1997. Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques. pp. 149-163. Dans Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C., Ramade, F., Biomarqueurs en Ecotoxicologie. Masson, Paris.
- Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A., & Vasseur, P., 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45: 106-121.
- Desrosiers, G., & Brethes J.-C., 1984. Etude bionomique de la communauté à *Macoma balthica* de la batture de Rimouski. *Sciences et Techniques de l'eau* 17 : 25-30.
- DiGiulio, R. T., Weashburn, P. C., Wenning, R. J., Winston, G. W, & Jewell, C. S., 1989. Biochemical responses in aquatic animals : A review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8: 1103-1123.

- DiGiulio, 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. *Aquatic Toxicology* 26: 1-22.
- D'Ischia, M., Palumbo, A., & Buzzo, F., 2000. Interactions of Nitric Oxide with Lipid Peroxidation Products under aerobic Conditions: inhibitory effects on the formation of Malondialdehyde and related thiobarbituric acid-reactive substances. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 4, n°1: 4-14.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M. C., Babut, M., & Vasseur, P., 1997. Antioxidant enzymes glutathione and lipid peroxidation of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology* 39: 93-110.
- Eyambe, G. S., 1993. Molecules in earthworm coelomic fluid that bind anti-IgA and anti-IgG but not anti-IgM. *Immunology Letters* 35: 135-140.
- Fisher, W. S., Oliver, L. M., Winstead, J. T., Long, E. R., 2000. A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminants burdens. *Aquatic Toxicology* 51: 115-138.
- Fournier, M., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Brousseau, P., 2000. Phagocytic activity as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *American Zoologist* 40: 412-420.
- Fournier, M., Pellerin, J., Clermont, Y., Morin, Y., Brousseau, P., 2001. Effects of *in vivo* exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology* 161-3: 201-211.
- Fournier, M., Pellerin, J., Lebeuf, M., Brousseau, P., Morin, Y., Cyr, D., 2002. Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes. *Aquatic Toxicology* 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. pp. 402-443. Dans Pelletier, E., Campbell, P. G. C., & Denizeau F. (Dir.), *Ecotoxicologie moléculaire, Principes fondamentaux et perspectives de développement*. Presse de l'Université du Québec, Canada, Québec.
- 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*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 131: 332-341.
- Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Blaise, C., Gagné, F., 2002. Delayed gametogenesis of *Mya arenaria* in the Saguenay Fjord (Canada): a consequence of endocrine disruptors? *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology and Pharmacology* 131-4: 457-467.

- George, S. G., 1983. Heavy metal detoxication in *Mytilus edulis* kidney: an in vitro study of Cd- and Zn-binding to isolated tertiary lysosomes. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology and Pharmacology* 76: 59-65.
- Gillardon, F., Moll, I., Michel, S., Benrath, J., Weihe, E., & Zimmermann, M., 1995. Calcitonin gene-related peptide and nitric oxide are involved in ultraviolet radiation-induced immunosuppression. *European Journal of Pharmacology*, 293 n°4: 395-400.
- Grassé, P. P., Poisson, R. A., & Tuzet, O., 1970. Précis de zoologie, I invertébrés (deuxième édition). Masson et Cie, Paris, 919p.
- 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*. *Aquatic Toxicology* 34: 273-290.
- Grundy, M. M., Ratcliffe, N. A., & Moore, M. N., 1996b. Immune inhibition in marine mussels by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research* 42: 187-190.
- Halliwell, B., 1987. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chemistry and Physics of Lipids* 44: 327-340
- Humphreys, T., Reinherz, E. L., 1994. Invertebrate immune recognition, natural immunity and the evolution of positive selection. *Immunology Today* 15: 316-320.
- Kirchoff, S., Sevigny, J.-M., Couillard, C. M., 1999. Genetic and meristic variations in the mummichog *Fundulus heteroclitus*, living in polluted and reference estuaries. *Marine Environmental Research* 47: 261-283.
- Krishnakumar, P. K., Casillas, E., Varanesi, U., 1997. Cytochemical responses in the digestive tissue of *Mytilus edulis* complex exposed to microencapsulated PAHs or PCBs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 118: 11-18.
- Law, R. J., Kelly, C. A., Nicholson, M. D., 1999. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in shellfish affected by the Sea Empress oil spill in Wales in 1996. *Polycyclic Aromatic Compounds* 17: 229-239.
- Livingstone, D. R., Garcia Martinez, P., Michel, M., Ribera, D., & Winston G. W., 1990. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis*, and other molluscs. *Functional Ecology* 4: 415-424.
- 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. *Marine Pollution Bulletin* 26 (11): 602-606.
- Livingstone, D. R., Lemaire, P., Matthews, A. A., Peters, L. D., Porte, C., Fitzpatrick, P. J., Forlin, L., Nasci, C., Fossato, V., Wootton, N., & Goldfarb, P., 1995. Assessment of the impact of organic pollutants on goby (*Zostericessor ophiocephalus*) and

- mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice lagoon, Italy: Biochemical studies. *Marine Environmental Research* 39: 235-240.
- Livingstone, D. R., Lips, F., Garcia Martinez, P., & Pipe, R. K., 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 112: 265-276.
- Mayrand, E., Pellerin-Massicotte, J., & Vincent, B., 1994. Small scale variability of biochemical indices of growth in *Mya arenaria*. *Journal of Shellfish Research* 13: 199-205.
- Mc Cormick-Ray, M. G., 1987. Hemocytes of *Mytilus edulis* affected by Prudhoe Bay crude oil emulsion. *Marine Environmental Research* 22: 107-122.
- McElroy, A. E., Farrington, J. W. & Teal, J. M., 1989. In *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1-39.
- Miller, D., Aust, S. D., 1989. Studies of ascorbate-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 271: 113-119.
- Moore, M., 1979. Cellular responses to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and phenobarbital in *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research* 2: 255-263.
- Moore, M. N., Livingstone, D. R., Widdows, J., Lowe, D.M., Pipe, R.K., 1987. Molecular, cellular and physiological effects of oil-derived hydrocarbons on molluscs and their use in impact assessment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Serie B- Biological Sciences* 316: 603-623.
- Moore, M. N., Widdows, J., Cleary, J.J., Pipe, R. K., Salkeld, P. N., Donkin, P., Farrar, S. V., Evans, S.V., Thomson, P. E., 1984. Responses of the mussel *Mytilus edulis* to copper and phenanthrene: interactive effects. *Marine Environmental Research* 14: 167-183.
- Newman, M. C., 1998. Molecular effects and Biomarkers, pp. 95-98. In *Fundamentals of Ecotoxicology*, Ann Arbor Press, Chelsea, USA.
- NOAA, 1993. Sampling and analytical methods of the National Status and Trends Program, National Benthic Surveillance and Mussel Watch Projects 1984-1992. National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Memorandum NOS ORCA 71.
- Nott, J. A., Moore, M. N., Mavin, L. J., Ryan, K. P., 1985. The fine structure of lysosomal membranes and endoplasmic reticulum in the digestive cells of *Mytilus edulis* exposed to anthracene and phenanthrene. *Marine Environmental Research* 17: 226-229.
- O'Connor, T. P., Beliaeff, B., 1995. Recent trends in coastal environmental quality: results from the Mussel Watch Project. National Status and trends Program, U.S. National Oceanic and Atmospheric Administration, Silver Spring, MD.

- Oliver, L. M., Fisher, W. S., 1999. Appraisal of prospective bivalve immunomarkers. *Biomarkers* 4: 510-530.
- Oosting, R., S., Van Rees-Verhoef, M., Verhoef, J., Van Golde, L., M., G., & Van Bree, L., 1991. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 110 n°1: 170-178.
- Pampanin, D. M., *et al.*, 2002. Air exposure and functionality of *Chamelea gallina* haemocytes: effects on haematocrit, adhesion, phagocytosis and enzyme contents. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 131: 605-614.
- Pellerin-Massicotte, J., 1994. Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *Journal of Aquatic Ecosystem 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*). *Journal de Recherche Océanographique* 22: 91-98.
- Pellerin, J., Gauthier-Clerc, S., Siah, A., Assoi-Etchian, O., 2004. Stress physiologique et perturbation endocrinienne chez les bivalves marins. pp. 350-400. Dans Pelletier, E., Campbell, P. G. C., & Denizeau F. (Editeurs), *Ecotoxicologie moléculaire, Principes fondamentaux et perspectives de développement*. Presse de l'Université du Québec, Canada, Québec.
- Phillips, D. J. H., 1986. Use of bio-indicators in monitoring conservative contaminants: Program design imperatives. *Marine Pollution Bulletin* 17: 10-17.
- Pipe, R. K., 1990. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochemical Journal* 22 (11): 595-603.
- Pipe, R. K., Coles, J. A., 1995. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunology* 5 : 581-595.
- Pipe, R. K., Coles, J. A., Thomas, M. E., Fossato, V. U., Pulsford, A. L., 1996. Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice lagoon. *Aquatic Toxicology* 32: 59-73.
- Quinn, G. P., & Keough, M. J., 2002. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 537p.
- Raftos, D. A., Briscoe, D. A., 1990. Genetic basis of histocompatibility in the solitary urochordate *Styella plicata*. *Journal of Heredity* 81: 96-100.
- Ramade, F., 1992. *Précis d'écologie*. Masson, Paris. 300 pp.
- Regoli, F., 2000. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquatic Toxicology* 50: 351-361.
- Renwrantz, L., 1990. Internal defense system of *Mytilus edulis*. In Stefano, G. B. (Ed.), *Neurobiology of Mytilus edulis*. Manchester University Press, Manchester, pp. 256-274.

- Ribera, D., Narbonne, J.-F., Michel, X., Livingstone, D. R., & O'Hara, S., 1991. Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology* 100C: 177-181.
- Rizebrough, R. W., Lappe, B. W., & Schmitt, T. T., 1976. Bioaccumulation factor of chlorinated hydrocarbons between mussel and sea water. *Marine Pollution Bulletin* 7: 225-238.
- Roitt, I. M., Brostoff, J., & Male, D. K., 1993. *Immunology*, 3e edition, Londres, Gower Medical Publ.
- Sami, S., Faisal, M., Huggett, R. J., 1992. Alterations in cytometry characteristics of hemocytes from the American Oyster *Crassostrea virginica* exposed to Polycyclic Aromatic hydrocarbon (PAH) contaminated environment. *Marine Biology* 113: 247-252.
- Sauvé, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Sénécal, L., Goudreau, P., & Fournier, M., 2002. Phagocytic of marine and freshwater bivalves : *in vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology* 58 n°3-4: 189-200.
- Schluter, S. F., Schroeder, J., Wang, E. & Marchalonis, J. J., 1994. Recognition molecules and immunoglobulin domains in invertebrates. *Annals of New York Academy of Sciences* 712, Issue 1: 74-81.
- Sies, H., 1991. Oxidative stress: introduction. In Sies, H. (Ed.), *Oxidative Stress, Oxidants and Antioxidants*. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Suresh, K., Mohandas, A., 1990. Hemolymph acid phosphatase activity pattern in copper-stressed bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology* 55: 118-125.
- 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*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 117A: 99-104.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M. N., & Orunesu, M., 1990. Heavy metals effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 97C: 37-42.
- Viarengo, A., Moore, M. N., Pertica, M., Mancinelli, G., Accomando, R., 1992. A simple procedure for evaluating the protein degradation rate in mussel tissues and its application in a study of phenanthrene effects on protein catabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 103: 27-32.
- Winston, G. W., & DiGiulio, R. T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 19:137-191.
- Winston, G. W., Moore, M. N., Straasburg, I., Kirchin, M. A., 1991. Decreased stability of digestive gland lysosomes from the common mussel *Mytilus edulis* by *in vitro* generation of oxygen-free radicals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 21: 401-408.

- Wong, S., Fournier, M., Coderre, D., Banska, W., Krzystyniak, K., 1992. Environmental Immunotoxicology. Peakall, D. (Ed.), Animal Biomarkers as Pollution Indicators. Chapman and Hall, p. 291.
- Wootton, E. C., Dyrinda, E. A., Pipe, R.K., & Ratcliffe, N. A., 2003. Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. *Aquatic Toxicology* 65 : 13-25.

ANNEXES

ANNEXE 1 :

Protocole de phagocytose en microplaque

**PROTOCOLE DE PHAGOCYTOSE EN MICROPLAQUE
POUR 100 μ L D'HÉMOLYMPHE ET UN RATIO 30 BILLES POUR 1
HÉMOCYTE**

1- 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**.

2- Pour chaque ponction d'hémolymphe faire un comptage cellulaire et une évaluation de la viabilité avec le bleu trypan dilué au 1/10 avec de l'eau désionisée.

a- dans un puits de microplaque placer 40 μ L de bleu trypan au 1/10 puis 40 μ L d'hémolymphe après avoir **remis en suspension les hémocytes** qui adhèrent à la paroi du tube de FACS.

b- déposer les hémocytes dans l'hémacymètre et attendre 1 minutes avant de faire

- **le comptage** : nombre de cellules / ml = [nombre moyen de cellules présentes dans les 25 petits carreaux X 2] X 10^4).

- **la viabilité** : pourcentage de cellules vivantes sur le nombre total de cellules comptées dans les 25 petits carrés de l'hémacymètre.

3- Ajuster la concentration cellulaire de l'hémolymphe à 1.10^6 cellules/ mL avec de l'eau de mer artificielle si nécessaire.

4- Pour chaque individu, mettre 100 μ 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.

5- **soniquer les billes** fluorescentes à l'abris de la lumière durant 5 minutes.

6- mettre un ratio de **30 billes pour un hémocyte** pour chaque échantillon.

Pour respecter ce ratio de 30, il faut 1.16 μ L de billes de 1.716 μ m de diamètre pour 500 000 cellules. Il sera donc nécessaire de diluer un petit volume de billes fluorescentes avec de l'eau de mer artificielle pour conserver le ratio [30 billes / 1 hémocytes] en ajoutant un volume minimum de 0.5 μ L de billes aux 100 μ L d'hémolymphe dans lesquels se trouveront au maximum 100 000 hémocytes.

7- Centrifuger la microplaque à $230 \times g$ pendant 5 minutes pour augmenter le contact entre les hémocytes et les billes (équilibrer la centrifugeuse avant de faire la centrifugation).

8- Recouvrir la microplaque de **parafilm et mettre à l'obscurité** dans un film de papier aluminium.

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

10- **préparer un volume suffisant de gradient et de fixateur avant la fin des 18h d'incubation. Numéroté des tubes** correspondant à chaque puits contenant chaque échantillon incubé avec les billes pour pouvoir passer les hémocytes sur le gradient de BSA après les 18 h d'incubation. Mettre **3 mL de gradient** dans chacun de ces tubes identifiés.

11- Après les 18h d'incubation remettre en suspension avec une micropipette les hémocytes incubés avec les billes dans chacun des puits. Transvaser doucement la **totalité du volume de chaque puits (100 μ L) SUR les 3 mL de gradient** de BSA du tube correspondant à l'échantillon et qui a préalablement été numéroté (étape 10).

12- centrifuger **10 minutes à $110 \times g$** (équilibrer la centrifugeuse avant de faire la centrifugation).

13- **éliminer le gradient et les billes libres** avec une aspiration par le vide et par inversion.

14- Remettre en suspension les cellules contenant les billes phagocytées (le culot) avec **200 μ L de fixateur. Conserver à 4°C avec un parafilm dessus à l'abris de la lumière** jusqu'au moment de la lecture au cytomètre. La lecture de la fluorescence doit être faire au maximum dans les 96 h qui suivent la fixation des cellules mais il est préférable de la faire le plus tôt possible et de respecter un même temps d'attente d'une expérience à l'autre pour pouvoir comparer les résultats.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS POUR LA PHAGOCYTOSE

Préparation du gradient de BSA: pour 500 mL

Le gradient se prépare la veille au soir pour être utilisé le lendemain matin ou le matin pour être utilisé dans l'après-midi et doit être conservé à 4°C jusqu'au moment de son utilisation.

Ne préparer que le volume nécessaire au nombre de tube incubés avec les billes (3 mL / tube).

500 mL d'eau de mer

15 g de BSA

Préparation 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

ANNEXE 2 :**Protocole et exemple de résultat du dosage de la Malondialdéhyde**

PROTOCOLE MDA :

Référence : Sunderman F., William Jr. *et al.*, 1985. Annals of Clinical and Laboratory Science 13 n°3 : pp.229.

La MDA est le produit secondaire de la peroxydation des lipides. Le tissu choisi : les branchies ou la glande digestive d'un mollusque bivalve. Les homogénéisations des tissus sont réalisées dans du tampon KCl à 150 mM froid. 1,0g de tissu est homogénéisé dans 10 mL de KCl ou encore dans notre cas, 0,2g dans 2 mL. Les échantillons sont ensuite gardés à -80°C.

METHODE :➤ **BLANC :**

- 1) 3,0 mL H₃PO₄ froid
- 2) 0,8 mL KCl froid
- 3) 0,2 mL d'éthanol 40% froid
- 4) Vortexer entre chaque étape

➤ **ECHANTILLONS (EN DUPLICATA) :**

- 1) 3,0 mL H₃PO₄ froid
- 2) 0,5 mL KCl froid
- 3) 0,5 mL d'homogénat de tissu
- 4) Vortexer entre chaque étape

➤ **COURBE STANDARD (EN TRIPLICATA) :**

Concentration	3,3 nM	6,6 nM	9,9 nM	13,2 nM	16,5 nM
H ₃ PO ₄	3,0 mL	3,0 mL	3,0 mL	3,0 mL	3,0 mL
KCl	0,8 mL	0,8 mL	0,8 mL	0,8 mL	0,8 mL
TEP	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL

Ajouter 1,0 mL d'acide thiobarbiturique (TBA) à chaque tube (blanc, échantillons, courbe standard) :

Mélanger au vortex

Recouvrir les tubes de papier aluminium

Placer dans un bain-marie d'eau bouillante pour 45 minutes

Refroidir les tubes dans un bain d'eau courante pendant 5 minutes

Ajouter 4,0 mL de Butanol à chaque tube, mélanger 20 secondes au vortex

Centrifuger 20 minutes à $1000 \times g$ et à 25°C l'aide d'une pipette pasteur, transférer une partie du surnageant dans des cuvettes jetables

Lire au spectrophotomètre UV à 532, 508 et 556 nm (Absorbance corrigée : $\text{Abs}_{532} - \text{Abs}_{508} + \text{Abs}_{556}$).

SOLUTIONS POUR MDA

KCl 154 mM : dissoudre 11,48 g, et compléter à 1,0 L avec de l'eau distillée. Conserver à 4°C .

Ethanol 40% (v/v) : 400 mL d'éthanol absolu, compléter à 1,0 L avec de l'eau distillée. Conserver à 4°C .

Acide phosphorique 1,0% (w/v) : 11,8 mL de H_3PO_4 (85%), compléter à 1,0 L avec de l'eau distillée. Conserver à 4°C .

Acide thiobarbiturique (TBA) 30 mM : dissoudre 3,0 g de TBA dans 500 mL d'eau distillée. Chauffer lentement pour bien dissoudre. Conserver à 4°C .

TEP solution mère standard (8,26 mM) : 0,5 mL de TEP anhydre (gravité 0,91 ; $M_w = 220,3$). Compléter à 250 mL avec de l'éthanol 40%. Conserver à 4°C pour un mois.

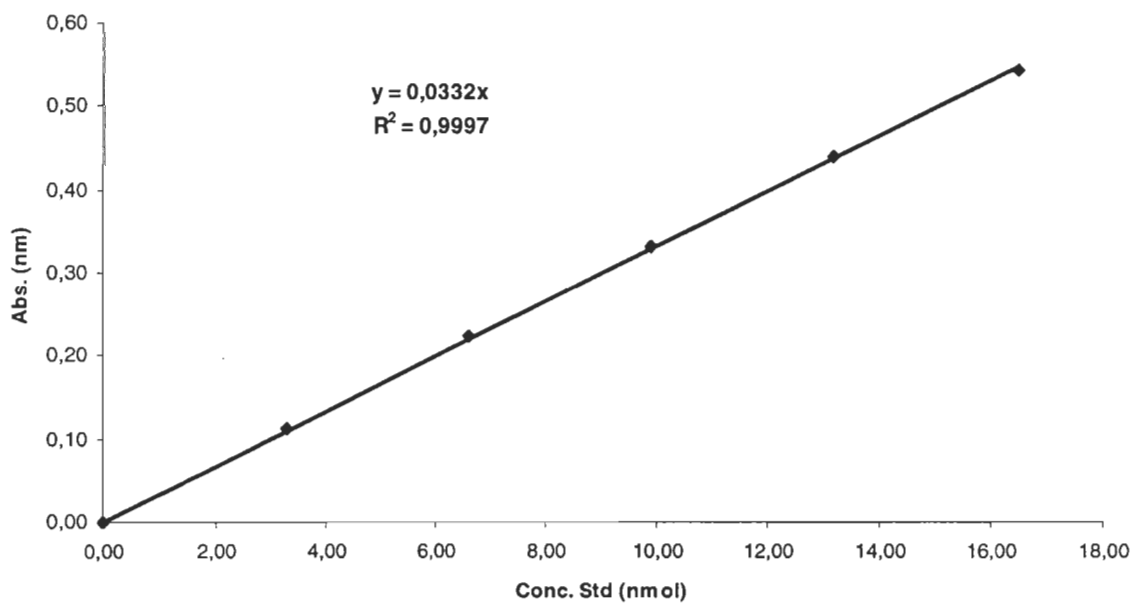
TEP courbe standard : Utiliser 5 flacons volumétriques de 25 mL et y placer les volumes suivants de solution standard mère de TEP. Compléter à 25 mL avec de l'éthanol à 40%. Conserver à 4°C pour une semaine au maximum.

Concentration	3,3 nM	6,6 nM	9,9 nM	13,2 nM	16,5 nM
Standard mère de TEP	50 μL	100 μL	150 μL	200 μL	250 μL
Ethanol 40%	24,95 mL	24,90 mL	24,85 mL	24,80 mL	24,75 mL

Courbe standard TEP pour la Malondialdéhyde (MDA), expérience d'exposition aux HAP, échantillonnage 5, 28 avril 2005.

Concentration standard TEP (mM)	Abs. (532nm)	Abs.Bkg1 (508nm)	Abs.Bkg2 (556nm)	Abs.corrigé (nm)
0	0	0	0	0
3,3	0,1401	0,038	0,0159	0,1132
6,6	0,2757	0,0749	0,0313	0,2226
9,9	0,4106	0,1116	0,0463	0,3317
13,2	0,5438	0,1477	0,0612	0,4393
16,5	0,6731	0,1829	0,0759	0,5437

Courbe étalonnage MDA (28-04-05)



**Résultats de dosage de MDA sur la glande digestive de *Mya arenaria*, expérience
d'exposition aux HAP, échantillonnage 5, 28 avril
2005.**

Échantillons	MH Totale (g)	MH 2 MDA (g)	Vol. KCl 154mM (mL)	Concentration (mg/ml)	Concentration corrigée (nmol/g de tissu)
1T	0,126	0,044	2	1,307	118,791
2T	0,19	0,065	2	1,429	87,957
3T	0,169	0,055	2	1,055	76,72
4T	0,193	0,057	2	1,159	81,333
5T	0,175	0,049	2	1,087	88,767
6T	0,232	0,082	2	1,583	77,205
7T	0,148	0,057	2	0,92	64,561
8T	0,256	0,083	2	1,712	82,511
9T	0,303	0,1	2	1,817	72,672
10T	0,36	0,123	2	2,197	71,444
11T	0,203	0,064	2	1,235	77,181
12T	0,156	0,047	2	0,88	74,928
1C	0,111	0,04	2	0,737	73,69
2C	0,19	0,065	2	1,466	90,209
3C	0,203	0,072	2	1,428	79,344
4C	0,273	0,094	2	1,997	84,974
5C	0,297	0,089	2	1,429	64,22
6C	0,218	0,077	2	1,433	74,457
7C	0,193	0,077	2	1,681	87,34
8C	0,129	0,037	2	0,632	68,292
9C	0,1	0,039	2	0,9472	97,149
10C	0,413	0,158	2	2,1337	54,018
11C	0,203	0,068	2	1,38	81,176
12C	0,292	0,086	2	1,3845	64,395

ANNEXE 3 :**Protocole et exemple de résultat pour le dosage de la catalase**

PROTOCOLE CATALASE :

La technique utilisée est celle proposée par SIGMA©

ETAPE A :

- Le tissu utilisé pour nos expériences est la glande digestive de *Mya arenaria*.
- Peser l'hépatopancréas et homogénéiser dans 2,0mL de tampon potassium-phosphate-EDTA, pH 7,4.
- Déposer dans des cupules et centrifuger 5 minutes à $12000 \times g$ à 4°C.
- Prélever 1,0 mL d'homogénat et rajouter 10,5 μ L d'éthanol 95%.
- Agiter 2 fois par inversion.
- Incuber 30minutes à 4°C.
- Ajouter 11,24 μ L de Triton X-100 (10%).
- Agiter par inversion.

ETAPE B :

- Longueur d'onde utilisée au spectrophotomètre UV : 240 nm ; utiliser des cuves en quartz.
- Standard : 2,0 mL de tampon-K-P-EDTA + 1,0 mL de solution de H₂O₂ à 15 mM, 29,8 mM et 42 mM.
- Blanc : 2,0 mL de tampon-K-P-EDTA + 1,0 mL de solution de H₂O₂ à 42 mM.
- Echantillons : 2,0 mL de tampon-K-P-EDTA + 0,95 μ L de H₂O₂ 42 mM + 50 μ L d'échantillon.
- Mesurer au spectrophotomètre pendant 180 secondes.

SOLUTIONS POUR CATALASE :

Tampon K-P-EDTA :

Dissoudre 4,354 g de K_2HPO_4 dans 500 mL d'eau distillée et 3,402g de KH_2PO_4 dans 500 mL d'eau distillée.

Ajuster le pH mètre.

Mélanger les deux solutions jusqu'à atteindre un pH de 7,4. Préparer la solution à chaque jour, conserver à 4°C.

Ajouter 0,29225 g d'EDTA 1mM à 1000 mL du tampon K-P.

Triton X-100 (10%) :

1 mL de Triton x-100 dans 9 mL de tampon K-P-EDTA.

Agiter par inversion, conserver à température ambiante.

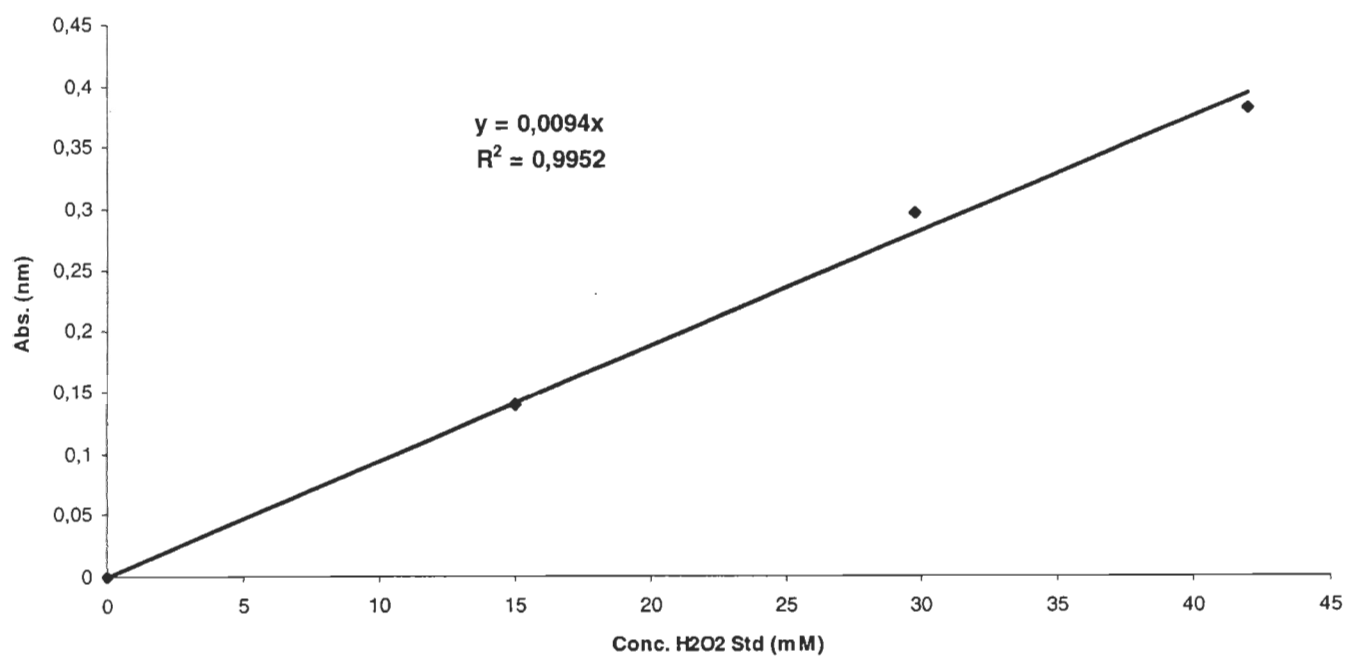
Solutions standard H₂O₂ :

Concentration H ₂ O ₂ (mM)	Volume de H ₂ O ₂ (µL)	Volume de tampon K-P-EDTA (mL)
0	0	50
15	85	50
29,8	168	50
42	238	50

COURBE STANDARD CATALASE :

Concentration H ₂ O ₂ (mM)	ABS 1	ABS 2	ABS 3	ABS 4	ABS moy
0	0	0	0	0	0
15	0,123	0,1783	0,1189	0,1396	0,13995
29,8	0,3372	0,3407	0,2585	0,2493	0,296425
42	0,461	0,4006	0,3396	0,3296	0,3827

Courbe étalonnage catalase



Résultats du dosage de la catalase sur la glande digestive de *Mya arenaria*, expérience d'exposition aux HAP, échantillonnage 1, TEMOINS.

Échantillons	MH 1 Catalase (g)	Vol. tampon phosphate 50mM (mL)	Abs. H2O2 T=0sec	Abs. H2O2 T=120sec	Abs disparue	H2O2 T=0 (mM)	H2O2 disparu (mM/min)	Nbr. Moles disparues mmoles.min	Quantité de protéines (mg)	Qté protéines dans 50µl	Activité Catalasique µmole/min/mg de protéines
1T	0,058	2,0	0,0927	-0,1902	0,1415	42	-15,05	-0,0301	26,6935	0,4449	67,647
2T	0,104	2,0	0,2458	-0,0538	0,1498	42	-15,94	-0,0319	28,5957	0,4766	66,875
3T	0,086	2,0	0,1948	-0,1549	0,1749	42	-18,60	-0,0372	26,4575	0,4410	84,366
4T	0,07	2,0	0,1644	-0,1348	0,1496	42	-15,91	-0,0318	26,5118	0,4419	72,035
5T	0,069	2,0	0,1176	-0,2089	0,1633	42	-17,37	-0,0347	24,8973	0,4150	83,706
6T	0,107	2,0	0,3053	-0,1121	0,2087	42	-22,20	-0,0444	27,6059	0,4601	96,510
7T	0,108	2,0	0,2164	-0,0660	0,1412	42	-15,02	-0,0300	27,5317	0,4589	65,472
8T	0,054	2,0	0,1201	-0,2451	0,1826	42	-19,43	-0,0389	26,1634	0,4361	89,096
9T	0,12	2,0	0,2308	-0,1330	0,1819	42	-19,35	-0,0387	27,8134	0,4636	83,489
10T	0,056	2,0	0,0946	-0,2195	0,1571	42	-16,71	-0,0334	25,8903	0,4315	77,438
11T	0,077	2,0	0,1691	-0,2361	0,2026	42	-21,55	-0,0431	25,2355	0,4206	102,490
12T	0,073	2,0	0,1924	-0,1777	0,1851	42	-19,69	-0,0394	26,8102	0,4468	88,113

Résultats du dosage de la catalase sur la glande digestive de *Mya arenaria*, expérience d'exposition aux HAP, échantillonnage 1, CONTAMINES.

Échantillons	MH 1 Catalase (g)	Vol. tampon phosphate 50mM (mL)	Abs. H2O2 T=0sec	Abs. H2O2 T=120sec	Abs disparue	H2O2 T=0 (mM)	H2O2 disparu (mM/min)	Nbr. Moles disparues mmoles.min	Quantité de protéines (mg)	Qté protéines dans 50µl	Activité Catalasique µmole/min/mg de protéines
1C	0,074	2,0	0,1611	-0,1418	0,1515	42	-16,11	-0,0322	25,6151	0,4269	75,479
2C	0,1	2,0	0,2193	-0,1793	0,1993	42	-21,20	-0,0424	27,9253	0,4654	91,109
3C	0,101	2,0	0,2610	-0,1592	0,2101	42	-22,35	-0,0447	28,9280	0,4821	92,717
4C	0,083	2,0	0,1305	-0,1474	0,1390	42	-14,78	-0,0296	26,7769	0,4463	66,245
5C	0,06	2,0	0,1176	-0,2024	0,1600	42	-17,02	-0,0340	26,6559	0,4443	76,627
6C	0,099	2,0	0,2043	-0,1199	0,1621	42	-17,24	-0,0345	28,5618	0,4760	72,452
7C	0,025	2,0	0,0335	-0,0910	0,0623	42	-6,62	-0,0132	21,2833	0,3547	37,338
8C	0,071	2,0	0,1626	-0,2191	0,1909	42	-20,30	-0,0406	26,3075	0,4385	92,612
9C	0,069	2,0	0,1062	-0,2776	0,1919	42	-20,41	-0,0408	24,5473	0,4091	99,799
10C	0,078	2,0	0,1570	-0,2359	0,1965	42	-20,90	-0,0418	26,2333	0,4372	95,599
11C	0,069	2,0	0,0883	-0,2597	0,1740	42	-18,51	-0,0370	25,9618	0,4327	85,559
12C	0,07	2,0	0,1167	-0,2879	0,2023	42	-21,52	-0,0430	25,2602	0,4210	102,238

ANNEXE 4 :**Protocole et exemple de résultat pour le dosage des protéines**

Dosage des protéines par la méthode de Bradford en microplaques

Objectifs : Dosage colorimétrique des protéines pour des concentrations de la courbe standard comprises entre 1 µg/ml et 100 µg/ml.

Matériel :

- Réactif BIO-RAD, Bio-Rad Protein Assay, #cat :500-0006
- Albumine bovine, fraction V, SIGMA #A-4503
- Fiole jaugée de 100 ml
- Tubes eppendorfs
- Pipettes de 1000 ul et 200 ul
- Agitateur magnétique
- Balance
- Lecteur de Microplaque (Spectrophotomètre)

Préparation des réactifs :

Solution mère d'albumine à 1 (mg/ml)

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

***Préparer et congeler à -20C en aliquot dans des tubes eppendorfs.**

Solutions :

- Solution mère de BSA 1 (mg/ml) (=1000µg/ml)
- H₂O 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)

Préparation des standards et des échantillons

Préparation d'une solution fille:

Dans un tube de verre propre de 5.0 ml, mettre 1600 µl H₂O et ajouter 400 µl de la solution mère de 1000 µg/ml. Agiter ensuite par vortex.

(Faire juste avant pour préparation des différents standards)

Standards

# tube	Concentrations (µg/mL)	Volume de la solution fille (µl)	Volume d'eau milli-Q (µl)
1	0	0	500
2	20	50	450
3	40	100	400
4	60	150	350
5	80	200	300
6	100	250	250

Échantillon

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:

Dilution	Volume de la dilution précédente	Volume d'eau milli-Q (µl)
30	10 µL d'échantillon	290
50	10 µL d'échantillon	490
70	10 µL d'échantillon	690
100	10 µL d'échantillon	990

Disposition sur la microplaque

- Mettre 50 µL du blanc (eau milli-Q), des standards (0 à 100 µg/mL de BSA), des échantillons et/ou de leurs dilutions respectives.
- Ajouter 250 µL de réactif de bradford dilué (1:4).
- Attendre 5 minutes.
- Lire à 595 nm.

Courbe std de protéines et dosage des protéines pour catalase, sur glande digestive de myes, expérience d'exposition aux HAP, ech6.

Date: 12-04-05

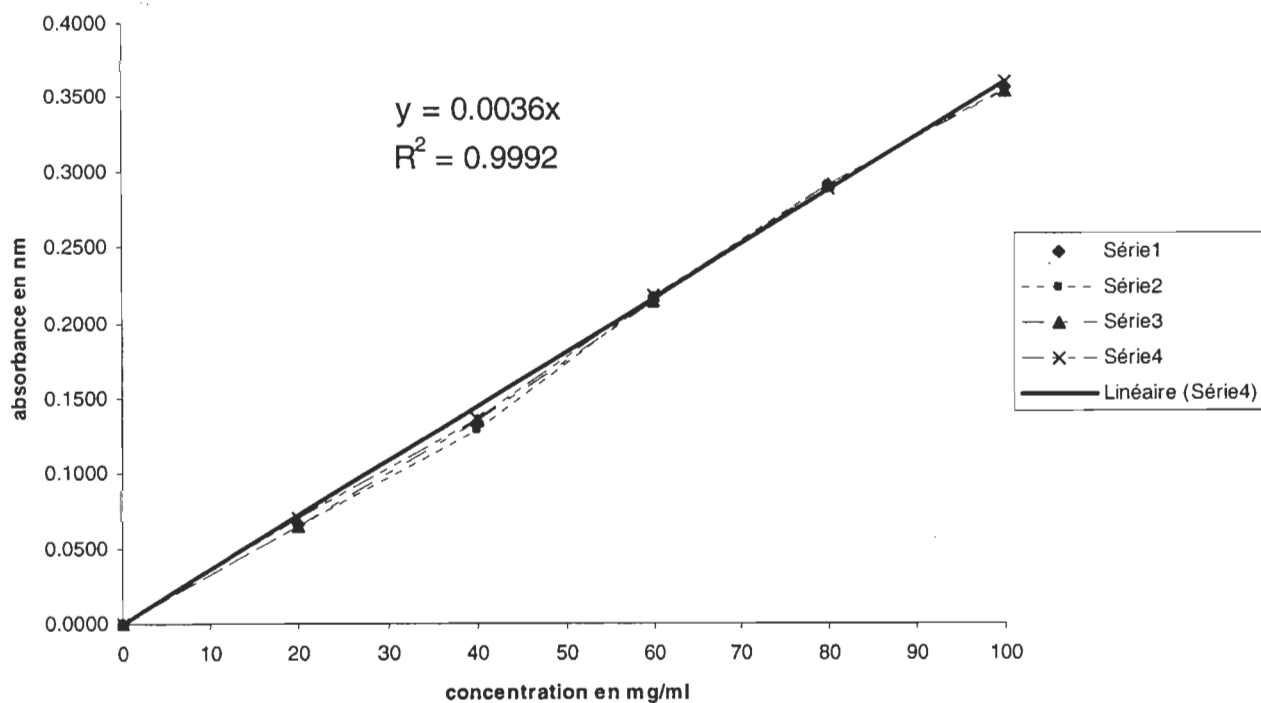
Courbe standard Protéines 20 à 100µg/ml

ug/mL	DO 1	DO 2	DO 3	Moyennes	Moyenne (-) blanc	DO 1 - blanc	DO 2 - blanc	DO 3 - blanc
0	0,4215	0,4247	0,4204	0,4222	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
20	0,4874	0,4867	0,4919	0,4887	0,0665	0,0652	0,0645	0,0697
40	0,5504	0,5566	0,5584	0,5551	0,1329	0,1282	0,1344	0,1362
60	0,6385	0,6368	0,6406	0,6386	0,2164	0,2163	0,2146	0,2184
80	0,7138	0,7136	0,7119	0,7131	0,2909	0,2916	0,2914	0,2897
100	0,7778	0,7767	0,7826	0,7790	0,3568	0,3556	0,3545	0,3604

Se retrouver pour la lecture des échantillons entre 20µg/ml et 100µg/ml.

Blanc	0,4215	0,4247	0,4204	0,4222
-------	--------	--------	--------	--------

courbe etalon proteines 12-04-05



Résultat du dosage de protéines sur la glande digestive de *Mya arenaria*, expérience d'exposition aux HAP, échantillonnage 6, 12 avril 2005.

Facteurs de dilution:	DO 1	DO 2	DO 3	ECH.	Moyennes	moins blanc	Conc (ug/ml)	Conc. (dil fact)	Conc. (mg/ml)	Vol. Hom. (ml)	Quantité Protéines (mg)	Masse de tissu (g)	Conc. (mg/g tissu)
300	0,6916	0,6822	0,6860	1T	0,6866	0,2644	42,64695	12794,086	12,794	2,0	25,588	0,072	355,39
300	0,6692	0,6586	0,6594	2T	0,6624	0,2402	38,74194	11622,581	11,623	2,0	23,245	0,068	341,84
300	0,6673	0,6517	0,6410	3T	0,6533	0,2311	37,27599	11182,796	11,183	2,0	22,366	0,066	338,87
300	0,6641	0,6601	0,6564	4T	0,6602	0,2380	38,38889	11516,667	11,517	2,0	23,033	0,059	390,40
300	0,6796	0,6771	0,6736	5T	0,6768	0,2546	41,06272	12318,817	12,319	2,0	24,638	0,094	262,10
300	0,6677	0,6683	0,6758	6T	0,6706	0,2484	40,06631	12019,892	12,020	2,0	24,040	0,063	381,58
300	0,6841	0,6745	0,6921	7T	0,6836	0,2614	42,15771	12647,312	12,647	2,0	25,295	0,07	361,35
300	0,6458	0,6486	0,6610	8T	0,6518	0,2296	37,03047	11109,140	11,109	2,0	22,218	0,069	322,00
300	0,5965	0,6100	0,6176	9T	0,6080	0,1858	29,97312	8991,935	8,992	2,0	17,984	0,039	461,12
300	0,6061	0,6275	0,6207	10T	0,6181	0,1959	31,59677	9479,032	9,479	2,0	18,958	0,045	421,29
300	0,6505	0,6404	0,6531	11T	0,6480	0,2258	36,41577	10924,731	10,925	2,0	21,849	0,053	412,25
300	0,6335	0,6491	0,6352	12T	0,6393	0,2171	35,01075	10503,226	10,503	2,0	21,006	0,061	344,37
300	0,6622	0,6640	0,6492	1C	0,6585	0,2363	38,10573	11431,720	11,432	2,0	22,863	0,092	248,52
300	0,6140	0,6486	0,6502	2C	0,6376	0,2154	34,73656	10420,968	10,421	2,0	20,842	0,063	330,82
300	0,6891	0,6947	0,6906	3C	0,6915	0,2693	43,42832	13028,495	13,028	2,0	26,057	0,142	183,50
300	0,6307	0,6391	0,6353	4C	0,6351	0,2129	34,33154	10299,462	10,299	2,0	20,599	0,052	396,13
300	0,6925	0,7025	0,7056	5C	0,7002	0,2780	44,83871	13451,613	13,452	2,0	26,903	0,14	192,17
300	0,6752	0,6708	0,6796	6C	0,6752	0,2530	40,80466	12241,398	12,241	2,0	24,483	0,105	233,17
300	0,6512	0,6316	0,6587	7C	0,6471	0,2249	36,28136	10884,409	10,884	2,0	21,769	0,063	345,54
300	0,6332	0,6415	0,6346	8C	0,6364	0,2142	34,55556	10366,667	10,367	2,0	20,733	0,073	284,02
300	0,6599	0,6648	0,6589	9C	0,6612	0,2390	38,54839	11564,516	11,565	2,0	23,129	0,092	251,40
300	0,6329	0,6326	0,6278	10C	0,6311	0,2089	33,69534	10108,602	10,109	2,0	20,217	0,052	388,79
300	0,6424	0,6330	0,6388	11C	0,6381	0,2159	34,8172	10445,161	10,445	2,0	20,890	0,057	366,50
300	0,6540	0,6427	0,6470	12C	0,6479	0,2257	36,39964	10919,892	10,920	2,0	21,840	0,046	474,78