

TD
427
1493
p44

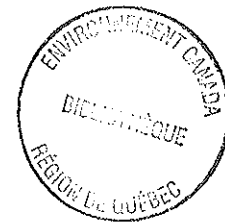
DÉVELOPPEMENT
D'UNE MÉTHODE D'ÉVALUATION
DE L'IMPACT DES HAP
SUR LES ORGANISMES AQUATIQUES

ÉMILIE PELLETIER
INRS-Océanologie

PIERRE BELAND
et NANCY BLOUIN
Institut national d'Écotoxicologie
du Saint-Laurent

INSTITUT NATIONAL
D'ÉCOTOXICOLOGIE
DU SAINT-LAURENT

ST. LAWRENCE
NATIONAL INSTITUTE
OF ECOTOXICOLOGY



soumis à:

Conservation et protection
Environnement-Canada
Région du Québec

Contrat # KA313-9-3949

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	1
LISTE DES TABLEAUX	2
1.0 INTRODUCTION.....	3
2.0 MÉTHODOLOGIE.....	5
2.1 Extraction et purification des adduits.....	5
2.2 Quantification de l'ADN.....	7
2.3 Quantification des adduits.....	7
3.0 RÉSULTATS	8
3.1 Quantification de l'ADN.....	8
3.2 Quantification des tétrois.....	10
3.3 Analyse des échantillons de bélugas.....	15
4.0 SOMMAIRE ET RECOMMANDATIONS.....	19
RÉFÉRENCES	21

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Courbe étalon pour la quantification de l'ADN par fluorescence ($\lambda_{ex.} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{émis.} = 450 \text{ nm}$).....	9
Figure 2. Chromatogrammes CLHP des tétrols analysés en fluorescence. A: Mélange contenant 100 pg chacun des 4 tétrols étalons; B: Tétrols observés dans l'échantillon de cerveau du béluga DL-3-89.....	12
Figure 3. Courbes étalons pour les quatre tétrols du benzo(a)pyrène injectés simultanément en CLHP avec détection en fluorescence ($\lambda_{ex.} = 246 \text{ nm}$, $\lambda_{émis.} = 370 \text{ nm}$).....	13

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Propriétés physiques et structurales des quatre tétrols dérivés de benzo(a)pyrène présentés selon leur ordre d'élution en CLHP.....	11
Tableau 2. Données de régression linéaire des courbes d'étalonnage des tétrols.....	14
Tableau 3. Formation d'adduits du benzo(a)pyrène sur l'ADN isolée du cerveau et du foie des bélugas du Saint-Laurent.....	16

1.0 INTRODUCTION

La présence des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans l'environnement marin a été décrite par de nombreux auteurs qui ont montré que l'activité industrielle contribuait à de fortes augmentations des HAP pyrogéniques dans les eaux et les sédiments des zones estuariennes et côtières partout à travers le monde (Colombo *et al.*, 1989; Laflamme et Hites, 1978; Lake *et al.*, 1979). La présence de fortes contaminations par les HAP a été mise en évidence dans le fjord du Saguenay (Martel *et al.*, 1986) où une aluminerie est à l'origine de rejets industriels ayant des teneurs élevées en HAP jusqu'en 1980 environ.

La présence des HAP dans les organismes vivants en milieu naturel est beaucoup moins bien documentée que dans les sédiments. Cela provient des difficultés méthodologiques que présentent l'extraction et l'identification des HAP dans les tissus organiques et du fait que la plupart des organismes sont capables de métaboliser les HAP et de les convertir en métabolites encore peu connus. De nombreuses études de laboratoire ont cependant montré que la bio-accumulation des HAP est rapide chez les invertébrés marins tels que la mye, la moule, la crevette et le polychètes (McLeese et Burridge, 1987). Ces organismes benthiques et épibenthiques peuvent constituer la base de l'alimentation de nombreux prédateurs terminaux, dont les mammifères marins. Parmi les produits d'un grand intérêt toxicologique, on note le benzo(a)pyrène, un hydrocarbure polycyclique aromatique à 5 cycles dont les propriétés cancérigènes sont re-connus depuis des

années (Hoch, Kaplan et Anderson, 1983; Lo et Sandi, 1978), et qui est toujours présent dans le groupe des HAP pyrogéniques. Malgré la grande stabilité chimique de sa structure aromatique, le composé est attaqué par des hydroxydases du système digestif et l'un des cycles terminaux perd son aromaticité pour permettre l'addition de quatre groupements hydroxyles en positions 7, 8, 9 et 10.

L'intérêt considérable des travaux de Lee Shugart et de ses collaborateurs au Laboratoire National Oak Ridge (TN) est la possibilité d'extraire et de quantifier les métabolites du benzo(a)pyrène (BaP) attachés aux molécules d'ADN d'un tissu contaminé. L'idée d'étendre ces travaux à des organismes évoluant en milieu naturel marin (Martineau *et al.*, 1988) ouvre une nouvelle avenue à l'écotoxicologie des communautés marines.

Les objectifs de ce projet sont les suivants:

- 1) Adaptation et mise au point de la méthode de caractérisation et de quantification des adduits de BaP développée par Shugart *et al.* (1983);
- 2) Quantification de l'ADN des tissus analysés pour les adduits de BaP;
- 3) Réalisation de quelques analyses d'adduits de BaP sur des tissus de bélugas (*Delphinapterus leucas*) du Saint-Laurent.

Le présent rapport décrit en détail la méthodologie utilisée ainsi que les résultats obtenus sur divers échantillons de cerveau et de foie de bélugas. Enfin, quelques recommandations sont émises sur la poursuite des travaux en vue du développement d'une méthode plus générale des adduits des HAP sur les mammifères marins.

2.0 METHODOLOGIE

2.1 Extraction et purification des adduits

Une quantité de tissu (100 à 200 mg) est homogénéisée dans 3 ml de NH_4OH et placée dans un tube à réaction en présence de 10 mg de pronase dans une solution tampon contenant 20 mM de Tris-HCl à pH 7,8, 20 mM NaCl, 1 mM de EDTA et 0,1% SDS (sulfate de lauryle). La solution est incubée à 50 °C avec agitation continue pendant 4 h. Le contenu du tube est transféré dans un tube à centrifugation avec bouchon à vis avec 1 ml de tampon Tris-HCl (0,1 M à pH 8) et la solution est ensuite extraite avec 3 ml du mélange CIP (chloroforme: alcool isoamylique: phénol en proportion 24:1:25 [v/v]) avec un agitateur rotatif pendant 30 minutes. Les deux phases sont séparées par centrifugation (Beckman modèle J21-C, 5 min. à 1000 rpm à 4 °C). La phase aqueuse est réextraite avec 3 ml de CIP comme précédemment et conservée à l'abri de la lumière. Les deux phases CIP sont combinées et extraites en retour avec 1 ml de tampon Tris-HCl (0,1 M à pH 8). Les phases CIP sont jetées tandis que les phases aqueuses sont combinées et extraites 3 fois à température ambiante avec 1,5 ml

d'éther éthylique à chaque fois, et 2 fois avec 1.5 ml et acétate d'éthyle. Après chaque extraction, les phases sont séparées par centrifugation et la phase organique est jetée. A chacun des ml de phase aqueuse récupérée (~14 ml) sont ajoutés 177 µl de tétrahydrochlorure de spermine (0,1 M), la solution est agitée vigoureusement et ensuite laissée au repos à 4 °C pendant 2 h. Le précipité d'ADN est récupéré par centrifugation à 10 000 rpm à 4 °C pendant 30 min et remis en suspension dans 1 ml d'un tampon phosphate de sodium (5 mM à pH 7,1) contenant 50 mM NaCl et maintenu à 80 °C pendant 30 min. Le contenu est transféré dans un microtube de polypropylène à capuchon et la précipitation à la spermine est répétée une deuxième fois. L'ADN est récupérée par centrifugation (Beckman microfuge B: 11 000 rpm pendant 10 min à température ambiante) et le précipité est lavé 3 fois avec 1 ml d'une solution d'acétate de sodium (0,3 M) et d'acétate de magnésium (10 mM) contenant 75% d'éthanol. Enfin, le précipité d'ADN est resuspendu dans le tampon phosphate (pH 7,1 avec 50 mM NaCl) et conservé à 4 °C.

Un aliquot de 180 µl de la solution d'ADN est transféré dans un microtube de polypropylène; 10 ml de HCl (1,2 N) sont ajoutés et le mélange est placé dans un four à 80 °C pendant 6 h.

L'échantillon d'ADN hydrolysé est dilué à 3 ml de méthanol 20% et passé sur une microcolonne Sep-Pak C18 préalablement activée avec 6 ml d'eau déionisée. La microcolonne est lavée deux fois avec 3 ml de méthanol 20% à chaque fois. Les tétrols sont récupérés avec 2 ml de méthanol 100%. Le volume de l'échantillon est réduit à 0,5 ml

et immédiatement soumis à l'analyse par chromatographie liquide à haute pression (CLHP).

2.2 Quantification de l'ADN

Un aliquot de 100 μ l de la suspension d'ADN extraite est ajouté dans un tube à réaction contenant 100 μ l de NaCl (25 mM), 5 μ l de SDS (0,2% dans l'EDTA 2 mM), 3 ml du tampon phosphate de potassium (0,2 M à pH 6,9) et 3 ml du colorant Hoechst 33258 (1mg/ml). La solution est mélangée au Vortex et gardée au noir pendant 15 min. La fluorescence de l'échantillon est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre Perkin-Elmer modèle MPF-44A (λ excitation = 360 nm, λ émission = 450 nm). La solution étalon d'ADN est préparée à partir d'ADN de thymus de veau (Sigma)^R dans le milieu réactionnel décrit ci-haut.

2.3 Quantification des adduits

Les adduits purifiés sont séparés et quantifiés par chromatographie liquide à haute pression (CLHP) utilisant une pompe Waters 610 et un détecteur en fluorescence Waters 470 (λ excitation = 246 nm, λ émission = 370 nm). Le système est opéré par un contrôleur de débit Waters 600E couplé à un module d'acquisition de données Waters 746. Une colonne Nova-Pak C18 (150 X 3,9 mm) précédée d'une pré-colonne Guard Pak C18 a été utilisée à un débit de 1 ml/min. La colonne a été maintenue à 50 °C à l'aide d'un chauffe-colonne Eldex.

Après injection, l'élution est effectuée en mode isocratique avec un mélange 50% méthanol dans l'eau (v/v).

Les étalons tétrols (benzo(a)pyrène tétrahydrotétrols) ont été obtenus du Midwest Research Institute (Missouri) sous forme de poudre blanche entièrement soluble dans le méthanol. Chacun des étalons a été préparé de façon à obtenir une courbe d'étalonnage entre zéro et 100 pg par 15 µl de solution injectée.

3.0 RÉSULTATS

3.1 Quantification de l'ADN

La méthode de quantification de l'ADN est celle de Kanter et Schwartz (1982) telle que modifiée par Shugart (1988) pour l'analyse de l'ADN dans les foies de diverses espèces de poissons. Cette méthode est simple, rapide et la linéarité de la courbe d'étalonnage est très bonne, entre 10 et 50 µg/ml (Figure 1). Le coefficient de corrélation (r^2) est de 0,987 et la pente est de 6,07 unités de fluorescence par mg d'ADN mesurée.

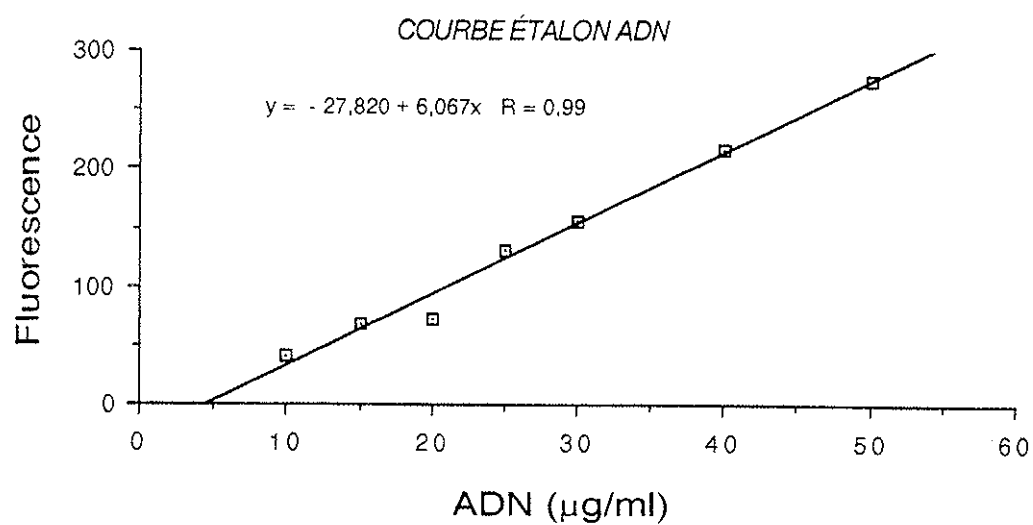


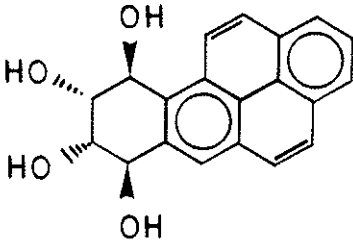
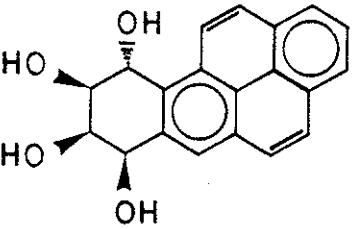
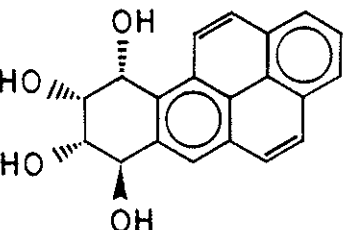
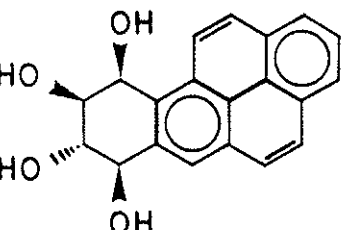
Figure 1. Courbe-étalon pour la quantification de l'ADN par fluorescence (λ_{ex} =360 nm; $\lambda_{\text{émis.}}$ =450 nm).

3.2 Quantification des tétrols

Les principales caractéristiques physico-chimiques et structurales des quatre tétrols utilisés dans ce travail sont données au Tableau 1. Les quatre composés ont le même poids moléculaire et la même formule chimique, $C_{20}H_{16}O_4$, et diffèrent seulement par la position spatiale des quatre groupements hydroxyles par rapport au plan de la molécule. Il s'agit de quatre isomères de structure dont les propriétés physiques et chimiques sont suffisamment différentes pour permettre leur séparation en chromatographie liquide (Rahn *et al.*, 1982). La Figure 2 montre un exemple de chromatogramme CLHP pour un mélange équimolaire des quatre tétrols élués selon l'ordre présenté au Tableau 1. La séparation entre les composés b et c est incomplète, mais demeure suffisante pour permettre une quantification individuelle des composés. La largeur des pics à mi-hauteur est anormalement grande, ce qui semble indiquer une résolution médiocre possiblement dû au mode isocratique d'élution. A cause de la très grande sensibilité du détecteur en fluorescence, des quantités ≤ 1 pg/ μ l injecté de chacun des tétrols peuvent être mesurées.

Les courbes d'étalonnage des quatre composés apparaissent à la Figure 3. Les données de régression linéaire de ces courbes apparaissent au Tableau 2. Dans l'ensemble, on observe une très bonne linéarité des quatre étalonnages entre 1 et 7 pg / μ l injecté avec des coefficients de corrélation (r^2) jamais inférieurs à 0,94. Le changement des pentes est lié aux propriétés spectrophotométriques des composés

Tableau 1. Propriétés physiques et structurales des quatre tétrols dérivés de benzo(a)pyrène présentés selon leur ordre d'élution en CLHP.

TÉTROL	STRUCTURE	POINT DE FUSION (°C)	EPSILON*
B(a)p -r-7,t-8,9,c-10-Tétrahydrotétrol		233-234	45 400
B(a)p -r-7,t-8,c-9,t-10-tétrahydrotétrol		204-205	47 200
B(a)p -r-7,t-8,9,10-tétrahydrotétrol		-	49 100
B(a)p -r-7,t-8,c-9,10-tétrahydrotétrol		247-248	48 200

* Valeur du coefficient d'extinction (ϵ) mesuré à 343 nm dans l'éthanol 95%.

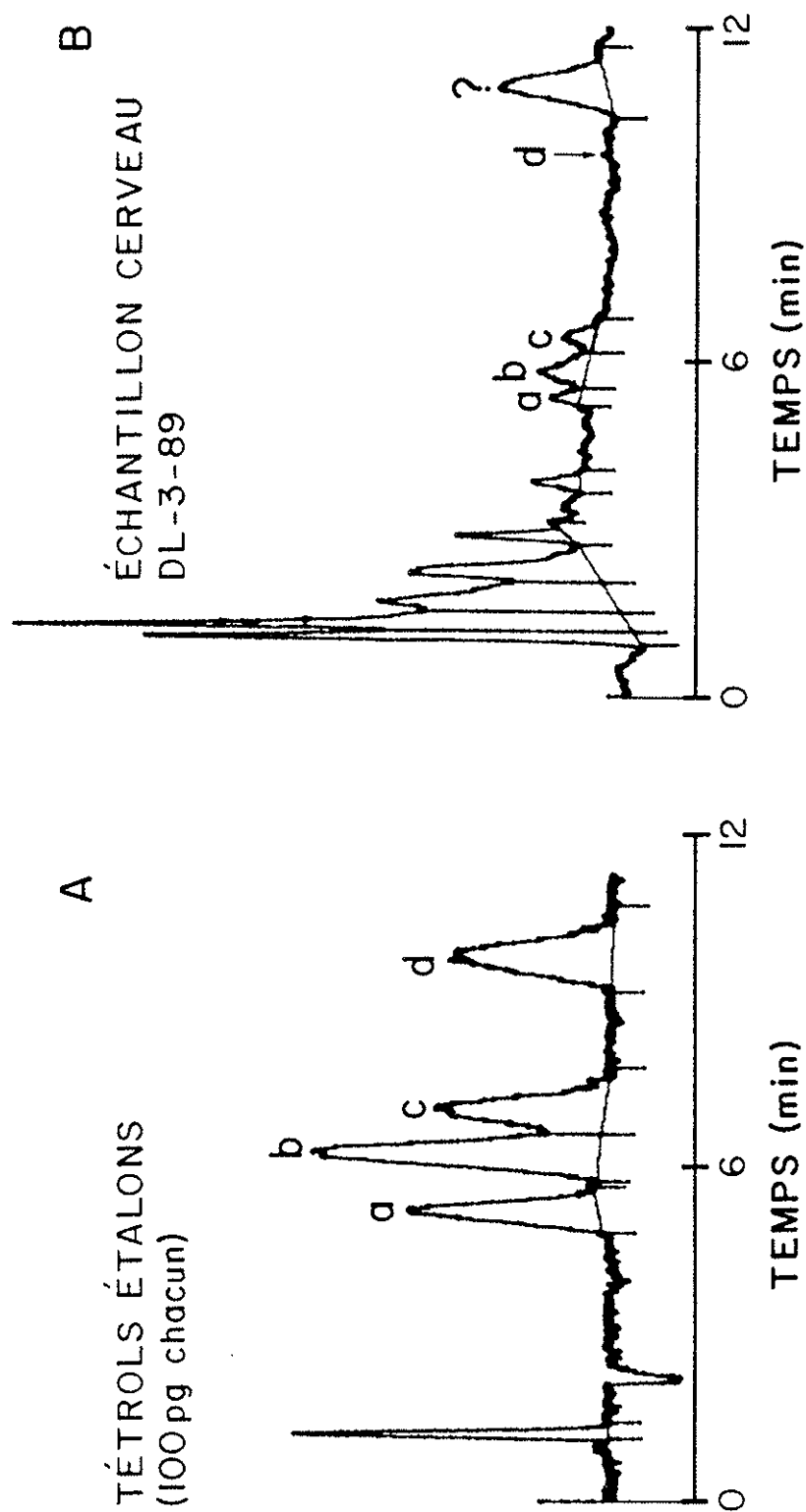


Figure 2. Chromatogrammes CLHP des tétrols de benzo(a)pyrène analysés en fluorescence.
 A: Mélange contenant 100 pg chacun des quatre tétrols étalons;
 B: Tétrols observés dans l'échantillon de cerveau du béluga DL-3-89.

COURBES ÉTALONS TÉTROLS

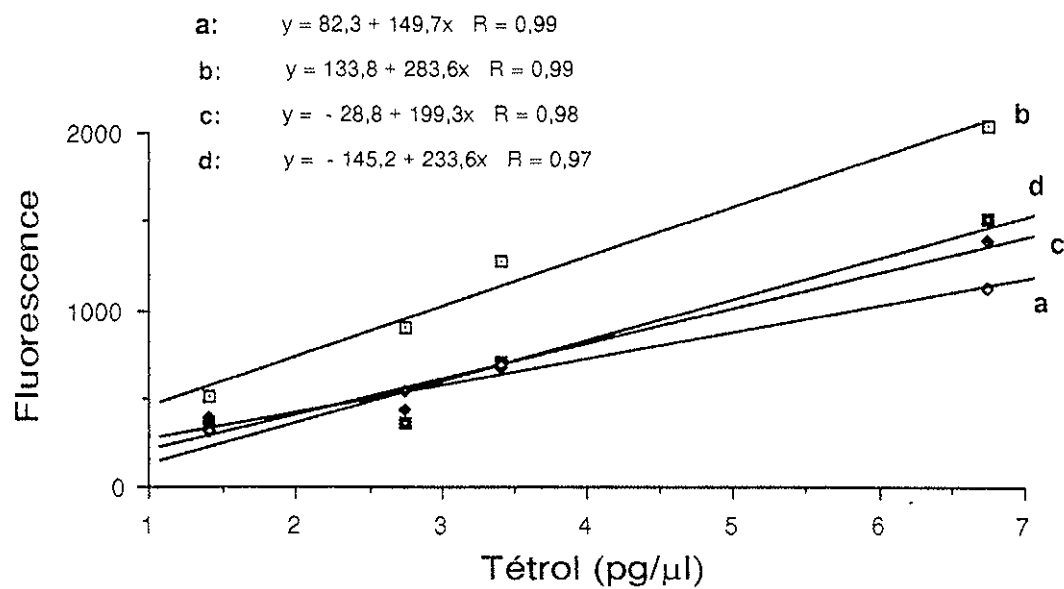


Figure 3. Courbes d'étalonnage des quatre tétrols (a, b, c, d) de benzo(a)pyrène injectés simultanément en CLHP ($\lambda_{ex.}=246$ nm; $\lambda_{émis.}=370$ nm).

Tableau 2. Données de régression linéaire des courbes d'étalonnage des tétrols.

TÉTROL	PENTE ¹	ORDONNEE A L'ORIGINE ²	COEFFICIENT COOR. (R ²)
a	10,0	82	0,988
b	18,9	134	0.979
c	13,3	-29	0,959
d	15,6	-145	0.945

¹ Unité de fluorescence par pg/μl

² Unité de fluorescence

qui ont des coefficients d'extinction différents à cause de leurs différences de structure moléculaire. Ainsi, pour une même quantité injectée, le tétról b donne une réponse presque deux fois plus grande que celle du tétról a. Les ordonnées à l'origine devraient normalement être égales à zéro puisque l'absence de tétról dans les témoins donnent effectivement une absence de réponse. Les différences d'ordonnée à l'origine sont dues à l'erreur d'estimation sur les droites induite principalement par le nombre restreint de valeurs utilisées pour l'étalonnage. Cette erreur est mineure et n'induit pas de problèmes majeurs dans la quantification des tétróls. Enfin, notons que le problème fréquent en spectrofluorométrie de l'atténuation mutuelle (quenching) de plusieurs composés qui fluorescent en même temps dans une solution est aussi présent chez les tétróls étudiés. Ce problème est contourné, au moins en partie, en établissant toujours les courbes d'étalonnage des quatre composés simultanément dans une même série d'injections. En posant l'hypothèse que les tétróls se trouvant dans les échantillons naturels auront le même effet d'atténuation mutuelle que celui des étalons, l'effet global sur la quantification est donc nul.

3.3 Analyse des échantillons de bélugas

Huit échantillons de cerveau et 6 échantillons de foie provenant de 9 bélugas échoués en 1988 et 1989 ont été analysés pour leur contenu en ADN et en tétróls associés à l'ADN. Les principaux résultats sont présentés au Tableau 3. En général, la concentration d'adduits

Tableau 3. Formation d'adduits du benzo(a)pyrène
sur l'ADN isolée du cerveau et du foie
des bélugas du Saint-Laurent.

ANIMAL	SEXE	AGE (an)	ADDUITS CERVEAU (ng/g ADN)	ADDUITS FOIE (ng/g ADN)
4-8	F	21+	~8 600 ¹	710
7-88	M	19+	~1 200 ¹	360
8-88	M	20+	~2 000 ¹	1 320
12-88	F	16	~8 600 ¹	35
3-89	F	19+	430	-
4-89	F	14	-	780
6-89	F	25+	540	-
7-89	M	29+	1 290	3 290
8-89	M	20+	n.d. ²	-
2-86	M	22.5	206 ³	-

¹ Quantité d'ADN extraite inférieure à 200 µg/ml d'échantillon

² Sous la limite de détection

³ Résultat tiré de Martineau *et al.*

retrouvée dans le cerveau est plus élevée que dans le foie. A titre comparatif, l'échantillon de cerveau de l'animal DL-2-86 analysé par le laboratoire du Dr Lee Shugart et rapporté par Martineau *et al.* (1988) contenait une quantité inférieure d'adduits à celles retrouvée dans les bélugas analysés dans notre laboratoire. L'une des raisons pour lesquelles nos résultats devraient être plus élevés que ceux de Shugart est précisément la méthode de quantification. Nous rapportons, au Tableau 3, la somme de tous les tétrols détectables alors que Shugart rapporte seulement la concentration du tétrol a (Shugart *et al.* 1983). Comme les tétrols sont présents en des proportions variables, il est impossible d'établir une comparaison directe entre les deux séries de résultats.

Un chromatogramme typique est présenté à la Figure 2 et montre dans ce cas que les tétrols a, b et c sont présents et quantifiables alors que le tétrol d est absent. Un pic non identifié ayant un temps de rétention un peu supérieur à celui du tétrol d apparaît dans la majorité des chromatogrammes. Ces chromatogrammes sont similaires à ceux publiés par Shugart *et al.* (1983) pour des extraits d'adduits sur l'ADN de souris. Deux essais d'extraction sur du foie de boeuf n'ont pas permis de détecter la présence des adduits; cependant, les chromatogrammes étaient fortement chargés de pics non identifiés et absents des chromatogrammes de foies de bélugas.

Le principal problème rencontré au cours du protocole d'extraction est la très faible quantité d'ADN précipitée par la spermine dans plusieurs échantillons de cerveau. Alors qu'il a été possible d'extraire

6 800 μg d'ADN/ml de l'échantillon de foie de boeuf, et jusqu'à 5 000 μg d'ADN par ml de foie de béluga, plusieurs échantillons de cerveaux de bélugas ont fourni moins de 200 μg d'ADN/ml (voir Tableau 3). Ces très faibles quantités d'ADN ne fournissent que des quantités infimes d'adduits augmentant d'autant l'incertitude sur leur quantification par CLHP. Cette faible précipitation d'ADN du cerveau pourrait être liée à la détérioration plus ou moins avancée des tissus cervicaux pendant la période entre la mort de l'animal et son autopsie. Cependant, la même observation ne semble pas s'appliquer aux foies des bélugas où le rendement en ADN est généralement suffisant pour réaliser les analyses. Enfin, il est possible que la méthode à la spermine ne soit pas la plus efficace en la circonstance et il sera nécessaire d'explorer d'autres méthodes disponibles.

Un deuxième problème fréquemment rencontré au cours du protocole est la faible solubilité des extraits d'adduits dans le mélange méthanol: eau utilisé pour la séparation sur CLHP. On observe souvent la formation de granules blancs au moment de la réduction du volume de l'échantillon juste avant l'injection sur la colonne CLHP. Ce précipité bloque partiellement la colonne de garde, induit une augmentation de la pression de l'éluant et modifie les temps de rétention des tétrols. Enfin, nous avons noté que les pics des tétrols sont larges et relativement mal résolus, ce qui indique un problème général de la qualité de la séparation probablement lié au mélange de solvants utilisés et au mode isocratique d'élution.

4.0 SOMMAIRE ET RECOMMANDATIONS

Dans son ensemble, la méthode d'extraction et de quantification des adduits du benzo(a)pyrène sur l'ADN développée par Shugart *et al.* (1983) pour des souris de laboratoire a été appliquée avec succès sur des tissus de foie et de cerveau de bélugas du Saint-Laurent. Cependant, certaines étapes du protocole d'extraction de l'ADN ainsi que la quantification par CLHP devront être révisées et améliorées avant d'en faire une méthode de routine. La méthode ne comporte aucune difficulté technique importante et requiert des équipements de base normalement présents dans un laboratoire d'analyse chimique et biochimique. Les résultats obtenus au cours de ce projet sont trop fragmentaires pour être discutés pour leur signification toxicologique ou environnementale, mais une tendance semble malgré tout se dessiner en faveur d'une présence plus importante des adduits dans l'ADN du cerveau que dans celui du foie.

L'ensemble des travaux réalisés au cours de ce projet nous amène à formuler les quelques recommandations suivantes:

- 1) La méthode des adduits est utilisable chez les bélugas du Saint-Laurent et devrait être incluse dans un programme écotoxicologique sur les mammifères marins du Saint-Laurent;

- 2) Le protocole doit être révisé et adapté plus spécifiquement aux tissus de cerveau et de foie des bélugas notamment au niveau de l'extraction de l'ADN et de la séparation chromatographique sur CLHP;
- 3) Une recherche sur d'autres adduits des hydrocarbures aromatiques tels que le pyrène, le chrysène et le benzo anthracène devrait être entreprise selon une méthode similaire à celle utilisée dans ce travail.

RÉFÉRENCES

- COLOMBO, J.C., E. Pelletier, C. Brochu, M. Khalil et J.A. Cataggio, 1989.
Determination of hydrocarbon sources using n-alkane and polyaromatic hydrocarbon distribution indexes. Case study: Rio de la Plata Estuary, Argentina. Environ. Sci. Technol. 23:888-894.
- HOEL, D, Kaplan, N., Anderson M., 1983. Implication of nonlinear kinetics on risk estimation in carcinogenesis. Science 219:1032.
- LAFLAMME, R.E. et R.A. Hites, 1978. The global distribution of polyaromatic hydrocarbons in recent sediments. Geochim. Cosmochim. Acta 42:289-303.
- LAKE, J.L., C. Norwood, C. Dimock et R. Bowen, 1979. Origins of polycyclic aromatic hydrocarbons in estuarine sediments. Geochim. Cosmochim. Acta 43:1847-1854.
- LO, M.T. et E. Sandi, 1978. Polycyclic aromatic hydrocarbons (polynuclears) in foods. Residue Reviews 169:35-86.
- MARTINEAU, D., A. Lagacé, P. Béland, R. Higgins, D. Armstrong et L.R. Shugart, 1988. Pathology of stranded beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence Estuary, Quebec, Canada. J. Comp. Pathol. 98: 287-311.

- McLEESE, D.W. and L.E. Burrige, 1987. Comparative accumulation of PAHs in four marine invertebrates. In: Oceanic processes in marine pollution, Vol. 1 (Capuzo et Kester, eds). p. 109-117.
- RAHN, R.O., S.S. Chang, J.M. Holland et L.R. Shugart, 1982. A fluorometric-HPLC assay for quantitating the binding of benzo(a)pyrene metabolites to DNA. Biochem. Biophys. Res. Comm. 109:262-268.
- SHUGART, L., J.M. Holland and R.O. Rahn, 1983. Dosimetry of PAH skin carcinogenesis: covalent binding of benzo(a)pyrene to mouse epidermal DNA. Carcinogenesis 4:195-198.
- SHUGART, L., 1988. Quantitation of chemicals induced damage to DNA of aquatic organisms by alkaline unwinding assay. Aquat. Toxicol. 13:43-52.