



**HAL**  
open science

**Les enzymes de biotransformation des xénobiotiques  
chez *Helix aspersa* (escargot) et *Pleurozium schreberi*  
(mousse) : biomarqueurs potentiels de la pollution  
atmosphérique par des hydrocarbures aromatiques  
polycycliques**

Muriel Ismert

► **To cite this version:**

Muriel Ismert. Les enzymes de biotransformation des xénobiotiques chez *Helix aspersa* (escargot) et *Pleurozium schreberi* (mousse) : biomarqueurs potentiels de la pollution atmosphérique par des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Ecotoxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 2000. Français. NNT : 2000METZ049S . tel-01775509

**HAL Id: tel-01775509**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775509>**

Submitted on 24 Apr 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Université de METZ  
UFR Sciences Fondamentales et Appliquées

## THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 27 décembre 2000

En vue de l'obtention du grade de Docteur

Spécialité Écotoxicologie

Par

**Muriel ISMERT**

---

**Les enzymes de biotransformation des xénobiotiques chez *Helix aspersa* (escargot) et *Pleurozium schreberi* (mousse),  
biomarqueurs potentiels de la pollution atmosphérique par les  
hydrocarbures aromatiques polycycliques**

---

### MEMBRES DU JURY

Rapporteurs : Madame le Professeur M. FERRO, Université de Gênes  
Madame le Docteur M.H. LIVERTOUX, Université de Nancy

Juges : Madame le Professeur D. BAGREL, Université de Metz, Responsable de Thèse  
Madame le Docteur L. GALSOMIES, Ingénieur ADEME  
Madame le Docteur A. GOMOT-DE-VAUFLEURY, Université de Besançon  
Monsieur le Professeur A. MAUL, Université de Metz  
Monsieur le Docteur T. OSTER, Université de Metz, Responsable de Thèse  
Monsieur le Docteur O. SCRIVENER, Directeur de recherches CNRS,  
Université de Strasbourg

Invité : Monsieur D. BELLEFLEUR, Directeur du GEMCEA

*A mes merveilleux Parents*

*A mon adorable Thierry*

*A mon pot' Mimi*

*A vous deux, Mamie et Jacky,*

*éternellement dans mon cœur*

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	20001495
Cote	S/M3 00/49
Loc	Majaa



*"Ni la hauteur des montagnes,  
ni la grandeur des distances n'arrêtent l'escargot"*

*Peter Seeberg*

*Ce Travail*

*A été réalisé*

*Au Laboratoire de Biochimie Métabolique et Cellulaire,*  
**UPRES 1100**

*Sous la direction du*

*Professeur Denyse Bagrel*

*UFR Sciences Fondamentales et Appliquées*

*Université de Metz*

*J'adresse mes remerciements à*

*L'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie*  
**(ADEME)**

**&**

*Le Groupement pour l'Évaluation des Mesures et des Composants  
en Eau et Assainissement*  
**(GEMCEA, Vandœuvre-Lés-Nancy)**

**&**

*L'Institut de Recherche Interdisciplinaire en Sciences de  
l'Environnement, du Développement et de l'Aménagement*  
**(IRISEDA, Metz)**

*Pour la bourse de Thèse qu'ils m'ont accordée*

*Ce travail a également été subventionné par le Conseil Régional de Lorraine*

# Remerciements

Je remercie Madame Denyse Bagrel, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, m'avoir guidée au cours de mon doctorat, m'avoir appris la rigueur et l'exigence scientifiques. Merci de m'avoir fait profiter de vos connaissances, d'avoir fait preuve de patience et d'avoir supporté mon caractère durant ces années.

Je remercie Thierry Oster pour m'avoir redonné le goût de la recherche après une année de chômage, pour m'avoir fait confiance et m'avoir initiée patiemment aux exigences de la biochimie.

Je remercie Messieurs Bellefleur, Scrivener et Pilloy pour m'avoir financée durant ma thèse mais principalement pour m'avoir suivie pas à pas, m'avoir conseillée et m'avoir soutenue.

Je remercie Denis Savanne pour avoir cru en ce projet et en moi, mais également pour ses conseils. Je remercie Laurence Galsomies pour son soutien.

Je remercie Annette Gomot-De-Vaufleury, pour m'avoir appris l'art de vivre des escargots, mais plus particulièrement pour son aide, sa disponibilité pour les expérimentations de dernières minutes et ses conseils. Je remercie Monsieur Gomot pour ses conseils.

Je remercie Monsieur Lafontaine, pour m'avoir permis de réaliser ma plus belle expérimentation.

Je remercie Monsieur Maul pour m'avoir enseigné les bases de la statistique et pour avoir accepté les contraintes de temps.

Je remercie Mesdames Livertoux et Ferro pour avoir accepté de juger ce travail et de participer au jury de ma thèse.

Je remercie AirLor pour m'avoir fourni les données sur les polluants. Je remercie Serge, pour avoir pris soin de mes mousses et Sandrine pour sa disponibilité.

Je remercie la Communauté Urbaine du Grand Nancy pour m'avoir fourni les données pluviométriques.

Je remercie Monsieur Fritz pour avoir accepté les escargots sur son beau parterre de gazon.

Je remercie Monsieur Muller pour m'avoir appris à reconnaître *Pleurozium schreberi*.

Je remercie Eric Battaglia, pour ses Rick et Rock et son aide à la traduction.

Je remercie Mag, ma compagne de spectro, pour ses conseils qui font gagner un temps appréciable.

Je remercie Marie-Noëlle pour toute son aide et Gisèle pour ses nombreux conseils de terrains, mais également pour leur soutien. Je remercie Prisca, Laetitia et plus particulièrement Tony et Cyril pour leur aide.

A tous ceux que je n'ai pas nommés, mais qui m'ont aidée et ils sont nombreux. Merci.

A vous tous, merci de m'avoir permis de réaliser un de mes rêves.

## ~ Sommaire ~

~ Préambule ~ .....	1
<b>~ CHAPITRE I ~ Étude Bibliographique</b>	
<b>~ PARTIE I ~ La Pollution Atmosphérique</b>	
I- La dispersion des polluants : les conditions météorologiques .....	3
II- Engagements, Réglementations et Loi .....	5
III- Les polluants à surveiller .....	8
<b>~ PARTIE II ~ Les Hydrocarbures Aromatiques</b>	
I- Origines .....	20
II- Caractéristiques et niveaux des HAP des sources mobiles .....	21
III- Dispersion .....	24
IV- Devenir des HAP dans l'atmosphère .....	26
V- Effets sur la santé .....	28
VI- Techniques de mesures .....	29
<b>~ PARTIE III ~ Systèmes de biotransformation des xénobiotiques - Applications en tant que Biomarqueurs</b>	
I- Les biomarqueurs .....	32
II- Systèmes de biotransformation des xénobiotiques chez les animaux, cas particulier des mollusques .....	33
III- Métabolisme des xénobiotiques chez les végétaux, cas particulier des bryophytes .....	55
~ Objectifs et Stratégies ~ .....	67
<b>~ CHAPITRE II ~ Matériels et Méthodes</b>	
I- Matériels biologiques .....	69
II- Préparation des échantillons .....	69
III- Mesure des activités enzymatiques .....	71
IV- Protocoles d'exposition .....	76
V- Analyses statistiques .....	80
<b>~ CHAPITRE III ~ Résultats &amp; Discussions</b>	
<b>~ PARTIE I ~ Exploration préliminaire du métabolisme des xénobiotiques</b>	
I- Le gastéropode <i>Helix aspersa</i> .....	82

II- La mousse *Pleurozium schreberi*..... 87

III- Récapitulatif ..... 89

**~ PARTIE II ~ Expérimentation en conditions contrôlées - Exposition au naphthalène**

I- Voie métabolique du naphthalène chez les mammifères ..... 90

II- Exposition au NAP : variations des activités enzymatiques chez *Helix aspersa*..... 91

III- Exposition au NAP : variations des activités enzymatiques chez *Pleurozium schreberi* 96

IV- Récapitulatif ..... 98

**~ PARTIE III ~ Expérimentation en conditions semi-contrôlées - Exposition à un mélange de HAP**

I- Voies métaboliques du benzo[a]pyrène chez les mollusques ..... 99

II- Variations des activités enzymatiques chez *H. aspersa*..... 101

III- Variations des activités enzymatiques chez *P. schreberi*..... 107

IV- Récapitulatif ..... 109

**~ PARTIE IV ~ Expérimentation en conditions non-contrôlées - Exposition en milie urbain**

I- Exposition d'*Helix aspersa* à une atmosphère urbaine..... 110

II- Exposition de *Pleurozium schreberi* à une atmosphère urbaine..... 129

III- Récapitulatif ..... 135

**~ Conclusions & Perspectives ~**..... 136

**~ Références Bibliographiques ~**..... 141

**~ Résumé - Abstract ~**..... 153

## ~ Listes des illustrations ~

### Listes des figures :

#### **CHAPITRE I Etude Bibliographique**

Figure I-1 : Inversion de température.....	4
Figure I-2 : Représentation de l'indice ATMO.....	7
Figure I-3 : Jauge Bêta.....	13
Figure I-4 : Evolution concomitante des niveaux d'ozone et de dioxyde d'azote selon l'activité anthropique.....	14
Figure I-5 : Utilisation de marqueurs biologiques dans l'évaluation des risques écotoxicologiques.....	31
Figure I-6 : Voies majeures de détoxification et de bioactivation des xénobiotiques organiques chez les animaux.....	34
Figure I-7 : Voies métaboliques du benzo[a]pyrène.....	35
Figure I-8 : A, spectre d'absorption du complexe CYP réduit-CO, B, représentation de l'hémoprotéine.....	36
Figure I-9 : Principales étapes du cycle catalytique du cytochrome P450.....	37
Figure I-10 : Chaîne de transporteurs d'électrons.....	38
Figure I-11 : Voies métaboliques du BaP chez <i>Mytilus edulis</i> .....	40
Figure I-12 : Mécanisme d'induction du CYP1A1 chez les mammifères.....	42
Figure I-13 : Structure du glutathion réduit.....	44
Figure I-14 : Synthèse du glutathion intracellulaire et implication dans les voies de détoxification.....	45
Figure I-15 : Réaction catalysée par le CYP73.....	56
Figure I-16 : Biosynthèse du glutathion chez les plantes.....	57
Figure I-17 : Cycle ascorbate-glutathion dans les chloroplastes de plantes supérieures.....	62
Figure I-18 : Localisation sub-cellulaire du système antioxydant chez les plantes.....	64

#### **CHAPITRE II Matériels & Méthodes**

Figure II-1 : <i>Helix aspersa</i> .....	69
Figure II-2 : <i>Pleurozium schreberi</i> .....	69
Figure II-3 : Cage à escargots.....	77
Figure II-4 : Système des "Moss-plates".....	77
Figure II-5 : Triplet.....	78
Figure II-6 : Site EDF équipé de "Moss-plates" suspendus et de quatre cages à escargots.....	78

#### **CHAPITRE III Résultats et Discussion**

Figure III-1 : Variations des activités enzymatiques associées au glutathion en fonction de l'âge chez <i>H. aspersa</i> ..	82
Figure III-2 : Proportion relative des activités enzymatiques étudiées.....	86
Figure III-3 : Métabolisme du naphthalène chez les mammifères.....	88
Figure III-4 : Variations des activités enzymatiques dans le toit de la cavité palléale d' <i>H. aspersa</i> après exposition au NAP.....	90
Figure III-5 : Variations des activités enzymatiques dans la glande digestive d' <i>H. aspersa</i> après exposition au NAP.....	91
Figure III-6 : Variations des activités enzymatiques dans le rein d' <i>H. aspersa</i> après exposition au NAP.....	93

Figure III-7 : Variations des activités enzymatiques chez <i>Pleurozium schreberi</i> après exposition au NAP .....	94
Figure III-8 : Voies métaboliques du benzo[a]pyrène chez <i>Mytilus edulis</i> .....	97
Figure III-9 : Variations des activités de phase I dans les trois organes d' <i>Helix aspersa</i> , après 8 heures d'exposition à une ambiance de travail chargée en HAP .....	98
Figure III-10 : Variations des activités glutathion <i>S</i> -transférases dans les trois organes d' <i>Helix aspersa</i> , après 8 heures d'exposition à une ambiance de travail chargée en HAP .....	101
Figure III-11 : Variations des activités glutathion peroxydases et glutathion réductase dans les trois organes d' <i>Helix aspersa</i> , après 8 heures d'exposition à un mélange de HAP .....	103
Figure III-12 : Variations des activités GST, GPX, GR, APX et CAT chez <i>Pleurozium schreberi</i> après 8 heures d'exposition à une ambiance de travail chargée en HAP .....	105
Figure III-13 : Variations des niveaux de polluants (A) et des activités enzymatiques dans la glande digestive (B) et le rein (C) d' <i>Helix aspersa</i> après différents temps d'exposition à une ambiance urbaine durant l'été 1998. ....	108
Figure III-14 : Variations des niveaux de polluants (A) et des activités enzymatiques dans la glande digestive (B) et le rein (C) d' <i>Helix aspersa</i> après différents temps d'exposition à une ambiance urbaine durant l'automne 1998. ....	109
Figure III-15 : Représentation des variables activités enzymatiques, polluants et pluviométrie dans un plan factoriel des deux 1 <sup>ers</sup> axes principaux, pour différentes durées d'exposition et saisons pour la glande digestive d' <i>H. aspersa</i> .....	115
Figure III-16 : Représentation des variables activités enzymatiques, polluants et pluviométries dans un plan factoriel des deux 1ers axes principaux, en fonction de la durée et de la saison d'exposition pour le rein d' <i>H. aspersa</i> .....	121
Figure III-17 : Variations des niveaux de polluants (A) et des activités enzymatiques (B) chez <i>P. schreberi</i> après différents temps d'exposition à une ambiance urbaine durant l'été 1999.....	126
Figure III-18 : Représentation des variables activités, polluants et pluviométrie dans un plan factoriel des deux 1 <sup>ers</sup> axes principaux, pour <i>P. schreberi</i> .....	128

### Listes des tableaux :

## **CHAPITRE I Etude Bibliographique**

Tableau I-1 : Seuils d'alerte et d'information.....	7
Tableau I-2 : Relations entre les concentrations mesurées de polluants et l'indice d'ATMO .....	8
Tableau I-3 : Principales propriétés des 16 HAP référencés par l'EPA.....	19
Tableau I-4 : Effet de la nature du pot d'échappement sur l'émission de HAP par les véhicules roulant à l'essence. ....	22
Tableau I-5 : Concentrations moyennes des HAP dans l'atmosphère de différentes villes .....	23
Tableau I-6 : Substrats et inducteurs des principales sous-famille de CYP .....	40
Tableau I-7 : Substrats des GST cytosoliques humaines .....	47
Tableau I-8 : Variations des biomarqueurs chez les invertébrés exposés à une pollution dans des conditions contrôlées.....	53
Tableau I-9 : Variations biomarqueurs chez les mollusques exposés à une pollution dans des conditions non contrôlées.....	54



Tableau I-10 : Variations des enzymes de biotransformation des xénobiotiques et de marqueurs de stress chez les plantes en conditions contrôlées .....	66
Tableau I-11 : Variations des enzymes de biotransformation des xénobiotiques et de marqueurs de stress chez les plantes en conditions non contrôlées .....	66

### **CHAPITRE III Résultats et Discussion**

Tableau III-1 : Effet de l'âge sur la variabilité des activités enzymatiques associées au glutathion chez <i>H. aspersa</i> .	83
Tableau III-2 : Niveaux constitutifs des activités enzymatiques de phase I et des activités associées au glutathion d' <i>Helix aspersa</i> (âge 2mois) .....	86
Tableau III-3 : Niveaux de base des activités enzymatiques chez <i>P. schreberi</i> .....	87
Tableau III-4 : Description des stations d'exposition .....	110
Tableau III-5 : Concentration des polluants sur les trois sites étudiés en fonction de la période d'exposition .....	113
Tableau III-6 : Analyse de variance des paramètres biochimiques mesurés dans la glande digestive d' <i>H. aspersa</i> après exposition à la pollution urbaine .....	115
Tableau III-7 : Analyse de régression linéaire simple des paramètres biochimiques mesurés dans la glande digestive d' <i>H. aspersa</i> , en fonction des polluants et de la pluviométrie.....	121
Tableau III-8 : Analyse de variance linéaire simple et multiple des paramètres biochimiques mesurés dans la glande digestive d' <i>H. aspersa</i> , en fonction des polluants et de la pluviométrie.....	123
Tableau III-9 : Analyse de variance des paramètres biochimiques mesurés dans le rein d' <i>H. aspersa</i> exposé à la pollution urbaine.....	124
Tableau III-10 : Analyse de régression linéaire simple des paramètres biochimiques mesurés dans le rein d' <i>H. aspersa</i> , en fonction des polluants et de la pluviométrie.....	127
Tableau III-11 : Analyse de régression linéaire multiple des paramètres biochimiques mesurés dans le rein d' <i>H. aspersa</i> , en fonction des polluts et de la pluviométrie.....	128
Tableau III-12 : Analyse de variance des paramètres biochimiques mesurés après exposition de <i>P. schreberi</i> à une pollution urbaine.....	131
Tableau III-13 : Analyse de régression linéaire des paramètres biochimiques mesurés chez <i>P. schreberi</i> en fonction de la pollution et de la pluviométrie .....	129

### **Conclusions et Perspectives**

Tableau IV-1 : Récapitulatif des variations des paramètres biochimiques mesurés dans le toit de la cavité palléale (TCP), le rein (R) et la glande digestive (GD) d' <i>Helix aspersa</i> après exposition au naphtalène ou à une ambiance de travail principalement chargée en HAP.....	137
Tableau IV-2 : Récapitulatif des variations des paramètres biochimiques chez <i>Pleurozium schreberi</i> après exposition au naphtalène ou à une ambiance de travail chargée en HAP.....	139

## ~ Listes des Abréviations ~

3MC	3-méthyl-cholanthrène	MROD	méthoxyrésorufine- <i>O</i> -dééthylase
7-ECR	7-éthoxycoumarine	N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	anhydride nitrique
7-ETR	7-éthoxyrésorufine	NADPH	β-nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
7-PTR	7-pentoxyrésorufine	NAP	naphtalène
ACP	analyse en composantes principales	NAT	N-acétyl transférase
ADN	acide désoxyribonucléique	NMHC	hydrocarbures aromatiques non- méthaniques
AhR	récepteur des hydrocarbures aromatiques	NO	monoxyde d'azote
ANOVA	Analyse de variance	NO <sub>2</sub>	dioxyde d'azote
APX	ascorbate peroxydase	NO <sub>3</sub>	trioxyde d'azote
ARN	acide ribonucléique	N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	anhydride nitrique
Arnt	translocateur nucléaire de AhR	NO <sub>x</sub>	oxydes d'azote (NO+NO <sub>2</sub> )
AS	activité spécifique	NQO	4-nitroquinoline-1-oxyde
Asc	ascorbate	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	oxygène singulet
BaA	benzo[ <i>a</i> ]anthracène	O <sub>2</sub>	anion superoxyde
BaP	benzo[ <i>a</i> ]pyrène	O <sub>3</sub>	ozone
BaPH	BaP-hydroxylase	OH <sup>°</sup>	radical hydroxyl
BPDE	BaP-diol époxyde	PB	phénobarbital
bHLH	hélice boucle hélice à terminaison basique	PCB	polychlorobiphényle
CAT	catalase	PROD	7-pentoxyrésorufine- <i>O</i> -déalkylase
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzène	PS	particules en suspension
CH <sub>4</sub>	méthane	R	rein
CO	monoxyde de carbone	SO <sub>2</sub>	dioxyde de soufre
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone	SOD	superoxyde dismutases
CuOOH	hydroperoxyde de cumène	ST	sulfotransférases
CV	coefficient de variation	<i>t</i> BuOOH	<i>tert</i> -butyl-hydroperoxyde
CYP	cytochrome P450	TCP	toit de la cavité palléale
DCNB	1,2-dichloro-4-nitrobenzène	TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo- <i>p</i> - dioxine
DHD	dihydrodiol déhydrogénase	UGT	UDP-glucuronosyl-transférases
DTD	DT-diaphorase	US-EPA	<i>United States - Environmental Protection Agency</i>
DTT	dithiothréitol	UV	ultra violet
ECOD	7-éthoxycoumarine- <i>O</i> -dééthylase	XRE	élément de réponse aux xénobiotiques
EDTA	acide éthylène-diamino-tétra-acétique		
EH	époxydes hydrolases		
ERO	espèces réactives de l'oxygène		
EROD	7-éthoxyrésorufine- <i>O</i> -dééthylase		
FAD	flavine adénine dinucléotide		
GD	glande digestive		
GPX	glutathion peroxydases		
GR	glutathion réductase		
GSH	glutathion réduit		
GSSG	glutathion oxydé		
GST	glutathion <i>S</i> -transférases		
HO <sup>°</sup>	hydroxyle		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxyde d'hydrogène		
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	acide sulfurique		
HAP	hydrocarbures aromatiques polycycliques		
HNO <sub>3</sub>	acide nitrique		
hsp	protéine de choc thermique		
IR	infra rouge		

*~ Préambule ~*

Le 30 décembre 1996, la loi sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie, dite LAURE, a replacé la protection de la santé des Français au cœur des politiques publiques en matière de surveillance de l'air. Cette loi a également pour objectif une meilleure maîtrise de la qualité de l'air, notamment en milieu urbain. La mise en œuvre de cette dernière nécessite que des progrès soient accomplis dans la connaissance des causes et des conséquences de la pollution atmosphérique aux échelles locales et régionales. Des outils et des méthodes opérationnelles directement utilisables sont également nécessaires, d'autant que de nouvelles réglementations prévoient notamment la diversification des substances à mesurer. En effet, une directive fixant les valeurs limites des métaux lourds, du benzène et des **hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)** doit paraître dans les trois prochaines années.

Quatre ans après la promulgation de la loi, le dispositif de surveillance de la qualité de l'air est monté en puissance, couvrant ainsi la totalité du territoire grâce à des stations fixes et mobiles (camion-laboratoire). Ces deux types de stations permettent la mesure en continu des oxydes d'azote (NO<sub>x</sub>), de l'ozone (O<sub>3</sub>), du dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>) et dans certains cas du monoxyde de carbone (CO), des particules en suspension (PS) et du plomb (Pb). La mesure des polluants prochainement réglementés et plus particulièrement des HAP, n'est réalisée qu'au cours de campagnes de mesures ponctuelles, faute de techniques adaptées. En effet, pour ces derniers, les techniques actuellement disponibles présentent principalement des difficultés de faisabilité et de coût. En conséquence, depuis quelques années, différentes approches sont développées afin de pallier ces lacunes et d'anticiper les futures directives. Ainsi, au début de cette année un ambitieux projet, nommé EUROBIONET et financé par la Commission européenne, a débuté dans dix collectivités territoriales européennes (Nancy, Lyon, Copenhague, Edimbourg, Düsseldorf, Ditzingen, Sheffield, Klagenfurt, province de Catalogne, Vérone). Il s'agit d'un programme destiné à évaluer la qualité de l'air par le biais de bioindicateurs. De nombreux polluants seront mesurés, parmi lesquels figurent les HAP. La concentration atmosphérique de ces derniers sera estimée grâce à la cuticule du chou frisé (*Brassica oleracea acephala*) où ils s'accumulent. Ce vaste projet met l'accent sur l'évolution et la diversité des outils à venir pour l'évaluation de la qualité de l'air. Il permet également de penser, que l'usage des bioindicateurs pour la réalisation de plans de la qualité de l'air fera partie intégrante de la législation française, comme c'est d'ores et déjà le cas en Allemagne depuis 1990.

L'utilisation de bioindicateurs présente de nombreux avantages tels qu'une installation facile et rapide, un faible coût tant au niveau de l'investissement que du suivi, mais il ne permet pas d'évaluer l'impact de la pollution sur la santé. Or, les HAP sont connus pour leurs pouvoirs cancérigènes. La mesure de paramètres biochimiques dans des organismes permettrait ce type

d'évaluation. L'usage de biomarqueurs pourrait effectivement permettre d'évaluer les effets d'exposition chronique ou ponctuelle à un ou plusieurs xénobiotiques sur les populations dans leur environnement. Bien entendu, l'emploi des biomarqueurs et des bioindicateurs est complémentaire aux réseaux de mesures physico-chimiques, et n'a pas pour objectif de s'y substituer.

Les enzymes qui participent, directement ou indirectement, au métabolisme des HAP sont donc des molécules intéressantes à explorer dans le cadre d'une recherche de biomarqueurs. Cette investigation nécessite d'une part de connaître au mieux les origines et le devenir des divers polluants atmosphériques et d'autre part, de déterminer les enzymes intervenant dans le métabolisme des HAP et leurs utilisations en tant que biomarqueurs dans divers compartiments. Ce travail réalisé, la pertinence de certains paramètres biochimiques en tant que biomarqueur de la pollution atmosphérique par les HAP peut alors être étudiée.

**~ CHAPITRE I ~**

***Etude Bibliographique***

*~ PARTIE I ~*

*La Pollution Atmosphérique*

~ PARTIE I ~

*La Pollution Atmosphérique*

<b>I- La dispersion des polluants : les conditions météorologiques .....</b>	<b>3</b>
I-1. La pression atmosphérique.....	3
I-2. Les précipitations .....	3
I-3. La température.....	4
I-4. Le vent.....	4
<b>II- Engagements, Réglementations et Loi.....</b>	<b>5</b>
II-1. Engagements internationaux de maîtrise des émissions .....	5
II-2. Réglementations relatives aux émissions des véhicules particuliers neufs et aux carburants.....	6
II-3. La loi sur l'air.....	6
<b>III- Les polluants à surveiller .....</b>	<b>8</b>
III-1. Les polluants sous surveillance continue.....	9
III-1.1. Le dioxyde de soufre (SO <sub>2</sub> ) .....	9
III-1.2. Les oxydes d'azote (NO <sub>x</sub> ).....	10
III-1.3. Le monoxyde de carbone (CO).....	11
III-1.4. Les particules en suspension (PS).....	13
III-1.5. L'ozone (O <sub>3</sub> ) .....	13
III-2. Les polluants mesurés ponctuellement, cas particulier du benzène .....	16



L'air pur est composé de 78 % d'azote, de 21 % d'oxygène, de 1 % de gaz rares et de dioxyde de carbone. A ces composants s'ajoutent des quantités de gaz polluants et de particules microscopiques qui contaminent notre atmosphère. Ainsi, l'article 2 de la "Loi sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie" définit la pollution de l'air comme *"l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, dans l'atmosphère et les espaces clos de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives excessives"*.

S'il est possible de choisir quelle eau boire, il n'y a pas d'alternative pour les 12 000 litres d'air que chacun d'entre nous respire chaque jour.

## **I- La dispersion des polluants : les conditions météorologiques**

La pollution atmosphérique pose un problème complexe, car elle résulte de multiples facteurs liés à la nature et à la répartition spatiale des émissions, ainsi qu'aux conditions météorologiques.

### **I-1. La pression atmosphérique**

Les situations dépressionnaires sont généralement accompagnées de mouvements de l'air avec des turbulences assez fortes, favorisant la dispersion. En revanche, des conditions anticycloniques où les seuls mouvements de convection verticale de l'air ne permettent pas, dans la majorité des cas, la dissémination des polluants, entraînent des épisodes de pollution.

### **I-2. Les précipitations**

Les précipitations atmosphériques (pluies, neige...) éliminent de l'atmosphère une partie des polluants particulaires. Elles agissent en interceptant la particule et en l'entraînant jusqu'au sol. L'interception est fonction de la taille de la goutte d'eau, de celle de la particule, de leur vitesse de chute respective et de leur densité (Panther *et al.*, 1999). L'efficacité de cette élimination décroît parallèlement avec la taille des particules et devient négligeable pour les particules de taille égale ou inférieure à 2  $\mu\text{m}$ . Une pluie régulière augmentera la quantité de produits particulaires amenés jusqu'au sol. Les effets de condensation ou d'évaporation jouent aussi un rôle important dans la captation et souvent dans la transformation des polluants, mais aussi dans leur dispersion.

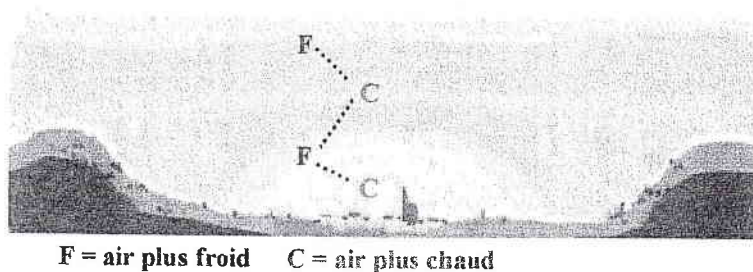
### I-3. La température

Elle agit sur la chimie des polluants : le froid diminue la volatilité de certains gaz tandis que la chaleur est favorable, par exemple, à la formation photochimique de l'ozone.

Normalement, l'air se refroidit avec l'altitude selon un gradient de 0,65 °C par 100 m. Lorsque ce gradient est plus élevé en raison de la chaleur du sol ou de la présence d'air froid en altitude, l'atmosphère est dite instable. Cette instabilité favorise les mouvements ascendants et donc la dispersion des fumées qui seront rapidement entraînées en altitude. A l'inverse, lorsque le gradient thermique vertical est plus faible que la normale, en raison du refroidissement du sol ou de la présence d'air chaud en altitude, l'air est dit stable. Cet état s'oppose à une bonne diffusion des polluants.

Les inversions thermiques (Fig. I-1) sont des cas particuliers de stabilité de l'air. En effet, au lieu de se refroidir avec l'altitude, l'air se réchauffe jusqu'à un certain niveau, appelé niveau d'inversion. Ce niveau représente une discontinuité thermique qui bloque toute possibilité d'échange vertical. Ainsi, les polluants sont bloqués dans les basses couches de l'atmosphère, blocage qui est accentué lorsque la topographie du site réduit la ventilation.

Ces phénomènes sont déterminés par le niveau d'altitude où ils se situent mais également par la différence de température existant de part et d'autre de cette "barrière". Plus cette dernière est basse, plus les polluants se concentrent dans les basses couches de l'atmosphère.



**Figure I-1 : Inversion de température**

### I-4. Le vent

Facteur fondamental de la dispersion des polluants, il est constitué par un écoulement d'air fortement instable. Il entraîne le brassage des basses couches et sa vitesse définit l'intensité de la turbulence. Le vent est caractérisé par sa direction, sa vitesse horizontale, mais aussi par une composante verticale conditionnée par le gradient thermique et les obstacles. La direction du vent détermine l'axe de transport privilégié des polluants. La rose des vents permet de connaître le ou les vents dominants des sites étudiés. La vitesse du vent agit sur la dilution plus ou moins importante des polluants dans l'air.

## II- Engagements, Réglementations et Loi

Si la plupart des polluants émis se déposent près du sol, un certain nombre est disséminé dans l'atmosphère. Lorsque les polluants ont pu être entraînés suffisamment haut dans l'atmosphère, ils sont susceptibles de parcourir des distances allant jusqu'à plusieurs milliers de kilomètres entraînant une pollution transfrontalière. C'est pourquoi, les émissions de polluants doivent être régies par des accords internationaux.

Dans le passé, en France, les politiques de préservation de la qualité de l'air avaient essentiellement un caractère "curatif" visant à résoudre des problèmes graves de pollution liée principalement au réseau industriel local. D'énormes efforts ont été fournis en 1961 lors de la mise en place de la loi-cadre afin de réduire les rejets industriels et autres sources fixes d'émissions. Ces efforts ont été malheureusement contrebalancés par le développement des transports individuels, qui sont devenus les principaux agents actuels de la pollution de l'air. Pour cette raison, de nombreuses réglementations ont été mises en place ces dix dernières années.

### II-1. Engagements internationaux de maîtrise des émissions

- ❶ Diminution des émissions d'oxyde d'azote de 30 % de 1980 à 1998 – Déclaration additionnelle de Sofia, 1988
- ❷ Réduction des émissions de composés organiques volatils non méthaniques de 30 % de 1988 à 1998 – Protocole de Genève, 1991
- ❸ Réduction des émissions de dioxyde de soufre de 74 % de 1980 à 2000, de 77 % d'ici 2005 et de 78 % d'ici 2010 – Protocole d'Oslo, 1994
- ❹ Stabilisation des émissions des trois principaux gaz à effets de serre (dioxyde de carbone, CO<sub>2</sub>, dioxyde d'azote, NO<sub>2</sub> et méthane, CH<sub>4</sub>) de 1990 à 2000 – Convention de Rio, 1992
- ❺ Stabilisation des émissions des six principaux gaz à effet de serre (CO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, les chlorofluorocarbones, les oxydes nitreux, l'ozone, O<sub>3</sub>) de 1990 à 2010 – Conseil européen, 1998, faisant suite à la conférence de Kyoto de 1997
- ❻ Réduction des émissions de métaux lourds, cadmium, plomb et mercure par rapport à 1990 – Protocole d'Aarhus, 1998
- ❼ Réduction des émissions de polluants organiques persistants, dioxines, furanes, hexachlorobenzène et **hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)**, par rapport à 1990, et interdiction de production et d'utilisation de plusieurs substances phytosanitaires – Protocole d'Aarhus, 1998.

## **II-2. Réglementations relatives aux émissions des véhicules particuliers neufs et aux carburants**

Une première réglementation européenne exigeant le pot catalytique pour les voitures à essence est entrée en vigueur le 1<sup>er</sup> janvier 1993, alors que l'obligation du pot d'oxydation pour les voitures diesel date du 1<sup>er</sup> janvier 1997. Simultanément, la teneur en soufre du gazole a été abaissée de 0,3 à 0,2 % au 1<sup>er</sup> octobre 1994, puis à 0,05 % au 1<sup>er</sup> octobre 1996 pour permettre le fonctionnement du pot d'oxydation. Enfin, la directive du 27 juin 1985 a interdit la vente d'essence plombée dans la communauté européenne à compter du 1<sup>er</sup> janvier 2000.

## **II-3. La loi sur l'air**

La " Loi sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie " n°96-1236 du 30 décembre 1996 a introduit plusieurs obligations dans le domaine des transports et de la surveillance de la qualité de l'air :

- ❶ Taux minimal d'oxygène dans les carburants
- ❷ Mise en place d'un minimum de 20 % de véhicules électriques dans les parcs automobiles du secteur public dès 1999
- ❸ Etablissement de plans de déplacements urbains pour les grandes villes ou agglomérations
- ❹ Surveillance de la qualité de l'air pour l'ensemble du territoire au 1<sup>er</sup> janvier 2000
- ❺ Constitution d'une association régionale destinée à évaluer la qualité de l'air, regroupant : les collectivités locales, les entreprises, les associations de protection de l'environnement, l'état et les établissements publics.
- ❻ Information du public sur les mesures de pollution de l'air.

Cette procédure qui a pour objectif d'informer le public lors des pics, prévoit trois niveaux d'information (Tab. I-1) :

- le *niveau 1* implique une "mise en éveil des services techniques et administrations compétentes" ;
- le *niveau 2* "d'information et de recommandation" consiste en l'information par les médias des personnes sensibles et en la diffusion de recommandations relatives à l'utilisation des sources mobiles de polluants concourant à l'élévation de la concentration de la substance polluante considérée ;
- le *niveau 3* "d'alerte" s'adresse à l'ensemble de la population. Le Préfet peut alors décider de limiter les émissions industrielles et l'usage des véhicules ou des chauffages urbains et mettre en place un plan de déplacement urbain adapté à la nature de la pollution.

Tableau I-1: Seuils d'alerte et d'information

Niveaux d'alerte et d'information	Seuil de concentration des polluants atmosphériques ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , moyenne horaire)		
	O <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	SO <sub>2</sub>
<i>niveau 1</i> : Mise en vigilance	130	120	200
<i>niveau 2</i> : Information et recommandation Arrêté du 17/08/98	180	200	300
<i>niveau 3</i> : Alerte Décret n°98-360 du 06/05/98	360	400	600

Dans un objectif de simplification de la communication des résultats de la surveillance de la qualité de l'air, l'information est également diffusée *via* l'indice ATMO (Fig. I-2).

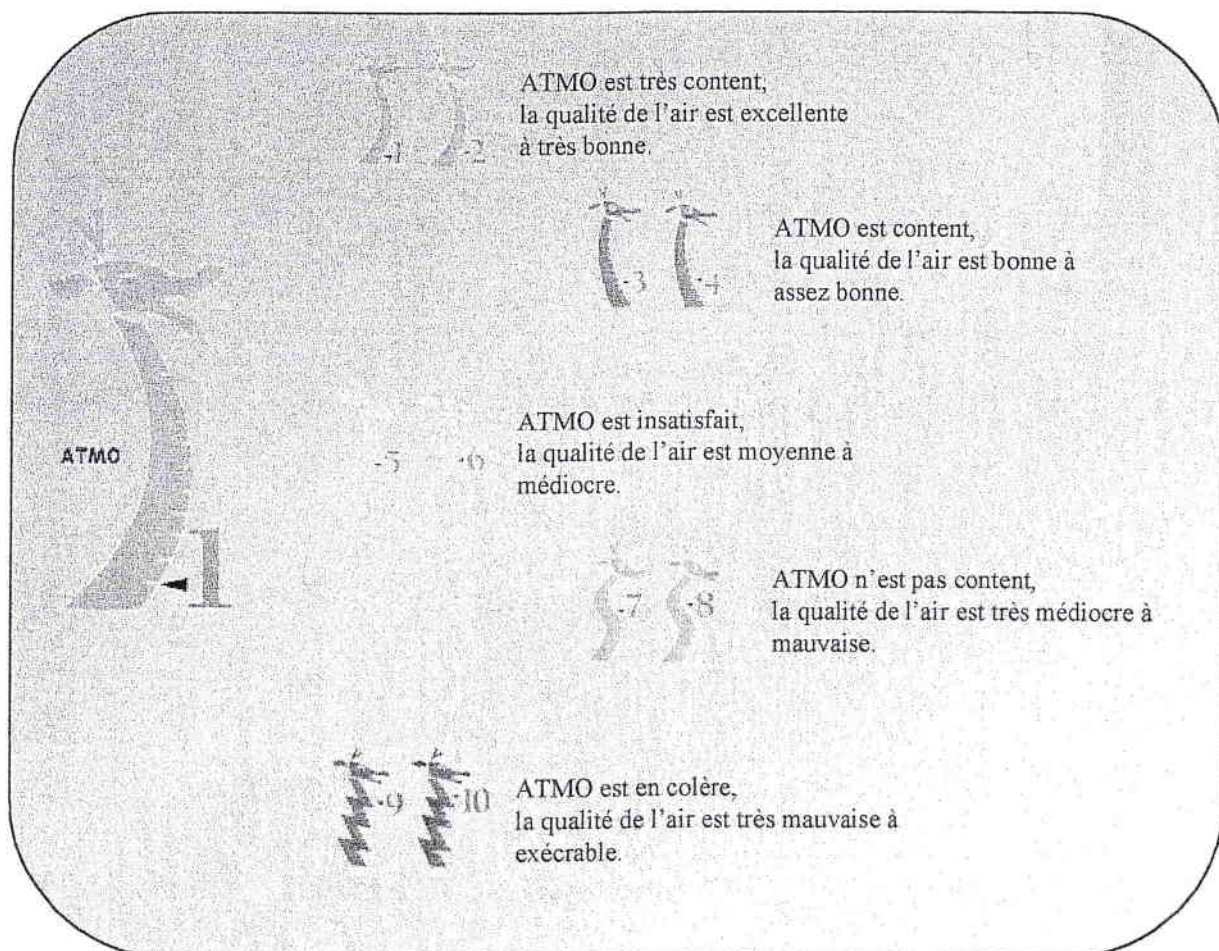


Figure I-2 : Représentation de l'indice ATMO


Cet indice intègre obligatoirement trois polluants surveillés en continu par les réseaux (Tab. I-2) : dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>), dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>), ozone (O<sub>3</sub>), et facultativement les particules en suspension (PS). Il est établi tous les jours et permet de caractériser la qualité globale de l'air d'une agglomération sur une échelle allant de 1 (excellente) à 10 (exécrable).




C'est le polluant qui possède le plus mauvais indice ATMO, établi d'après le tableau I-2, qui impose la valeur finale d'ATMO (Legout, 1998).

**Tableau I-2 : Relations entre les concentrations de polluants et l'indice d'ATMO**

Classe d'indice	Seuils NO <sub>2</sub> moyenne des maxima horaires (µg/m <sup>3</sup> )	Seuils O <sub>3</sub> moyenne des maxima horaires (µg/m <sup>3</sup> )	Seuils SO <sub>2</sub> moyenne des moyennes journalières (µg/m <sup>3</sup> )	Qualificatif associé
1	0 ≤ M ≤ 30	0 ≤ M ≤ 30	0 ≤ M ≤ 15	Excellent
2	31 ≤ M ≤ 60	31 ≤ M ≤ 50	16 ≤ M ≤ 30	Très bon
3	61 ≤ M ≤ 80	51 ≤ M ≤ 70	31 ≤ M ≤ 60	Bon
4	81 ≤ M ≤ 105	71 ≤ M ≤ 90	61 ≤ M ≤ 85	Assez bon
5	106 ≤ M ≤ 135	91 ≤ M ≤ 110	86 ≤ M ≤ 110	Moyen
6	136 ≤ M ≤ 155	111 ≤ M ≤ 145	111 ≤ M ≤ 150	Médiocre
7	156 ≤ M ≤ 180	146 ≤ M ≤ 180	151 ≤ M ≤ 210	Très médiocre
8	181 ≤ M ≤ 270	181 ≤ M ≤ 250	211 ≤ M ≤ 270	Mauvais
9	271 ≤ M ≤ 400	251 ≤ M ≤ 360	271 ≤ M ≤ 350	Très mauvais
10	M ≥ 401	M ≥ 361	M ≥ 351	exécrable

 Dépassement du seuil de recommandation

 Dépassement du seuil d'alerte

### III- Les polluants à surveiller

Le décret n°98-360 du 6 mai 1998 et l'arrêté du 17 août 1998 imposent la surveillance en continu, à dater du 1<sup>er</sup> janvier 2000, du dioxyde d'azote, des particules en suspension, du dioxyde de soufre, de l'ozone et du monoxyde de carbone (CO). Ces polluants sont prélevés et analysés automatiquement et en continu suivant les normes AFNOR. Le résultat de leurs mesures est ensuite transmis par modem aux réseaux dont les analyseurs dépendent. Afin de faciliter la comparaison des résultats entre les différents réseaux de surveillance de la qualité de l'air, les instruments de mesure sont certifiés et régulièrement contrôlés. De plus, l'étalonnage des appareils est effectué périodiquement au sein des réseaux mais également dans un laboratoire central utilisant un même étalon pour tous les appareils de mesure de l'hexagone.

### III-1. Les polluants sous surveillance continue

#### III-1.1. Le dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>)

##### ✎ *Origine :*

Environ 5 % du SO<sub>2</sub> provient des éruptions volcaniques, seule source naturelle. La source principale de ce polluant est l'ignition de combustibles fossiles contenant du soufre : fioul, charbon. En brûlant, ces combustibles libèrent le soufre qu'ils contiennent et celui-ci se combine alors avec l'oxygène pour former le dioxyde de soufre. Il est principalement émis par les industries (71 %), les transports représentant 14 % des sources de SO<sub>2</sub>. La réduction de la production d'électricité par les centrales thermiques a provoqué une diminution de 60 % du SO<sub>2</sub> dans l'atmosphère en France de 1980 à 1990. En 1993 les émissions de SO<sub>2</sub> étaient de 1,2 millions de tonnes par an (CITEPA, 1996).

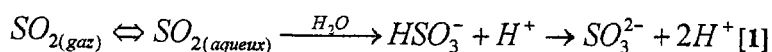
##### ✎ *Pollutions générées :* (Güsten, 1986)

En présence d'humidité, le dioxyde de soufre forme de l'acide sulfurique, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, qui contribue à l'acidité des pluies conduisant à la dégradation de la pierre et des matériaux de certaines constructions.

##### ✎ *Effets sur les organismes vivants :*

Chez les plantes, le dioxyde de soufre engendre, par formation d'espèces hautement réactives, une détérioration des parois qui entraîne une perte de la coloration des feuilles (Bartosk, 1997, Halliwell, 1987). Une diminution de la photosynthèse occasionnant la mort tissulaire est également observée après une courte exposition au SO<sub>2</sub> (Takemoto, 1982).

L'exposition de rats à des niveaux élevés en SO<sub>2</sub> (800 ppm), génère un détachement de cellules de la trachée et de la partie supérieure des voies respiratoires (Stratmann *et al.*, 1991). Chez des personnes en bonne santé et sans problème pulmonaire, 5 ppm de SO<sub>2</sub> déclenchent les symptômes de l'asthme (Gong, 1992). En effet, ce polluant produit des changements structurels dans les poumons, consistant en un épaississement de la paroi, une augmentation du parenchyme, un accroissement de la couche protectrice de mucus et une diminution du transport du mucus. Ces divers processus génèrent des difficultés respiratoires par broncho-constriction (Walters et Ayres, 1996, Atzori *et al.*, 1992, Tewari *et al.*, 1991). De plus, le contact du dioxyde de soufre avec des membranes humides tels que les yeux, les poumons, forme de l'acide sulfurique [1] causant ainsi des dommages tissulaires.



☞ **Principe de mesure : fluorescence UV (norme Afnor X 43-019)**

Les molécules de SO<sub>2</sub> sont irradiées par un rayonnement UV ( $\lambda = 214 \text{ nm}$ ), et amenées ainsi à un niveau énergétique élevé de durée de vie limitée. Le retour à l'état fondamental se traduit par la libération de l'excès d'énergie sous forme de photons. Le rayonnement fluorescent alors émis ( $\lambda = 350 \text{ nm}$ ) atteint un détecteur photoélectrique dont le signal est proportionnel à la concentration de SO<sub>2</sub>.

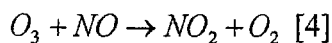
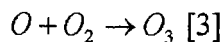
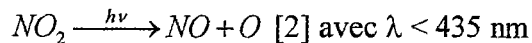
**III-1.2. Les oxydes d'azote (NO<sub>x</sub>)**

☞ **Origine :**

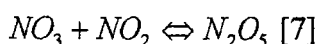
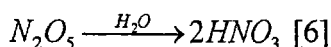
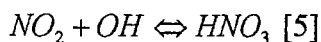
Les NO<sub>x</sub> (oxyde d'azote) comprennent essentiellement le monoxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>). Ils proviennent surtout des véhicules (environ 75 %) et des installations de combustion. Les oxydes d'azote résultent principalement de la combinaison à haute température de l'oxygène de l'air et de l'azote. Le monoxyde d'azote rejeté se transforme rapidement en dioxyde d'azote. En 1994, les émissions de NO<sub>x</sub> étaient évaluées à 1,7 millions de tonnes par an.

☞ **Pollutions générées :** (Güsten, 1986)

Les oxydes d'azote interviennent dans le processus de formation de l'ozone [2, 3, 4] dans la troposphère (zone de l'atmosphère située entre le sol et 7 à 12 km d'altitude). Ils contribuent ainsi à la formation de brouillard photochimique.

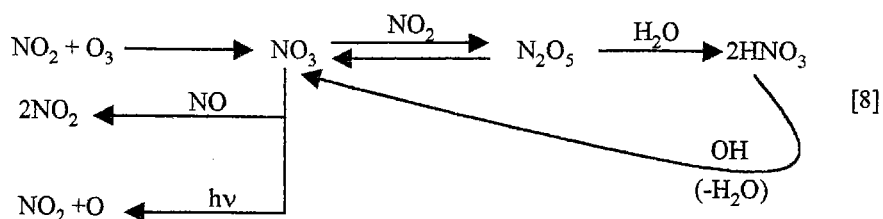


Le dioxyde d'azote participe à l'acidité des pluies par formation d'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) soit, par réaction directe avec le radical hydroxyl (OH) [5] soit, indirectement, par réaction de l'anhydride nitrique (N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) avec l'eau [6]. Ce dernier gaz, N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, est formé par réaction du NO<sub>2</sub> avec le trioxyde d'azote (NO<sub>3</sub>) [7].



Ces différentes réactions [5, 6, 7] sont étroitement associées et ne peuvent pas être considérées individuellement. Ainsi, la présence dans l'atmosphère de ces molécules dépend non seulement de conditions climatiques (rayonnements lumineux, hygrométrie), mais également du niveau de concentration de chacun de ces polluants et de leur réactivité [8].





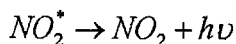
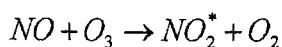
#### ➤ Effets sur les organismes vivants :

A faible dose, les  $\text{NO}_x$  augmentent l'ouverture des stomates facilitant la pénétration des divers polluants atmosphériques plus réactifs, en l'occurrence le  $\text{SO}_2$  et l' $\text{O}_3$  (Hippeli et Elstner, 1997).

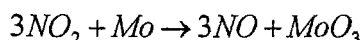
Chez l'homme, des concentrations élevées en  $\text{NO}_2$  provoquent des bronchospasmes et des œdèmes pulmonaires (Hippeli et Elstner, 1997), générés par l'augmentation de la perméabilité microvasculaire des poumons (Guidotti, 1978). De plus, le  $\text{NO}_2$  altère les fonctions des macrophages rendant l'organisme davantage sensible aux infections par les virus (Goings *et al.*, 1989). En somme, ce polluant peut endommager directement les poumons *via* ses propriétés oxydantes (Mustafa *et al.*, 1978) ou indirectement en altérant les mécanismes de défense des cellules.

#### ➤ Principe de mesure : chimiluminescence (norme Afnor X 43-018)

Les molécules de  $\text{NO}$  sont oxydées par des molécules d'ozone générées en excès par un ozoneur. Cette oxydation conduit à la formation de molécules de  $\text{NO}_2$  excitées dont le retour à l'état fondamental produit un rayonnement lumineux sur un spectre s'étalant de 600 à 1 200 nm.



Pour être mesuré par chimiluminescence, le  $\text{NO}_2$  doit être préalablement transformé en  $\text{NO}$ . Cette réduction est réalisée dans un four à molybdène suivant la réaction :



L'air prélevé par une pompe est dirigé d'une part *via* un four convertisseur vers une chambre de mesure qui permettra la détermination de  $\text{NO} + \text{NO}_2$  et, d'autre part, directement dans une chambre permettant la détermination directe de  $\text{NO}$ .

### III-1.3. Le monoxyde de carbone (CO)

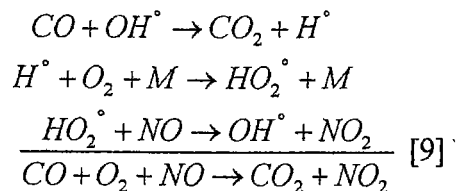
#### ➤ Origine :

Le monoxyde de carbone est considéré comme le polluant le plus abondant dans l'atmosphère, en particulier dans les atmosphères urbaines. Il provient de la combustion

incomplète des matières carbonées. En 1993, la production annuelle totale était estimée à 9,6 millions de tonnes. Il est principalement émis par les véhicules (59 %) et les chauffages défectueux (21 %) mais également par diverses activités industrielles comme les aciéries, les centrales thermiques. La part des véhicules dans la production de CO tend à diminuer, en effet, en 1988 leurs contributions à la génération de CO étaient de 80 % alors qu'aujourd'hui elle est de 59 %. L'amélioration des moteurs (rapport air/carburant) ainsi que l'arrivée prochaine des moteurs hybrides (gaz et essence) permettra une diminution encore plus marquée de la production de ce polluant par les véhicules.

#### ☞ *Pollutions générées :*

Le CO intervient indirectement dans la production de l'ozone troposphérique en permettant la production de NO<sub>2</sub> et en dégradant le NO responsable de la destruction de l'ozone [4] suivant les réactions ci-dessous :



#### ☞ *Effets sur la santé :*

Le monoxyde de carbone est un gaz incolore, inodore, insipide et non irritant. Il se mélange rapidement avec l'air sans stratification, ayant la même densité que l'air. Il a la propriété de se fixer sur la sixième coordination du fer des hémoprotéines et en particulier de l'hémoglobine, il forme ainsi le complexe carboxyhémoglobine incapable de se lier à l'oxygène. Son affinité pour l'hémoglobine est approximativement 240 fois plus importante que l'oxygène (Mofenson *et al.*, 1984). Ainsi, il en résulte une hypoxie tissulaire qu'aggrave la nature allostérique des hémoprotéines. En effet, la fixation d'une molécule de CO sur l'un des hèmes de la protéine tétramérique qu'est l'hémoglobine, augmente l'affinité des trois autres sous-unités pour l'oxygène. Il s'en suit une difficulté accrue de libération de l'oxygène au niveau tissulaire (Bryson, 1989). Le système nerveux central est particulièrement sensible à ce type d'intoxication qui, lorsqu'elle est chronique, se traduit par des troubles du comportement tels qu'une diminution de la vigilance, une perturbation des activités intellectuelles, une appréhension, des étourdissements, des troubles de la vision (Choi, 1983). Le CO peut également se lier à la myoglobine des muscles squelettiques et cardiaques (Dolan, 1985) engendrant une diminution des réserves d'oxygène disponible pour le myocarde (Zeller *et al.*, 1984). A de faible niveau de carboxyhémoglobine (5,5 %) les propriétés électro-physiologiques du cœur sont modifiées, générant une arythmie ou un arrêt de ce dernier (De Bias *et al.*, 1976, Raub *et al.*, 2000).

➤ **Principe de mesure : corrélation infrarouge (norme Afnor X 43-044)**

Le rayonnement émis par une source IR traverse alternativement une zone opaque, permettant d'obtenir le zéro électrique du détecteur, une zone saturée en CO pur qui correspond au signal de référence et celle remplie d'azote qui est le signal de mesure. Après sélection de la raie caractéristique d'absorption du CO ( $\lambda=4700$  nm) par un filtre optique, le faisceau traverse la chambre de mesure dans laquelle il est absorbé par le CO de l'échantillon.

### III-1.4. Les particules en suspension (PS)

➤ **Origine :**

Elles proviennent de l'érosion des sols, des véhicules, de l'incinération des déchets ou des combustions industrielles et ménagères. Les particules les plus fines peuvent transporter des composés toxiques tant organiques (hydrocarbures), qu'inorganiques (métaux lourds). Les effets sur la santé de ces PS dépendent de leurs diamètres et des composés qu'ils véhiculent.

➤ **Principe de mesure : jauge Bêta**

Par aspiration de l'air, les matières en suspension sont déposées sur un ruban filtre. Le débit d'aspiration de l'air est régulé automatiquement afin de compenser en permanence l'accroissement régulier de la perte de charge du au colmatage du filtre (Fig. I-3).

Le rayonnement bêta émis par une source radioactive (compteur Geiger-Muller, 100  $\mu$ Ci) est absorbé par collision avec les électrons dont la densité est proportionnelle à la masse volumique des matières rencontrées, indépendamment de la nature physico-chimique de celles-ci.

La mesure différentielle s'effectue par pesée d'une zone du ruban filtre avant et après formation du dépôt de poussières.

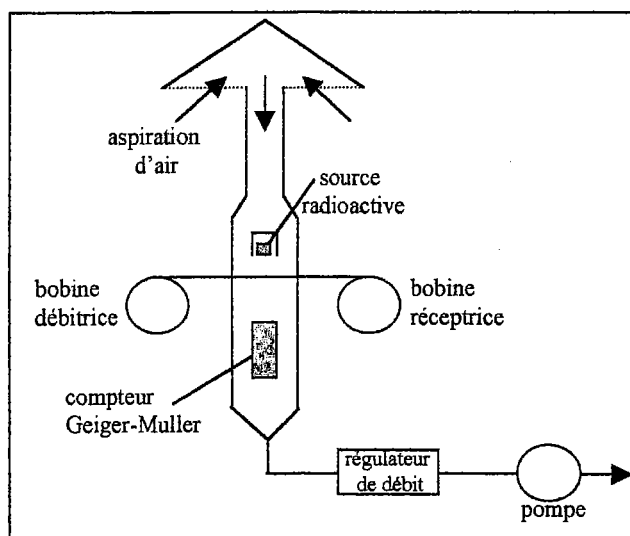


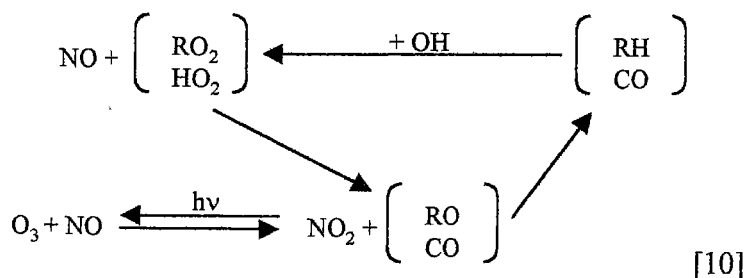
Figure I-3 : Jauge Bêta

### III-1.5. L'ozone (O<sub>3</sub>)

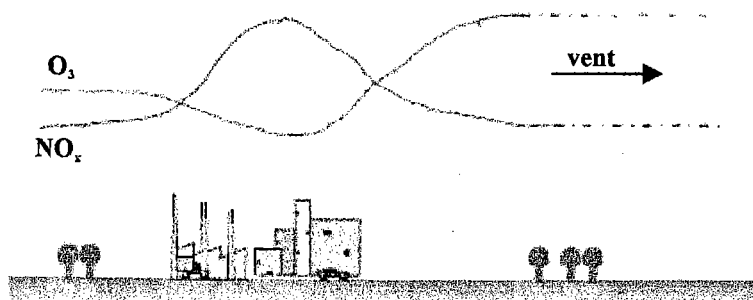
➤ **Origine :**

L'ozone est un composant naturellement créé dans la stratosphère (entre 20 et 40 km d'altitude) par action du rayonnement UV sur l'oxygène moléculaire. La couche d'ozone

ainsi constituée agit comme un filtre absorbant le rayonnement solaire nuisible aux organismes vivants (UV-B). Par contre, l'ozone est naturellement moins abondant dans la troposphère. En effet, dans cette partie de l'atmosphère, l'ozone est un polluant dit secondaire car il provient de la transformation de polluants primaires, en l'occurrence de la photodissociation du  $\text{NO}_2$  (2, 3). Toutefois, en présence de  $\text{NO}$ , l'ozone est rapidement détruit (4). Ainsi, la production d'ozone dans la troposphère est directement liée au rapport  $[\text{NO}_2]/[\text{NO}]$  et à l'intensité du rayonnement solaire absorbé par  $\text{NO}_2$ . Or, les trois réactions [2, 3, 4] sont extrêmement rapides. Il y aura donc production nette d'ozone uniquement lorsque le monoxyde d'azote est converti en dioxyde d'azote sans consommation d'ozone [10]. Cette réaction est réalisable par l'intermédiaire des radicaux hydroperoxydes, intermédiaires de l'oxydation du monoxyde de carbone et du méthane [9].



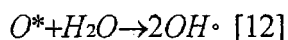
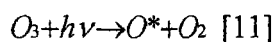
En conséquence, en zone urbaine où les hydrocarbures, et les oxydes d'azote sont présents en grande quantité, la production d'ozone est très importante. Une fois formée, cette molécule réagit avec le monoxyde d'azote dont l'apport est constant. L'ozone est donc consommé rapidement au niveau des agglomérations où il est généralement présent en faible quantité. Par contre, en s'éloignant des villes mais en restant sous le panache de la pollution, la quantité de précurseurs émis diminue. L'ozone ne réagit plus avec le  $\text{NO}$  alors que l'ensemble des autres réactions se poursuit lors du déplacement des masses d'air. De ce fait, la concentration en ozone augmente car ce dernier n'est plus détruit. L'ozone est donc présent en quantité plus importante dans les zones suburbaines et rurales qu'en zone urbaine (Fig. I-3).



**Figure I-4 : Evolution concomitante des niveaux d'ozone et de dioxyde d'azote selon l'activité anthropique**

### ☞ **Pollutions générées :**

La photolyse de l'ozone est la première source du radical hydroxyle ( $\text{OH}^\circ$ ) [11, 12] qui intervient dans la formation des acides sulfurique et nitrique. L'ozone contribue donc indirectement aux pluies acides.



L'ozone est également un polluant majeur des brouillards photochimiques dont les réactions sont résumées par l'équation 10 (Güsten, 1986).

### ☞ **Effets sur les organismes vivants**

L'ozone est un polluant phytotoxique qui ralentit la croissance, réduit la photosynthèse et accélère la sénescence foliaire de nombreuses plantes (Darall, 1989, Pell *et al.*, 1994). La dégradation de la ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase (RubisCO) est en partie responsable de la sénescence foliaire (Pell *et al.*, 1997). Cette dégradation ne permet plus l'assimilation du dioxyde de carbone.

Chez l'homme, l'ozone est un agent oxydant extrêmement puissant causant des dommages cellulaires directement sur les parois des voies respiratoires. Il agit préférentiellement dans les régions d'échanges gazeux du poumon (Walters et Ayres, 1996). Une exposition aiguë à l'ozone occasionne des lésions spécifiques du tractus respiratoire. Elles comprennent l'accumulation de macrophages dans les alvéoles proximales, une altération des cellules ciliées et des cellules épithéliales qui tapissent les sacs alvéolaires (Hippeli et Elstner, 1997). Par son pouvoir oxydant, l'ozone augmente la perméabilité de l'épithélium des voies respiratoires facilitant l'inhalation des polluants causant ainsi une bronchoconstriction (Lippmann, 1991). L'ozone provoque ainsi une diminution de l'endurance à l'effort mais également des nuisances olfactives, des effets lacrymogènes et des irritations des muqueuses (Lippmann, 1991).

### ☞ **Principe de mesure : absorption UV (norme Afnor X 43-024)**

Le principe de la mesure repose sur la mesure de l'absorption par l'ozone d'un rayonnement UV ( $\lambda=254 \text{ nm}$ ) émis par une lampe à vapeur de mercure.

- dans un premier temps, l'échantillon d'air passe sur un filtre catalytique réduisant l'ozone en oxygène avant de parcourir une chambre de réaction soumise au rayonnement UV.
- dans un second temps, l'échantillon d'air passe directement dans la chambre de réaction. La mesure de l'absorption lumineuse due uniquement à l'ozone est donnée par la différence entre les deux mesures.

Les techniques instrumentales de mesure de la qualité de l'air tendent à s'améliorer significativement ces dernières années. De nouveaux instruments apparaissent qui font appel à la spectroscopie d'absorption optique différentielle (DOAS, *Differential Optical Absorption Spectrometry*) et au laser (LIDAR, *LIght Detection And Ranging*), et qui permettent la mesure directe et simultanée de plusieurs polluants.

Les appareils basés sur la technique de DOAS sont apparus récemment (dans les années 1980) et présentent l'intérêt de mesurer simultanément plusieurs composés chimiques de l'atmosphère : SO<sub>2</sub>, NO, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, HNO<sub>2</sub> et benzène (Barrefors, 1997). Ils analysent l'absorption de la lumière UV ou visible par les composés chimiques de l'atmosphère, sur un chemin optique de plusieurs centaines de mètres, et déterminent leur concentration respective par analyse mathématique du spectre d'absorption. Actuellement l'acquisition par les réseaux de surveillance d'un tel équipement est limitée par le prix : environ 300 000 francs pour un multipolluants (3 polluants analysés) contre 70 à 100 000 francs pour un analyseur classique.

La technique du LIDAR, quant à elle, consiste à émettre des impulsions laser dans l'atmosphère et à analyser le rayonnement rétrodiffusé, à la même longueur d'onde, en fonction du temps, en utilisant les propriétés d'absorption et de diffusion de la lumière. Comparée aux autres techniques de mesures à long trajet optique (DOAS), qui fournissent des données intégrées de la pollution le long de ce trajet, la technique du LIDAR a une résolution spatiale de l'atmosphère plus grande car elle permet une analyse de l'atmosphère sur des distances de plusieurs kilomètres. Elle fournit en temps réel une carte détaillée, en trois dimensions, de la pollution atmosphérique. Cette technique permet la mesure de l'O<sub>3</sub>, du SO<sub>2</sub>, des NO<sub>x</sub>, du toluène, du benzène et des particules. Elle représente l'une des solutions les plus prometteuses en matière de contrôle de la qualité de l'air (Wolf et Woste, 1995, Ménard *et al.*, 1998).

Les performances de ces analyseurs de pollution atmosphérique doivent être déterminées avant leur utilisation en réseau. Pour cela, le Laboratoire Central de Surveillance de la Qualité de l'Air (LCSQA) expertise les instruments suivant une procédure d'évaluation selon la norme française X 20 300 comportant un protocole expérimental d'essais en laboratoire suivi d'un traitement des données.

### **III-2. Les polluants mesurés ponctuellement, cas particulier du benzène**

Les nouvelles directives européennes agrandissent la liste des polluants à mesurer par les réseaux de surveillance. En effet, en plus des 5 polluants sus-mentionnés, mesurés en routine et en continu dans tous les réseaux, il est devenu nécessaire de suivre les métaux lourds hors plomb (cadmium, nickel, arsenic et mercure), le benzène et les HAP.

À l'exception de quelques stations, les réseaux français ne mesurent pas ces polluants de façon routinière, faute de techniques adaptées. En effet, la législation progresse plus vite que les procédés de mesure applicables en réseau. Pourtant, la toxicité de ces polluants n'est plus à prouver.

Seul le benzène sera abordé ici, les HAP faisant l'objet d'un chapitre particulier.

#### ➤ *Origine du benzène :*

Les origines des pollutions par le benzène sont principalement imputables aux imbrûlés qui émanent de l'échappement des véhicules à essence et, dans une moindre mesure, aux phénomènes d'évaporation au niveau de différents organes des véhicules comme le réservoir et le carburateur. L'arrivée de l'essence sans plomb a aggravé la pollution par le benzène. En effet, pour remplacer les dérivés du plomb comme agents antidétonants, un haut indice d'octane de l'essence doit être recherché. Pour cela, il suffit d'augmenter, entre autres, la concentration des composés aromatiques comme le benzène, le toluène et le xylène, sans toutefois dépasser les limites autorisées par la loi (1 % depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2000).

#### ➤ *Effets sur la santé du benzène :*

Le benzène, par ses propriétés lipophiles peut servir de véhicule pour la pénétration dans le système nerveux de divers composés neurotoxiques (Bryson, 1989). Les effets aigus d'une intoxication par le benzène se caractérisent par une atteinte du système nerveux central (fatigue, céphalées, vertiges, faiblesses musculaires et insomnies), une irritation des voies respiratoires et des conjonctives oculaires ainsi que par des dermatoses d'irritation. Une intoxication chronique génère une toxicité hématologique par atteinte de la moelle osseuse, de la rate et des ganglions lymphatiques, qui se manifeste par une aplasie. Cette dernière est liée à la formation de métabolites réactifs (époxybenzène, radical superoxyde, hydroquinone) formés lors de l'oxydation en phénol, métabolites dont la concentration dans la moelle est très supérieure à celle trouvée dans le sang, entraînant une réduction progressive du taux de plaquettes, de globules rouges et blancs, pouvant conduire à une anémie grave, des infections secondaires et des hémorragies. Des atteintes de l'immunité humorale et cellulaire ont également été recensées, et des risques de leucémie (IARC, 1982).

#### ➤ *Principe de mesure du benzène :*

A l'inverse des polluants surveillés en continu, le suivi du benzène est réalisé, dans la majorité des cas, manuellement et sur une période de 24 heures. Le personnel du réseau de surveillance de la qualité de l'air effectue des prélèvements sur site par aspiration d'un volume connu d'air à travers des tubes de charbon actif. Le prélèvement réalisé, ils transmettent les

échantillons à un laboratoire d'analyse. Après désorption par Soxhlet, les composés aromatiques sont analysés par chromatographie en phase gazeuse suivie d'une détection à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme.

Un analyseur automatique de BTX (benzène, toluène et xylène) est également employé dans des campagnes de mesure. Cet instrument est totalement automatisé et analyse les BTX dans l'air ambiant à des niveaux de l'ordre du ppb. Le toluène et le xylène servent d'indicateur confirmant ou infirmant la justesse de la mesure. Effectivement, il y a normalement un facteur 3 entre le toluène et le benzène et entre le xylène et le benzène, ce qui permet de vérifier la bonne marche de l'appareil. Il permet la simultanéité des opérations d'adsorption et de désorption au niveau du module de piégeage, d'échantillonnage et d'analyse au niveau de l'instrument. Cet appareil permet la séparation et l'identification de ces polluants en 6 minutes.



*~ PARTIE II ~*

*Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques*

~ PARTIE II ~

*Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques*

<b>I- Origines.....</b>	<b>20</b>
I-1.1. Sources stationnaires.....	20
I-1.2. Sources mobiles.....	20
<b>II- Caractéristiques et niveaux des HAP des sources mobiles.....</b>	<b>21</b>
II-1. Nature des HAP des sources mobiles.....	21
II-2. Niveaux des HAP d'origine automobile.....	22
<b>III- Dispersion.....</b>	<b>24</b>
III-1. Poids moléculaire.....	24
III-2. Conditions météorologiques.....	25
III-2.1. Le vent.....	25
III-2.2. La température.....	25
III-2.3. Les saisons.....	25
<b>IV- Devenir des HAP dans l'atmosphère.....</b>	<b>26</b>
IV-1. Influence des paramètres météorologiques.....	26
IV-2. Interactions avec les polluants atmosphériques.....	27
IV-2.1. Réaction avec le radical hydroxyl.....	27
IV-2.2. Réaction avec l'anhydride nitrique.....	27
<b>V- Effets sur la santé.....</b>	<b>28</b>
<b>VI- Techniques de mesures.....</b>	<b>29</b>

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des molécules formées de deux à dix cycles benzéniques. Par leurs propriétés physico-chimiques, comme leur nature hydrophobe, ces composés sont stables et rémanents. Ils font partie des contaminants les plus toxiques identifiés depuis de nombreuses années. Parmi les 16 HAP spécifiés par l'EPA (*Environmental Protection Agency*) certains sont suspectés cancérigènes pour l'homme (IARC, 1987, **Tab. I-3**). L'impact du benzo[*a*]pyrène (BaP) sur les systèmes biologiques a été largement étudié (IARC, 1983) et c'est en raison de son caractère mutagène et cancérigène actuellement bien admis qu'il est fréquemment employé comme molécule modèle de cette famille de composés. Les HAP représentent une préoccupation constante de la vie actuelle. La surveillance et le contrôle des sources d'émission et des niveaux de ces composés, de même que, l'évaluation de leur impact sur l'environnement et la santé publique mobilisent les énergies du monde scientifique et politique. Ces composés ont été inclus très récemment (1996) dans la liste européenne des polluants atmosphériques pour lesquels une valeur limite doit être établie dans les trois ans à venir (European Communities, 1996).

**Tableau I-3 : Principales propriétés des 16 HAP référencés par l'EPA**

Nom	Abréviation	Nombre de cycles	Formule chimique	Poids moléculaire	Classe IARC <sup>a</sup>
Naphtalène	NAP	2	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	128	nt
Acénaphthylène	ACL	3	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>	154	nt
Acénaphthène	AC	3	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>	154	nt
Fluorène	FL	3	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	166	3
Phénanthrène	PHE	3	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178	3
Anthracène	AN	3	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178	3
Fluoranthène	FA	4	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202	3
Pyrène	PY	4	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202	3
Benzo[ <i>a</i> ]anthracène	BaA	4	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228	2A
Chrysène	CHR	4	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228	3
Benzo[ <i>b</i> ]fluoranthène	BbFA	5	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252	2B
Benzo[ <i>k</i> ]fluoranthène	BkFA	5	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252	2B
Benzo[ <i>a</i> ]pyrène	BaP	5	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252	2A
Dibenz[ <i>a,h</i> ]anthracène	DahA	5	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	278	2A
Indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]pyrène	IP	6	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	276	2B
Benzo[ <i>g,h,i</i> ]pérylène	BghiP	6	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	276	3

<sup>a</sup>Cancérogénicité selon l'IARC (*International Agency for Research on Cancer*) (1987). Groupe 2A : cancérigène probable pour l'homme ; groupe 2B : cancérigène possible pour l'homme ; groupe 3 : non classé comme cancérigène. nt: non testé.

## **I- Origines**

Les HAP sont formés au cours de la combustion incomplète des matériaux organiques contenant du carbone et de l'hydrogène. Ils proviennent de sources naturelles mais également anthropiques. Avant le commencement de l'industrialisation et la prolifération des moyens de transport, il existait un équilibre entre la production naturelle et la dégradation des HAP, qui entraînait un niveau faible mais stable de la quantité de ces composés dans l'environnement. Cet équilibre a été malheureusement détruit par le développement des industries et l'accroissement des véhicules à travers le monde.

Les sources naturelles de HAP incluent :

- les phénomènes de combustion, tels que les feux de forêts, et l'activité des volcans,
- les activités de conversion biologique de certains composés.

Il est estimé que 90 % de la concentration en HAP dans l'environnement provient de sources anthropiques. Toutefois, les sources naturelles (volcan, feux de forêt) contribuent significativement à cette pollution durant des périodes très limitées et très bien identifiées (Baek *et al.*, 1991).

### **I-1.1. Sources stationnaires**

L'incinération des déchets (Yasuda *et al.*, 1998) et les activités industrielles, telles que les exploitations minières, la production d'énergie, la pétrochimie (Tsai *et al.*, 1995) sont des sources importantes en HAP dans des zones assez bien localisées. En ambiance urbaine, il faut principalement prendre en considération le chauffage domestique (Launhard *et al.*, 1998) qui avec les véhicules sont couramment reconnus comme les deux principales sources de la pollution par les HAP (Menichini, 1992).

### **I-1.2. Sources mobiles**

Les principales sources mobiles en milieu urbain sont évidemment les véhicules. Les HAP proviennent pour une partie de la combustion incomplète des carburants (diesel, essence, kérosène).

Il est extrêmement délicat d'identifier la ou les sources de HAP dans une atmosphère urbaine. Toutefois, Pistikopoulos *et al.* (1990) ont tenté d'évaluer, par l'adaptation d'un modèle mathématique, la contribution du chauffage domestique, des véhicules à essence et diesel dans la pollution par les HAP dans l'air de la ville de Paris. Les résultats montrent que les véhicules à essence contribuent à la pollution en HAP pour 42% en hiver et 72% en été, les véhicules diesel pour respectivement 25% et 40% et enfin, le chauffage domestique pour 30% et 2%. Les sources mobiles étant l'une des causes principales de la pollution de l'atmosphère urbaine par ces

composés, il nous a semblé fondamental pour notre étude d'affiner nos connaissances sur ce thème.

## **II- Caractéristiques et niveaux des HAP des sources mobiles**

Le taux d'émission et la nature des HAP des sources mobiles sont influencés par de nombreux paramètres tels que la teneur en aromatiques du lubrifiant et des carburants, l'utilisation d'une essence plombée ou non, la charge du véhicule, la combustion de l'huile du moteur, la vitesse de conduite, le rapport air/fioul, le comportement au démarrage à froid et le type de véhicule (Bruinsma *et al.*, 1988 et Mi *et al.*, 1996).

### **II-1. Nature des HAP des sources mobiles**

Une attention particulière est donnée à la composition des carburants, qui est incontestablement un facteur primordial dans l'émission des HAP. Sont également prises en considération l'amélioration de la formulation de ces combustibles et celle de l'équipement des véhicules qui tendent à évoluer afin de satisfaire les nouvelles réglementations exigeant la réduction des émissions nocives.

L'une des principales causes de l'augmentation des émissions de HAP provient de l'incitation, dans les années 90, par les autorités à l'utilisation de carburants sans plomb. En effet, afin de maintenir le pouvoir antidétonant des combustibles dépourvus de plomb, il est nécessaire d'accroître la quantité de HAP qui est environ 43 % plus forte dans l'essence non plombée que dans l'essence plombée (Mi *et al.*, 1996). Ainsi, la concentration totale en HAP (gaz et particules) des gaz d'échappement est comprise entre 258 et 385  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  pour l'essence sans plomb à indice d'octane 95 et, 190 et 263  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  pour l'essence plombée (Brown *et al.*, 1996).

La proportion des véhicules utilisant de l'essence ou du carburant diesel a également une influence sur la distribution des différents types de HAP dans l'atmosphère. Pour ces deux types de combustibles, le naphthalène (NAP) est le HAP prédominant : 2 600 mg/L pour l'essence et 1 600 mg/L pour le diesel. Il représente environ 97 % de la concentration totale en HAP (Lee *et al.*, 1995 et Marr *et al.*, 1999). Toutefois, ces valeurs de concentrations sont à prendre avec précautions car elles dépendent des opérations de raffinage, et sont donc variables d'une marque à une autre. Néanmoins, quelle que soit la marque considérée, 15 HAP (liste de l'EPA sans DahA) ont été détectés dans toutes les essences testées alors que seulement 9 ont été détectés dans le diesel. Le diesel est principalement composé de HAP à trois cycles alors que l'essence contient des HAP de 4 à 5 cycles (Marr *et al.*, 1999).

La connaissance de la composition du fioul ne présuppose cependant pas de la composition des gaz émis. Les véhicules à essence se distinguent par l'émission de HAP lourds tels que le

coronène et le benzo(*ghi*)pérylène (Mascllet *et al.*, 1986). Les émissions des véhicules diesels se caractérisent par la présence de HAP légers tels que le phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène. Cependant, parmi dix HAP mesurés dans des gaz d'émission, seuls quatre d'entre eux se retrouvaient dans la composition originelle du diesel. Cette observation suggère que les HAP présents dans les gaz émis ont également comme origine possible les huiles lubrifiantes (Marr *et al.*, 1999), ou peuvent être générés par une combustion incomplète des carburants (Lee *et al.*, 1995).

## II-2. Niveaux des HAP d'origine automobile

Dès 1993, Rogge et ses collaborateurs ont mis en évidence l'impact de l'utilisation du pot catalytique dans la réduction des émissions (Tab. I-4). En effet, la tendance à la généralisation du pot catalytique depuis 1993 serait l'un des paramètres responsables de la diminution des HAP dans l'atmosphère selon les données recueillies au Danemark entre 1992 et 1996 (Nielsen *et al.*, 1999) et en Italie entre 1994 et 1998 (Menichini *et al.*, 1999). Mais, malgré cette diminution des HAP, la contribution du trafic dans la pollution reste approximativement identique entre 1992 (90 %) et 1996 (80 - 90 %) (Nielsen *et al.*, 1999).

**Tableau I-4 : Effet de la nature du pot d'échappement sur l'émission de HAP par les véhicules roulant à l'essence (Rogge *et al.*, 1993)**

Types de HAP	pot normal	pot catalytique
phénanthrène	17,3	0,88
anthracène	5,1	0,11
méthylphénanthrène - anthracène	42,2	1,9
diméthylphénanthrène - anthracène	75,5	3
fluoranthène	48,3	1
pyrène	31	2,5
benzacénaphthalène	16,5	0,77
méthylfluoranthènes – méthylpyrène	106,9	4,2
benzo( <i>a</i> )fluorène - benzo( <i>b</i> )fluorène	31	0,72
benzo( <i>ghi</i> )fluoranthène	24,7	1,3
cyclopentano( <i>cd</i> )pyrène	49,3	1,7
benzo( <i>a</i> )anthracène	73,8	1,9
chrysène	55,8	3,8
méthylbenz( <i>a</i> ) -anthracène -chrysène -triphénylènes	143,5	3,4
diméthylfluoranthènes – diméthylpyrènes	161,1	4,1
benzo( <i>k</i> )fluoranthène	40,7	2
benzo( <i>b</i> )fluoranthène	37,9	2,9
benzo( <i>e</i> )pyrène	45,8	2
benzo( <i>a</i> )pyrène	43,5	1,9
perylène	14	0,6
indéno(1,2,3- <i>cd</i> )pyrène	6,4	0,47
indéno(1,2,3- <i>cd</i> )fluoranthène	32,6	1,7
benzo( <i>ghi</i> )perylène	145,4	4,7
coronène	104,6	11

Les valeurs d'émissions sont indiquées en µg/km

La concentration totale de HAP (phase gazeuse et particulaire) dans une ambiance routière à Taiwan (octobre 1991 à août 1992) est de l'ordre de 4 500 à 11 300 ng/m<sup>3</sup> avec une valeur

moyenne de 8 110 ng/m<sup>3</sup>. Dans ce cas précis, le naphthalène (3 040 ng/m<sup>3</sup>) est largement dominant suivi par le fluorène (265 ng/m<sup>3</sup>) et l'acénaphthène (192 ng/m<sup>3</sup>). Pour comparaison, l'atmosphère de Chicago en juin-octobre 1995 comporte de 159 à 863 ng/m<sup>3</sup> de HAP totaux avec une moyenne de 428 ± 240 ng/m<sup>3</sup>, donc des valeurs 19 fois plus faibles qu'à Taiwan. Ces émissions sont dominées par les HAP volatils (phénanthrène, 46% ; acénaphthène, 18% et fluorène, 17%), qui correspondent à 91 % de la part des HAP totaux (Odabasi *et al.*, 1999). Malgré des niveaux d'émission extrêmement différents entre Chicago et Londres, cette prépondérance des HAP volatils a également été mise en évidence à Londres en 1991-1992 où le phénanthrène (30%), le fluoranthène (20%) et le pyrène (20%) représentent environ 70% des HAP totaux (Brown *et al.*, 1996) (Tab. I-5).

**Tableau I-5 : Concentrations moyennes des HAP dans l'atmosphère de différentes villes**

HAP	Londres <sup>c</sup>	Birmingham <sup>d</sup>		Hradec Kralové <sup>e</sup>		Chicago <sup>f</sup>
	Janvier 91 - Juillet 92	Eté	Hiver	Eté 1995	Hiver 1996	Juin - Octobre 1995
Naphtalène		1,87 ± 2,02	13,2 ± 10,8	10,8 ± 10,3	110,7 ± 42,4	
Acénaphthylène		2,72 ± 3,09	15,4 ± 18,6			
Acénaphthène		4,23 ± 3,04	13,5 ± 14,5			76,9 ± 46,2
Fluorène		7,00 ± 5,38	13,7 ± 10,8			74,8 ± 43,7
Phénanthrène <sup>b</sup>	23,67 ± 19,06	3,84 ± 3,72	24,1 ± 15,6	50,3 ± 48,1	61,4 ± 23,5	200,3 ± 104,8
Anthracène	2,20 ± 5,33	0,61 ± 0,44	4,49 ± 3,71	5,6 ± 5,4	8,3 ± 3,2	14,1 ± 11,9
Fluoranthène <sup>b</sup>	16,14 ± 22,0	2,11 ± 1,26	12,4 ± 12,1	20,5 ± 20,0	26,3 ± 10,1	44,1 ± 24,0
Pyrène <sup>b</sup>	16,42 ± 18,62	3,33 ± 2,17	38,0 ± 21,7	12,1 ± 11,6	20,5 ± 7,9	24,6 ± 14,7
Benzo[a]anthracène	3,60 ± 2,62	0,34 ± 0,17	5,59 ± 3,03	0,3 ± 0,3	3,7 ± 1,4	2,1 ± 1,3
Chrysène	5,67 ± 4,71	0,61 ± 0,34	6,49 ± 2,67	0,9 ± 0,9	6,7 ± 2,6	3,6 ± 1,5
Benzo[b]fluoranthène	2,10 ± 2,09	0,38 ± 0,24	2,15 ± 1,61	0,6 ± 0,6	5,0 ± 1,9	2,3 ± 1,4
Benzo[k]fluoranthène	2,00 ± 2,30	0,16 ± 0,009	1,2 ± 0,19	0,1 ± 0,1	2,6 ± 1,0	1,9 ± 1,2
Benzo[a]pyrène	1,95 ± 1,69	0,25 ± 0,20	0,81 ± 0,65	0,6 ± 0,6	5,0 ± 1,9	1,6 ± 1,0
Dibenz[a,h]anthracène	0,13 ± 0,20	0,07 ± 0,06	0,83 ± 0,60		1,3 ± 0,5	
Indeno[1,2,3-cd]pyrène	2,58 ± 2,31	0,42 ± 0,48	1,96 ± 1,25	1,4 ± 1,3	5,5 ± 2,1	1,2 ± 0,7
Benzo[g,h,i]pérylène <sup>a</sup>	3,06 ± 2,72	0,76 ± 0,52	1,97 ± 1,34	1,3 ± 1,2	4,0 ± 1,5	1,1 ± 0,7
Coronène <sup>a</sup>	1,62 ± 1,47	0,27 ± 0,21	1,03 ± 0,92			

Les concentrations des 16 HAP de l'EPA, complétées par celles du coronène, sont données en ng/m<sup>3</sup> et correspondent aux HAP en phase particulaire et gazeuse.

<sup>a</sup> Indicateur des véhicules circulant avec de l'essence.

<sup>b</sup> Indicateur des véhicules circulant avec du diesel.

<sup>c</sup> Brown *et al.*, 1996. Prélèvement dans une rue de Londres délimitée par des immeubles de 15 m de hauteur, avec un trafic modéré d'environ 15 000 à 17 000 véhicules/heure, au pic de la journée.

<sup>d</sup> Smith et Harrison, 1996. Echantillonnage sur le toit d'immeubles d'une hauteur de 15 m, situés à 300 m de l'artère principale de Birmingham.

<sup>e</sup> Vyskocil *et al.*, 1997. Collecte des échantillons d'air au centre d'une ville de République Tchèque.

<sup>f</sup> Odabasi *et al.*, 1999. Prélèvement à 1,6 m de hauteur et à 5,6 km du centre de Chicago. A proximité du site se situent un parking et des immeubles de faible hauteur.



Comme le montre le **tableau I-5**, la concentration des HAP dans l'atmosphère est variable d'une étude à une autre. En effet, pour un même site le niveau des polluants dans l'atmosphère dépend des conditions météorologiques, donc des saisons, mais également du calendrier de l'échantillonnage. Ainsi, la contribution des HAP dans la pollution atmosphérique urbaine est de 90% les jours de travail et de 60% en fin de semaine (Nielsen, 1996). De plus, la diversité des techniques analytiques employées par les auteurs rend les comparaisons inter-études extrêmement délicates (Menichini, 1992).

En résumé, la concentration en HAP dans l'atmosphère est influencée par des paramètres propres à la source émettrice, par les conditions de dispersion mais également par la susceptibilité des HAP à être transformés chimiquement dans l'atmosphère au cours des processus de dispersion.

### **III- Dispersion**

Le taux de dispersion des polluants est influencé par plusieurs facteurs. Les principaux sont l'état physique des particules, les conditions météorologiques (la direction du vent et sa vitesse, le gradient de température...), la topographie du site (rue étroite bordée d'immeubles, boulevard...), la distance à la source, l'intensité du trafic et le régime du véhicule.

D'après Smith *et al.* (1996), les HAP se trouvent dans l'atmosphère sous deux formes physiques : en phase particulaire et en phase gazeuse. La répartition des HAP entre ces deux phases dépend de la température, de l'humidité de l'air, des propriétés d'adsorption des surfaces, de la disponibilité de surfaces adsorbantes, du poids moléculaire et de la pression de vapeur des HAP (Masclat *et al.*, 1986).

#### **III-1. Poids moléculaire**

En général, 99 % des HAP de poids moléculaire inférieur à 228 se présentent sous forme vapeur, contrairement aux autres HAP qui sont physiquement adsorbés à la surface des particules (Tsai *et al.*, 1995, Lee *et al.*, 1995, Marr *et al.*, 1999). Ainsi, le fluoranthène et le pyrène sont équitablement distribués entre les 2 phases (Marr *et al.*, 1999). Quant au benzo[*a*]anthracène (BaA, PM = 228) il peut se trouver dans la phase vapeur lorsque la température ambiante est très importante (Menichini *et al.*, 1999).

A la sortie des gaz d'échappement, 82 % des HAP sont sous forme gazeuse et le reste étant sous forme particulaire (Mi *et al.*, 1996). L'équilibre entre ces 2 phases tend vers la phase particulaire essentiellement dans les atmosphères routières en comparaison aux sites urbains et ruraux (Smith *et al.*, 1996). Cette différence est probablement due au fait que les HAP émis sous



forme gazeuse se refroidissent au contact de l'air ambiant, la majeure partie d'entre eux s'incorporant alors à des particules par adsorption ou par condensation.

Lors du transport de ces particules, une fraction des HAP adsorbés peut subir des réactions d'altération, se déposer ou repasser en phase gazeuse pour atteindre un équilibre thermodynamique (Lee *et al.*, 1995).

## **III-2. Conditions météorologiques**

### **III-2.1. Le vent**

Les différentes composantes du vent jouent un rôle majeur dans la dispersion des polluants. Ainsi, les concentrations atmosphériques de BaP mesurées à Athènes diminuent d'un facteur trois en hiver lorsque le vent passe d'une vitesse de  $1,5 \text{ m.s}^{-1}$  à  $4,5 \text{ m.s}^{-1}$ , le maximum de concentration étant observé quand le vent est calme et qu'il y a une inversion de température (Viras *et al.*, 1987).

### **III-2.2. La température**

L'état thermique de l'atmosphère peut favoriser ou réduire la dispersion verticale des polluants. En effet, c'est le gradient de température qui contrôle les mouvements ascendants et descendants des particules dans l'air (Nakajima *et al.*, 1995).

La pression de vapeur des molécules dépendant de la température, ce paramètre contrôle également l'équilibre entre la phase particulaire et la phase gazeuse. L'augmentation de la température diminuera donc les HAP en phase particulaire (Odabasi *et al.*, 1999). Cette propriété a permis à ces auteurs de classer les HAP en 4 groupes en fonction de leur pression de vapeur :

Groupe 1 : de l'acénaphthalène au phénanthrène

Groupe 2 : de l'anthracène au pyrène

Groupe 3 : du benzo[*a*]anthracène au benzo[*k*]fluoranthène

Groupe 4 : du benzo[*a*]pyrène au benzo[*g,h,i*]perylène.

Le groupe 1 est principalement associé à la phase gazeuse au contraire du groupe 4 qui est associé à la phase particulaire. Ces deux groupes ne varient pas significativement avec la température à l'inverse des groupes 2 et 3 qui sont logiquement sensibles à ce paramètre.

### **III-2.3. Les saisons**

Une étude bibliographique comparative réalisée par Menichini en 1992 a révélé des niveaux de HAP dans l'atmosphère généralement plus importants dans la période hivernale que dans la période estivale : augmentation des HAP en hiver d'un facteur 2 à 5 en Europe (dans les années 1980), 2 à 10 en Amérique du Nord et Australie (1970 et 1980) et 2 dans une ville

Japonaise (1978). Ces observations ont été confirmées plus récemment par l'étude de l'atmosphère urbaine à Birmingham (Smith *et al.*, 1996) où un facteur de 4,9 a été rapporté entre l'hiver et l'été pour la phase particulaire et de 5,5 pour la phase gazeuse. Ce même rapport entre hiver et été a été relevé en république Tchèque (Vyskocil *et al.*, 1997), en Allemagne (Fromme *et al.*, 1998) et en Belgique (Wauters *et al.*, 1999). Cet enrichissement de la phase gazeuse en hiver est loin d'être un phénomène totalement élucidé. En effet, l'étude de Brown *et al.* (1996) réalisée dans une rue étroite de Londres montre que la plupart des HAP sont en concentration plus forte en hiver à l'exception de certains HAP de faible poids moléculaire, comme le fluoranthène et le pyrène, qui au contraire présentent une concentration nettement plus importante en été.

Différents facteurs, probablement concomitants, peuvent expliquer cet enrichissement de l'atmosphère en HAP durant la période hivernale. Parmi ces derniers, le plus probable est une augmentation des émissions par le chauffage domestique couplée aux conditions météorologiques défavorables à la dispersion (inversions de température), aux véhicules dont le moteur tourne plus longtemps hors de son équilibre thermique et enfin aux transformations photochimiques qui sont négligeables en hiver.

#### **IV- Devenir des HAP dans l'atmosphère**

Les HAP sont des molécules hautement réactives, ayant une place importante, malgré leurs faibles concentrations, dans la chimie de l'atmosphère. Cette réactivité a tout d'abord été mise en évidence lors de prélèvements d'échantillons. En effet, il a été observé que lorsque cette manipulation dure longtemps, la perte en HAP est très importante. Cette perte a été attribuée en premier lieu à la volatilité de ces molécules, et ensuite à leur transformation par des réactions photochimiques et/ou chimiques.

Bien que ces mécanismes de transformation des HAP ne soient pas encore totalement élucidés, en raison de la difficulté à simuler en laboratoire les réactions susceptibles de se produire dans l'atmosphère, nous tenterons d'en aborder quelques uns dans ce chapitre.

##### **IV-1. Influence des paramètres météorologiques**

Nous avons précédemment relevé que certains paramètres météorologiques tels que le vent et la température ont une influence non négligeable sur la dispersion des HAP. D'autres, tels que les rayonnements lumineux et l'humidité, par contre, agissent plus précisément sur les réactions de transformation de ces molécules.

Des essais en chambre contrôlée ont montré que l'augmentation de l'intensité lumineuse, de l'humidité ou de la température accroît la rapidité de transformation des HAP sous forme particulaire. Cette vitesse est d'autant plus importante que la concentration en HAP à la surface

des particules est faible (Kamens *et al.*, 1988). Pour une concentration en HAP élevée, les auteurs supposent que la majeure partie des HAP se trouve dans les particules. Ainsi, si la vitesse de transfert des HAP entre l'intérieur et la surface des particules est plus faible que celle de la réaction, celle-ci limitera la perte de ces composés. Les propriétés physiques et chimiques des vecteurs particulaires jouent également un rôle dominant dans les réactions de photolyse. Ainsi, une quantité de carbone supérieure à 5 % stabilise les HAP adsorbés. De même, plus la couleur de la particule est sombre, plus elle va absorber la lumière incidente et donc réduire le taux de dégradation des HAP (Korfmacher *et al.*, 1981, Behymer et Hites, 1985 et 1988). La porosité, la taille, le pH et la quantité de fer des particules semblent être, pour leur part, des paramètres négligeables (Kamens *et al.*, 1988).

L'étude de l'influence de ces paramètres météorologiques a permis d'identifier le cyclopenta[*cd*]pyrène comme HAP le plus réactif, suivi en cela par le benzo[*a*]anthracène et le benzo[*a*]pyrène.

## **IV-2. Interactions avec les polluants atmosphériques**

L'interaction des HAP avec les polluants primaires (NO, NO<sub>2</sub> et SO<sub>2</sub>) mais également avec les polluants secondaires (OH° et O<sub>3</sub>) génère des composés suspectés d'être plus toxiques que les HAP d'origine (Hall *et al.*, 1999).

### **IV-2.1. Réaction avec le radical hydroxyl**

Le radical hydroxyl (OH°) provient principalement de la photolyse de l'ozone et des acides nitreux (HONO). La présence de ce radical au sein de l'atmosphère, couplée à celle des NO<sub>x</sub>, génère la formation de quinones et de dérivés nitrés de HAP, molécules hautement réactives, qui ne sont pas ou très faiblement émises.

La réaction du naphthalène avec le radical OH° en chambre de simulation produit le 1-nitronaphthalène, le 2-nitronaphthalène et la 1,4-naphtoquinone (Atkinson *et al.*, 1987, Bunce *et al.*, 1997). La réaction en phase gazeuse entre le radical OH° et les HAP de deux et trois cycles est extrêmement rapide. En présence d'une concentration en OH° de 10<sup>-6</sup> cm<sup>-3</sup> la durée de vie du naphthalène est d'environ 12 h alors que celle du phénanthrène et de l'anthracène est respectivement de 9 et 2 h. Une augmentation de concentration des ions hydroxyles se traduit par une diminution de la stabilité des HAP (Biermann *et al.*, 1985).

### **IV-2.2. Réaction avec l'anhydride nitrique**

Les dérivés nitrés des HAP peuvent également être générés par réaction des HAP avec l'anhydride nitrique (N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) (Atkinson *et al.*, 1987), gaz qui est en équilibre avec NO<sub>3</sub>, dont les précurseurs sont l'ozone et le dioxyde d'azote.

Durant la nuit, dans des conditions de faible humidité, une forte quantité de  $N_2O_5$  est observée dans un air pollué. La quantité présente dans l'atmosphère est proportionnelle à la concentration en  $O_3$  (son précurseur) et inversement proportionnelle à celle en  $NO$  qui détruit l'ozone. Dans ces conditions, la nitration des HAP par ce composé est le mécanisme principal de formation des nitro-HAP. Ce processus est négligeable, par rapport à la réaction avec le radical hydroxyl, sauf lorsque les concentrations en  $OH^\circ$  sont très faibles (Masclat et Mouvier, 1988). Les durées de vie des HAP en présence du  $N_2O_5$ , sont de l'ordre de quelques dizaines de jours.

Les concentrations des nitro-HAP sont plus fortes l'été bien que les précurseurs soient moins abondants. Ceci est dû à un accroissement des vitesses de réactions de transformations des HAP en nitro-HAP. Ces concentrations sont comprises entre  $2 \text{ pg/m}^3$  pour les plus lourds et  $500 \text{ pg/m}^3$  pour les plus légers (Wortham *et al.*, 1992).

La majorité de ces produits, formés par réaction en phase gazeuse, est ensuite adsorbée sur des particules. Cette adsorption tend à les stabiliser et, si elle se produit sur des particules respirables, augmente les risques pour la santé publique (Bunce *et al.*, 1997).

## V- Effets sur la santé

Des expérimentations réalisées *in vivo* ont montré que la plupart des HAP produisent des tumeurs. Ainsi, le benzo[a]pyrène génère des effets cancérigènes chez les animaux après administration orale, injection intra-péritonéale, injection sub-cutanée, inhalation ou après application directe sur la peau (IARC, 1983). Outre le pouvoir mutagène et cancérigène qu'exercent les HAP (Tab I-3), de nombreux effets toxicologiques ont été mis en évidence au cours d'expérimentations *in vivo*. Parmi ces derniers, citons la toxicité sur la moelle osseuse (Nebert *et al.*, 1980) et sur le système reproducteur (Legraverend *et al.*, 1984). L'exposition au HAP de souris gestantes a provoqué sur leur progéniture non seulement des tumeurs (Urso et Gengozian, 1980), mais également des atrophies testiculaires (Payne, 1958).

Dans notre environnement, la pollution atmosphérique est, en dehors de l'émission de fumée de cigarette, la principale source d'exposition humaine aux HAP. Les voies de contamination peuvent être directes telles que la voie respiratoire et cutanée ou indirectes par ingestion de végétaux contaminés (Menzie *et al.*, 1992, Smith *et al.*, 1995). Les HAP présents dans l'atmosphère urbaine proviennent majoritairement des gaz d'échappement qui contiennent environ une centaine de substances soit sous forme gazeuse soit sous forme particulaire. Le monoxyde de carbone, le dioxyde de carbone, le dioxyde de soufre et le monoxyde d'azote représentent la phase gazeuse. La phase particulaire est constituée essentiellement d'éléments

métalliques. Les HAP, pour leur part, se retrouvent dans les deux phases. L'Agence Internationale sur la Recherche sur le Cancer (IARC, 1989) a classé les émissions diesel comme probablement cancérigènes pour l'homme (groupe 2A) et les émissions des véhicules à essence comme un cancérigène possible pour l'homme (groupe 2B). L'exposition de rats à une pollution urbaine a également permis d'attribuer à cette atmosphère un rôle significatif dans le développement de cancers du poumon (Reymao *et al.*, 1997). Ces différentes études prouvent un probable impact de la pollution atmosphérique sur la santé, mais ne permettent pas d'attribuer ces effets à un ou plusieurs polluants en particulier. Néanmoins, l'implication des HAP a été suggérée comme étant une des causes du développement de cancers de la prostate après une exposition aux gaz d'échappement de véhicules diesels (Seidler *et al.*, 1998), ainsi que de cancers du poumon à Copenhague (Nielsen *et al.*, 1996) et dans le nord de l'Estonie (Hemminki *et al.*, 1999). De même, ces polluants semblent être les principaux responsables d'altération du développement du fœtus (Sram *et al.*, 1999).

Toutefois, des études complémentaires sont nécessaires pour élucider et certifier au mieux les effets spécifiques des HAP dans le cadre de la pollution atmosphérique qui est, extrêmement complexe. Autant au niveau de l'expérimentation animale, les actions mutagènes, cancérigènes et toxicologiques des HAP sont très bien connues, autant dans le cas d'une ambiance routière de nombreuses études épidémiologiques restent à réaliser.

## **VI- Techniques de mesures**

Les techniques de mesure des HAP dans l'atmosphère nécessitent encore de nombreuses améliorations avant de pouvoir être employées en routine. Les HAP se trouvant sous forme particulaire et gazeuse, un prélèvement sur filtre et un autre sur mousse de polyuréthane sont essentiels pour l'analyse respective des HAP en phase particulaire et en phase gazeuse. Pour les prélèvements ainsi réalisés sur sites, les mêmes étapes d'extraction et d'analyse décrites pour le suivi du benzène sont alors requises. Le coût de mesures quotidiennes devient alors rapidement exorbitant.

A notre connaissance, seul un appareil permet la mesure instantanée de la concentration massique de HAP adsorbés sur les poussières (PAS 2000 EcoChem, ECOMESURE). L'intérêt du PAS 2000 est de prélever en continu un échantillon d'air et d'analyser sélectivement la quantité de HAP adsorbée sur les particules. Le principe repose sur l'ionisation photoélectrique des poussières. Si une particule en suspension est irradiée par un faisceau UV, la particule émet un photoélectron et devient une particule positivement chargée. Les particules atmosphériques, elles-mêmes, ne sont pas susceptibles de photoémission. Par contre, les HAP adsorbés sur les

particules sont facilement photoionisés. La sensibilité de cette méthodologie est de 3 ng/m<sup>3</sup> de HAP adsorbés. L'inconvénient majeur de cet appareil est qu'il nécessite un étalonnage régulier sur site, réalisé par la technique manuelle décrite précédemment. De plus, il ne permet pas l'identification des différents HAP et fournit des données uniquement pour la phase particulaire.

*~ Partie III ~*

*Systèmes de Biotransformation des Xénobiotiques -*

*Applications en tant que Biomarqueurs*

~ PARTIE III ~

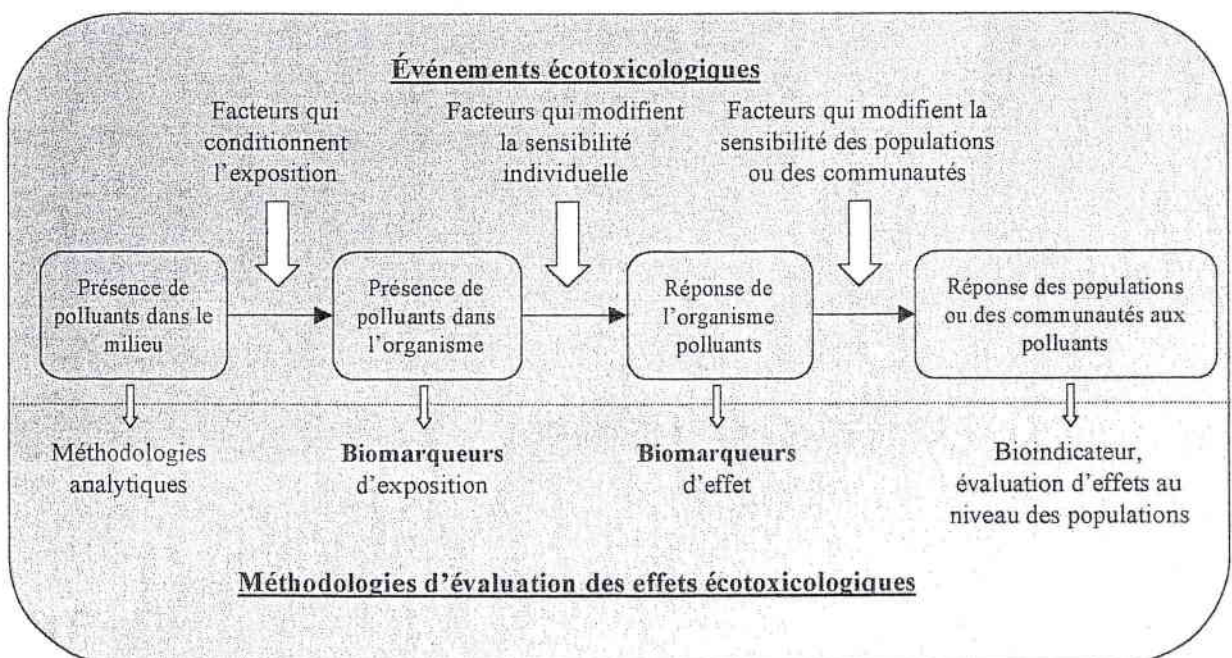
*Systèmes de biotransformation des xénobiotiques - Application en tant que Biomarqueurs*

<b>I- Les biomarqueurs.....</b>	<b>32</b>
<b>II- Systèmes de biotransformation des xénobiotiques chez les animaux, cas particulier des mollusques.....</b>	<b>33</b>
II-1. Vue d'ensemble du métabolisme des xénobiotiques.....	33
II-2. Le système du cytochrome P450 .....	36
II-2.1. Caractéristiques générales et mécanisme réactionnel.....	36
II-2.2. La famille multienzymatique des cytochromes P450 .....	40
II-2.3. Mécanisme d'induction .....	42
II-3. Les enzymes du système du glutathion.....	44
II-3.1. Le glutathion .....	44
II-3.2. Les glutathion S-transférases, GST .....	46
II-3.3. Les glutathion peroxydases, GPX.....	49
II-3.4. La glutathion réductase, GR.....	50
II-4. Inductibilité par les HAP chez les invertébrés, cas particulier des mollusques.....	51
<b>III- Métabolisme des xénobiotiques chez les végétaux, cas particulier des bryophytes.....</b>	<b>55</b>
III-1. Le cytochrome P450, CYP .....	55
III-2. Les enzymes associées au glutathion.....	56
III-2.1. Le glutathion, GSH.....	56
III-2.2. Les glutathion S-transférases, GST.....	58
III-2.3. La glutathion peroxydase, GPX.....	60
III-2.4. La glutathion réductase, GR .....	60
III-3. L'ascorbate et l'ascorbate peroxydase.....	61
III-3.1. L'ascorbate, Asc.....	61
III-3.2. L'ascorbate peroxydase, APX.....	61
III-4. La catalase, CAT .....	63
III-5. Localisation préférentielle des antioxydants.....	64
III-6. Inductibilité par les HAP .....	64



Actuellement, l'évaluation de la qualité de l'air repose essentiellement sur la mesure directe des polluants réglementés dont le nombre augmente constamment en raison d'un contexte législatif de plus en plus exigeant. Cependant, la mise en œuvre des méthodes de mesure correspondantes n'est pas toujours possible en raison de la complexité et du coût des techniques, des propriétés du ou des polluants recherchés, mais également de leurs niveaux de concentration qui peut se situer en deçà du seuil de détection des appareils actuels. En tout état de cause, ces mesures ne donnent aucune information sur les risques toxiques et la biodisponibilité des substances surveillées. C'est pourquoi, il s'avère nécessaire de mettre au point de nouvelles techniques de détection qui se doivent d'être, soit un complément aux mesures purement analytiques, soit un palliatif aux déficiences techniques. Dans cette perspective, le recours aux organismes vivants (animaux et végétaux) offre une alternative intéressante. Mis en contact avec un polluant, un organisme réagit en mettant en place plusieurs systèmes de protection visant à éliminer le composé, mais il peut également être affecté dans ses fonctions vitales par la toxicité du produit. Ces différentes situations se traduisent par une abondance relative de certains organismes, qui deviennent alors des **bioindicateurs**, mais également par des modifications des systèmes biologiques qu'il est possible d'évaluer par le biais de la mesure de modifications de plusieurs paramètres biologiques, qui deviennent alors des **biomarqueurs** (Fig. I-5).

La nature et la qualité (niveau de sensibilité, rapidité de réponse) de l'information recherchée dépendront de l'utilisation de l'un de ces deux types de marqueurs biologiques (bioindicateur ou biomarqueur). Parmi ces derniers, les **biomarqueurs** font l'objet d'une attention toute particulière.



**Figure I-5 : Utilisation de marqueurs biologiques dans l'évaluation des risques écotoxicologiques (Lagadic *et al.*, 1997)**

## I- Les biomarqueurs

Le *National Academy Council* (1987) est l'une des premières instances à avoir défini en 1987 la notion de biomarqueur. Depuis, cette définition a été affinée et est précisée par Lagadic *et al.* (1997) dans les termes suivants : "un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant".

Le principal intérêt des biomarqueurs est qu'ils permettent une évaluation intégrée dans le temps des polluants biodisponibles, tant en terme de présence qu'en terme des effets qu'ils sont susceptibles d'exercer sur les êtres vivants. Selon les organismes explorés, les biomarqueurs peuvent aussi rendre compte de la distribution des contaminants dans le milieu (Amiard *et al.*, 1997).

Trois types de biomarqueurs sont habituellement distingués (**Fig. I-5**) :

- *Les biomarqueurs d'exposition* indiquent qu'un organisme a été exposé à un xénobiotique et sont capables d'évaluer l'intensité de cette exposition. La mise en évidence d'un métabolite particulier du polluant ou, d'un adduit résultant de son interaction avec une molécule cible, permet de rendre compte d'une exposition actuelle ou passée.

- *Les biomarqueurs d'effet* mettent en évidence des modifications biochimiques survenues dans un organisme à la suite d'un contact avec un xénobiotique. Ainsi, l'induction de diverses protéines, comme les protéines de choc thermique ou les enzymes de biotransformation des xénobiotiques, reflètent la réaction d'un organisme qui a été exposé à un composé souvent indésirable. Ce marqueur doit être précoce et doit pouvoir être détecté avant que l'exposition n'entraîne des effets irréversibles.

- *Les biomarqueurs de susceptibilité* révèlent la sensibilité d'un organisme aux effets indésirables d'une exposition à un composé particulier. La mise en évidence d'un polymorphisme génétique peut expliquer des variations de susceptibilités à des toxiques. (Peakall, 1994, Trimbrell *et al.*, 1994). Lors d'exposition aux HAP, le polymorphisme des gènes des glutathion-S-transférases influence le niveau d'adduits à l'ADN dans les tissus humains et est donc associé à la susceptibilité individuelle au cancérigène (Butkiewicz *et al.*, 2000).

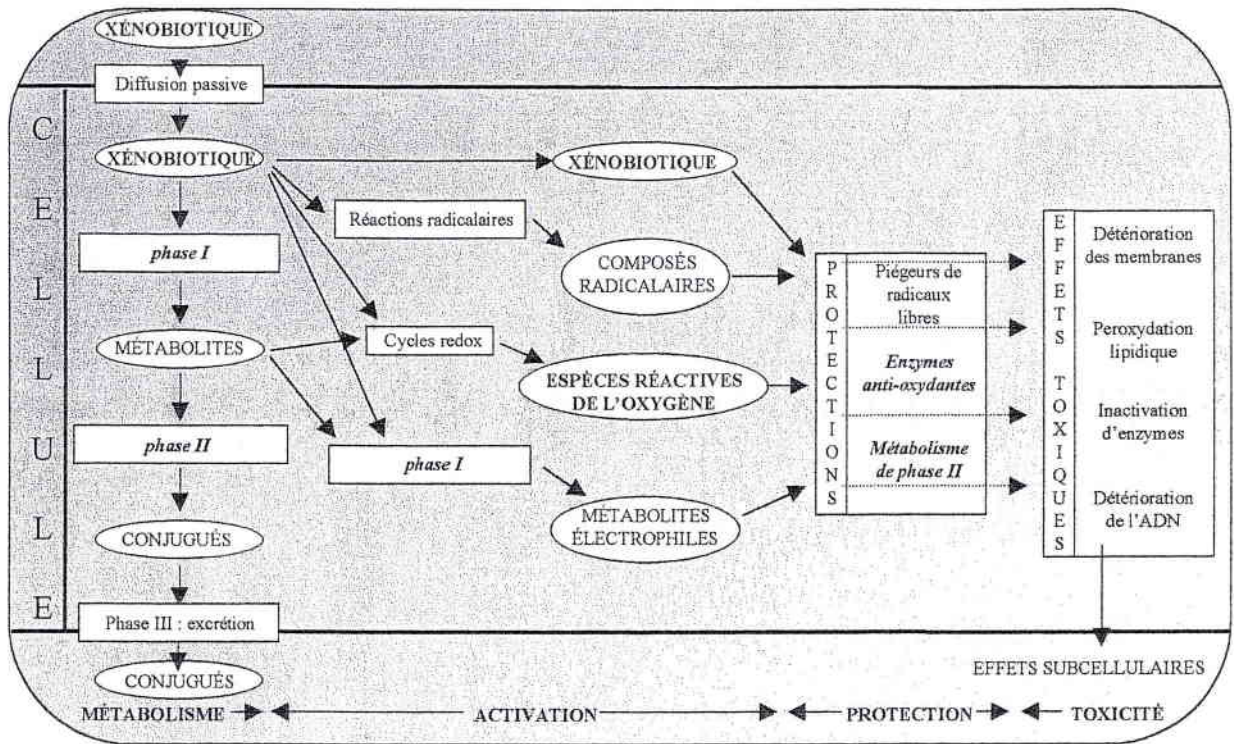
## **II- Systèmes de biotransformation des xénobiotiques chez les animaux, cas particulier des mollusques**

Les mollusques, grâce à leur capacité d'accumulation, ont été les premiers organismes sentinelles utilisés dans les programmes de surveillance de la contamination chimique des écosystèmes. L'un des premiers dispositifs utilisé, nommé *Mussel Watch*, a été mis en place aux Etats-Unis en 1965 sous le contrôle de l'EPA. Cet outil est destiné à évaluer la qualité de l'eau de mer (Goldberg *et al.*, 1978) par l'analyse de polluants (métaux lourds, molécules organochlorés et HAP) bioaccumulés dans les moules. Il est actuellement mis en œuvre à grande échelle afin de dresser une cartographie de ces polluants et de suivre leur évolution dans le Golfe du Mexique, l'Atlantique nord et sud et la côte du Pacifique. En France, le Réseau National d'Observation de l'IFREMER réalise le même type d'étude dans le cadre d'un programme Européen nommé "BIOlogical MARKers of environmental contamination in marine ecosystem" (BIOMAR). Ce projet, qui se réalise sur les côtes françaises et espagnoles, étudie la biodisponibilité des HAP par le suivi parallèle de leur distribution dans les sédiments et de leur bioaccumulation dans les moules (Baumard *et al.*, 1998, 1999). Ces études tendent à s'élargir à l'exploration de paramètres biochimiques qui bénéficient d'un intérêt grandissant en vue de la validation de nouveaux biomarqueurs.

Les systèmes enzymatiques de biotransformation des xénobiotiques sont des biomarqueurs de choix car ils sont induits par de nombreuses classes de composés. Ils ont été largement explorés chez les mammifères au cours des trente dernières années, en particulier dans les études de prédiction de métabolisme des médicaments (Siest *et al.*, 1988). Leur fonctionnement chez les mammifères est donc abondamment décrit dans la littérature et nous en rappellerons les grandes lignes. Par contre, ces systèmes ont encore été très peu explorés chez les mollusques et nous tenterons ici de faire le point sur l'état actuel des connaissances sur le métabolisme des xénobiotiques dans cet embranchement.

### **II-1. Vue d'ensemble du métabolisme des xénobiotiques**

Etant souvent de nature lipophile, les xénobiotiques pénètrent sans aucune difficulté à l'intérieur de la cellule où ils peuvent s'accumuler et générer des processus cytotoxiques. Toutefois, les cellules ont développé des mécanismes de biotransformations visant à inactiver les xénobiotiques en métabolites plus hydrosolubles donc plus facilement excrétables. Ces biotransformations s'effectuent en général en trois phases schématisées par la **figure I-6**.



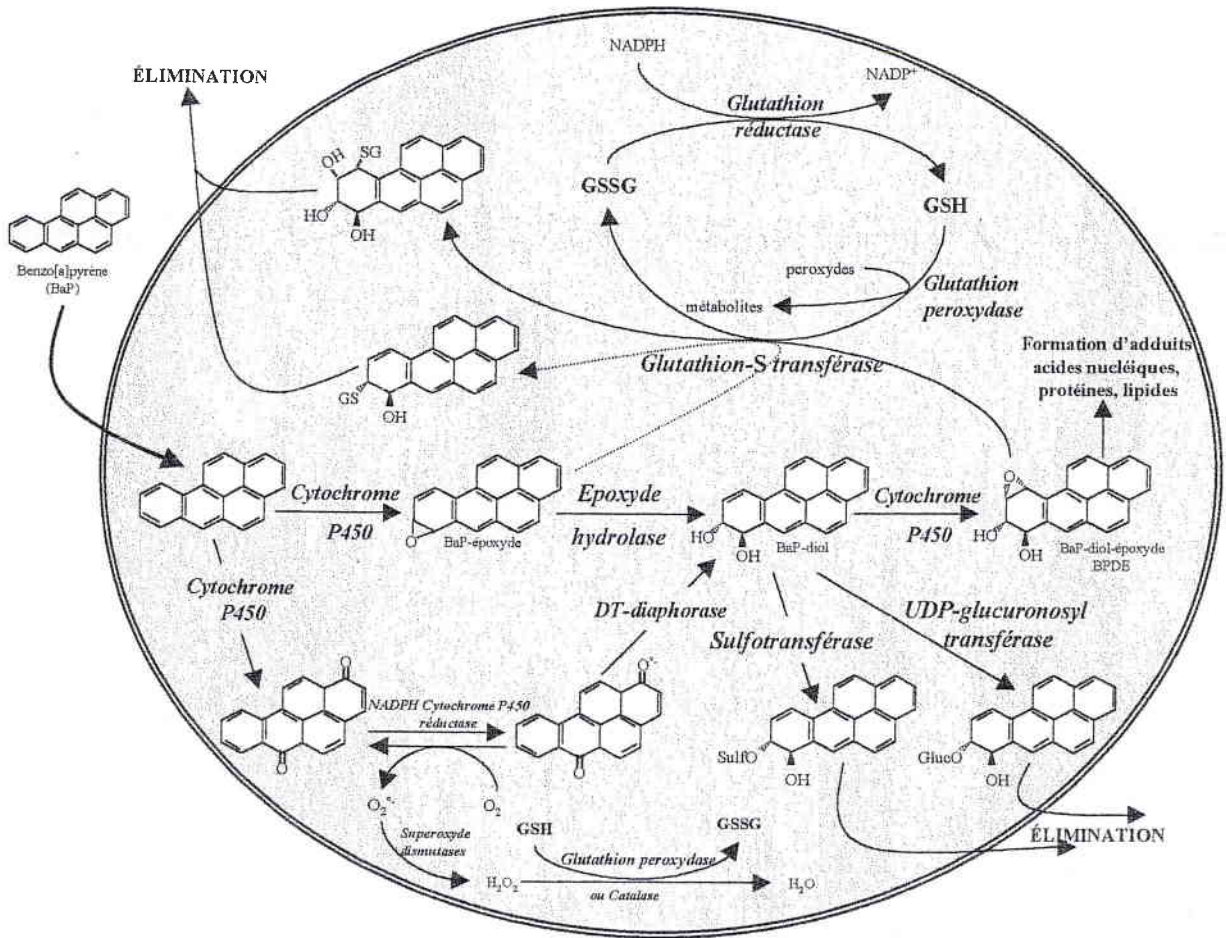
**Figure I-6 : Voies majeures de détoxification et de bioactivation des xénobiotiques organiques chez les animaux (Narbonne et Michel, 1997)**

- **Phase I ou phase de fonctionnalisation** : elle consiste en une oxydation des xénobiotiques ce qui en augmente la polarité. Malheureusement, cette étape peut parfois générer des métabolites plus réactifs que le composé de départ. Ainsi, le benzo[a]pyrène (BaP) est transformé en diol époxyde (BPDE), molécule toxique en raison de sa capacité à former des adduits avec les macromolécules cellulaires telles que les acides nucléiques, les lipides ou les protéines (Fig. I-7, Angerer *et al.*, 1997). Cette phase fait intervenir les monooxygénases couplées au **cytochrome P450** (CYP, EC 1.14.14.1).

- **Phase II ou phase de conjugaison** : elle a pour rôle essentiel de convertir les xénobiotiques ou, les métabolites générés lors de la phase de fonctionnalisation, en composé plus hydrosolubles en les conjuguant à des molécules endogènes telles que l'acide glucuronique, le sulfate, l'acétate, le **glutathion** ou certains acides aminés. Cette phase comprend également des réactions de méthylation et d'hydrolyse des époxydes. Il résulte de ces réactions une augmentation de la solubilité des xénobiotiques dont la nature est essentiellement hydrophobe. Parmi les enzymes impliquées dans la phase II, citons les UDP-glucuronosyl-transférases (UGT, EC 2.4.1.17), les sulfotransférases (ST, EC 2.8.2.1), les époxydes hydrolases (EH, EC 4.2.1.64) et les **glutathion S-transférases** (GST, EC 2.5.1.18) (Fig. I-7).



- **Phase III** : elle consiste en l'excrétion des xénobiotiques modifiés hors de la cellule par l'intermédiaire de pompes membranaires de nature glycoprotéique, fonctionnant selon un mécanisme ATP-dépendant.



**Figure I-7 : Voies métaboliques du benzo[a]pyrène**

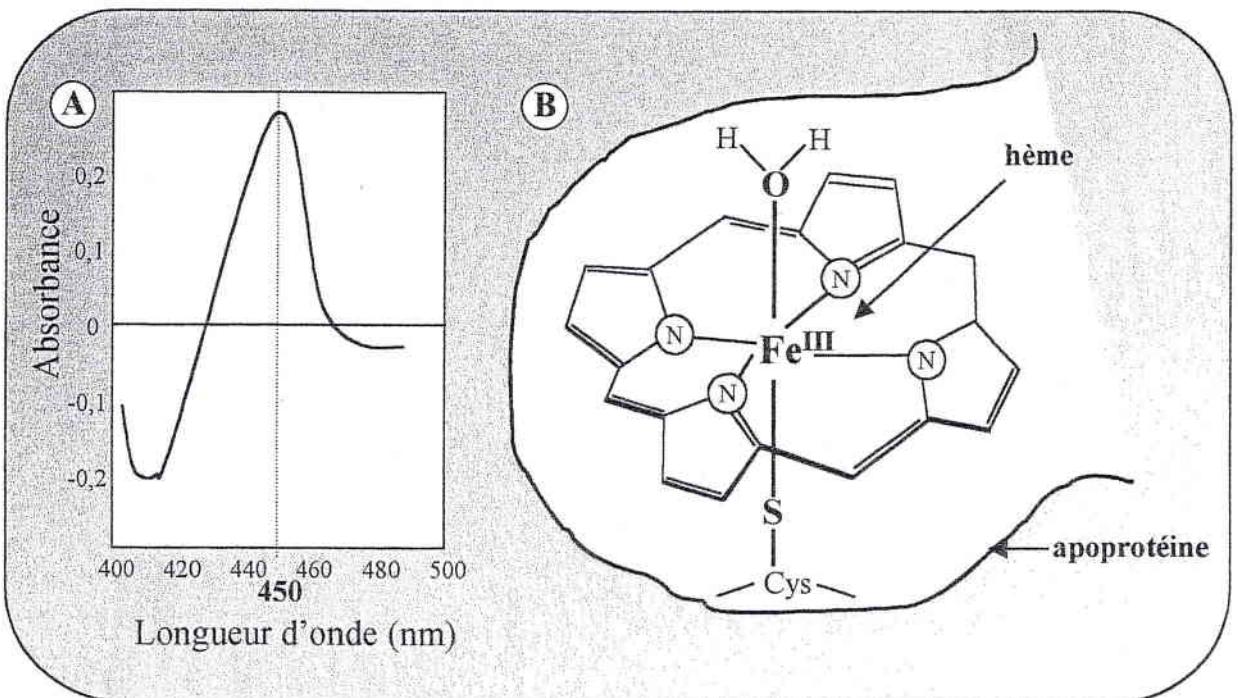
Au cours de la phase de fonctionnalisation et/ou de conjugaison, des espèces réactives de l'oxygène (ERO) peuvent être produites. Les ERO incluent non seulement les différentes formes actives de l'oxygène (anion superoxyde,  $O_2^{\bullet-}$ , radical hydroxyl,  $OH^{\bullet}$ , peroxyde d'hydrogène,  $H_2O_2$ , et l'oxygène singulet,  $^1O_2$ ), mais également les molécules qui peuvent en être à l'origine, ou qui peuvent en générer (quinones). Des systèmes antioxydants, de nature enzymatique ou non, permettent l'inactivation de ces molécules. Les principales enzymes agissant sur les ERO sont les superoxydes dismutases (SOD, EC 1.15.1.1), la catalase (CAT, EC 1.11.1.6) et la DT-diaphorase (DTD, quinone oxydoréductase, EC 1.6.99.2). Les enzymes du système du glutathion (glutathion réductase et glutathion peroxydase) jouent, pour leur part, un rôle crucial dans la prévention de la formation d'espèces réactives. Cependant, lorsque ces systèmes de défense sont débordés, l'accumulation des ERO occasionne un stress oxydant qui a été défini par Sies en 1991 comme "un déséquilibre entre les systèmes prooxydants et antioxydants en faveur des premiers, et source d'effets toxiques potentiels".

Comme l'illustre la **figure I-7**, ces diverses enzymes sont toutes impliquées plus ou moins directement dans le métabolisme du BaP. Dans ce chapitre, seules les CYP et les enzymes associées au glutathion feront l'objet d'une attention particulière.

## II-2. Le système du cytochrome P450

### II-2.1. Caractéristiques générales et mécanisme réactionnel

Le cytochrome P450 (CYP) a été découvert pour la première fois en 1958 par Klingenberg dans des microsomes de foie de rat. Il est appelé ainsi, car lorsqu'il est réduit et complexé au monoxyde de carbone, il présente un pic d'absorption maximale de la lumière à 450 nm (**Fig. I-8A**).



**Figure I-8 : A, spectre d'absorption du complexe CYP réduit-CO, B, représentation de l'hémoprotéine**

Le cytochrome P450 est une hémoprotéine constituée d'une apoprotéine liée à l'atome de fer d'un groupement prosthétique (**Fig. I-8B**). L'atome de fer admet six liaisons de coordination : quatre impliquent des liaisons avec les atomes d'azote des structures tétrapyrroliques, une cinquième est réalisée avec l'atome de soufre d'un résidu thiolate de l'apoprotéine ; enfin, la sixième coordinance est assurée par une molécule d'eau qui occupe une partie du site actif au contact du fer. Cette molécule d'eau est déplacée lors de la liaison du substrat sur le site actif (Koymans *et al.*, 1993).

La majorité des biotransformations réalisées par les CYP consiste en l'insertion de l'un des deux atomes de l'oxygène moléculaire dans un substrat, d'où son nom de monooxygénase ( $RH + O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow ROH + H_2O$ ). Toutefois, il faut garder à l'esprit que cette



dénomination de monooxygénase à cytochrome P450 est abusive, car le CYP peut également être impliqué, dans d'autres types de réactions comme des déshalogénations, des hydroxylations, des époxydations ... (Fig. I-7). Aussi le terme "hème-thiolate protein" est-il préféré et, recommandé par l'*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*.

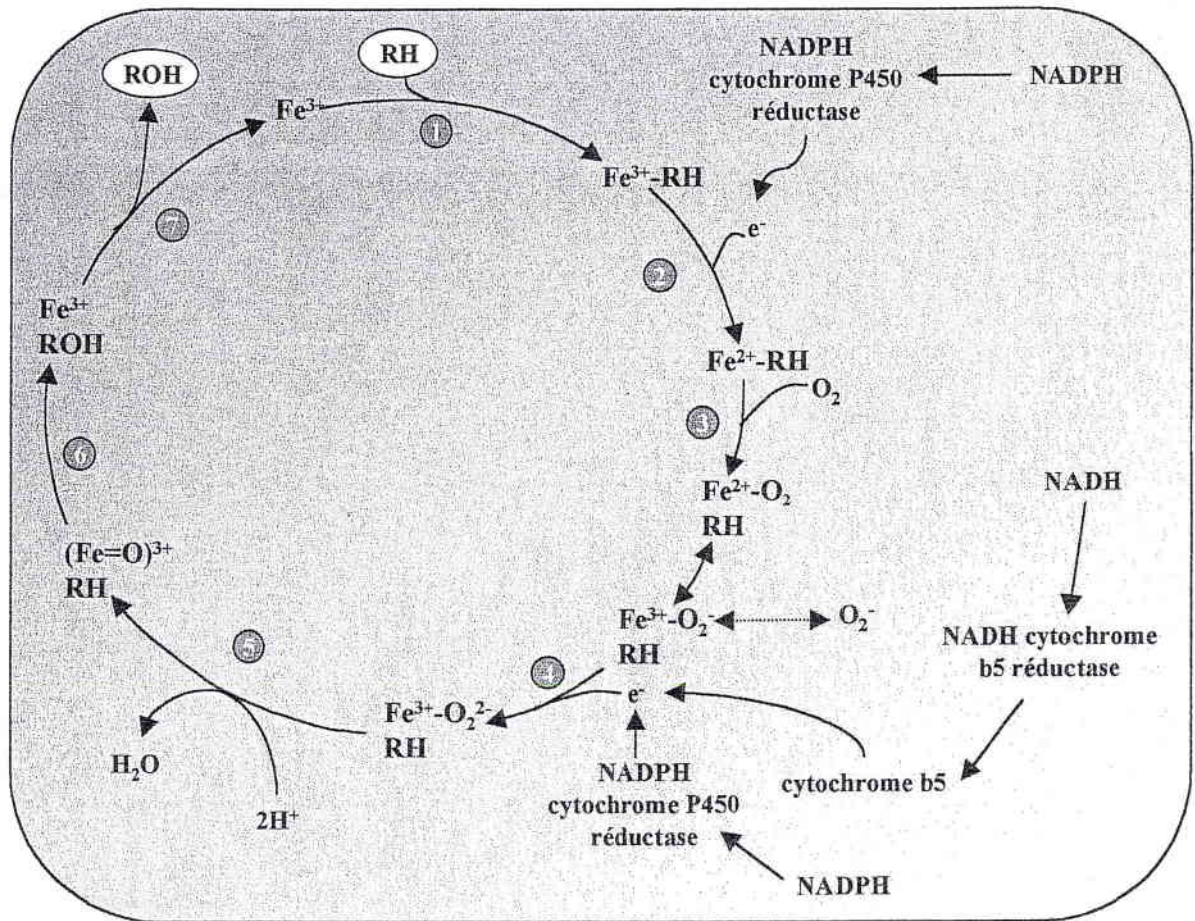
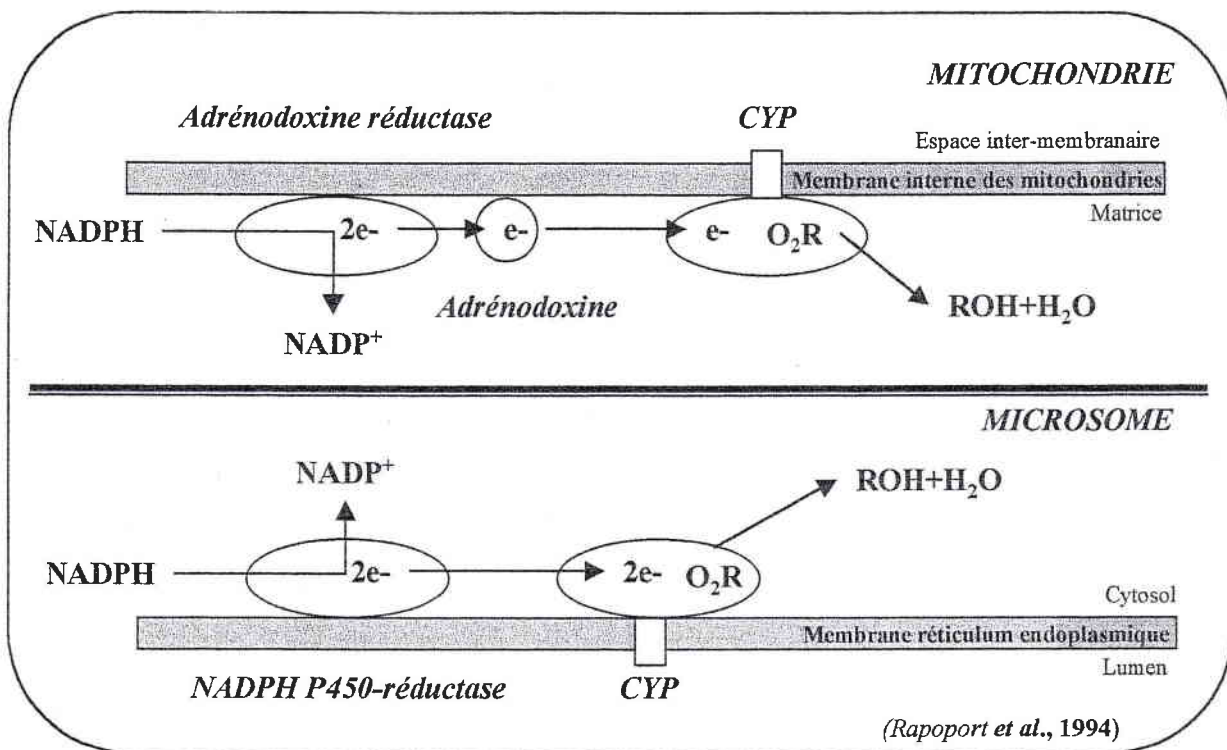


Figure I-9 : Principales étapes du cycle catalytique du cytochrome P450

Le cycle catalytique du CYP (Fig. I-9) débute lorsque le substrat se lie au site actif de cette hémoprotéine à l'état  $\text{Fe}^{3+}$  (1). Cette liaison est accompagnée d'un changement de spin de l'ion  $\text{Fe}^{3+}$ , qui passe d'un état de faible spin (hexacoordonnée), à un état de haut spin (pentacoordonnée). Ce réarrangement engendre une modification du potentiel redox du fer d'environ 300 mV à 170 mV, suffisante pour permettre la réduction de l'ion ferrique par l'intervention de la NADPH cytochrome P450 réductase (2). Cette réaction est suivie par la fixation de la molécule d'oxygène ( $\text{O}_2$ ) à un site adjacent à l'ion  $\text{Fe}^{2+}$  (3). Cet élément,  $\text{Fe}^{2+}$ , est instable et peut être facilement oxydé en  $\text{Fe}^{3+}$ , relargant  $\text{O}_2^-$ , espèce hautement réactive. Toutefois, si le transfert d'un second électron se produit, dans certains cas *via* le cytochrome b5, alors, le cycle catalytique continue (4). L' $\text{O}_2^{2-}$  rompt la liaison entre les atomes d'oxygène, libérant une molécule d'eau et produisant une entité très oxydante appelé oxène (5). Cet élément

oxyde le substrat logé dans le site actif (6) qui sera finalement libéré (7), le CYP est régénéré sous sa forme oxydée initiale.

Ces réactions requièrent deux électrons (**Fig. I-9**), qui proviennent habituellement du NADPH. Le CYP, ne pouvant pas utiliser directement le NADPH comme source d'électrons, est intégré à une chaîne de transporteurs d'électrons qui diffère en fonction de sa localisation. Le transfert d'électrons du NADPH aux CYP mitochondriaux se réalise par le biais de la NADPH-adrénodoxine réductase et de l'adrénodoxine. Pour les CYP des microsomes, ce transfert d'électrons depuis le NADPH est effectué *via* la NADPH-cytochrome P450 réductase, flavoprotéine à FMN et FAD, et depuis le NADH par le cytochrome b5 et la NADH-cytochrome b5-réductase (**Fig. I-10**).



**Figure I-10 : Chaîne de transporteurs d'électrons**

Les CYP sont donc divisés en classes selon la nature de leurs partenaires redox. La classe I correspond aux CYP localisés dans les mitochondries alors que ceux appartenant à la classe II se situent dans les microsomes (**Fig. I-10**). Récemment une troisième classe de CYP ne nécessitant pas de transporteurs d'électrons a été définie. Cette classe III ne catalyse pas des réactions de monooxygénation, mais plutôt des réarrangements (Halkier, 1996).

Ce système enzymatique participe au métabolisme de composés endogènes tels que les stéroïdes et les acides gras (dans les mitochondries), mais également de composés exogènes comme les médicaments, les pesticides et les HAP (dans les microsomes).



L'activité CYP chez les **mollusques** a été, durant de nombreuses années, tenue pour absente. Il a fallu attendre les années 80 pour que le pic d'absorption à 450 nm caractéristique du CYP soit mis en évidence dans des microsomes de glande digestive de moules (Ade *et al.*, 1982, Gilewicz *et al.*, 1984, Livingstone et Farrar, 1984). En 1991, ce même pic a été détecté dans la fraction microsomale de la glande digestive d'un escargot dulçaquicole, *Lymnae stagnalis* (Wilbrink *et al.*, 1991a), avec des concentrations de l'ordre de 30 à 40 pmol de CYP/mg de protéine, similaires à celles observées chez des mollusques aquatiques, tels que des moules (*Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*), des chitons (*Cryptochiton stelleri*), des palourdes (*Macrocalista maculata*) (Livingstone *et al.*, 1989). Dans la fraction microsomale de la glande digestive du bivalve *Mytilus edulis*, ont également été détectés le cytochrome b5 et des activités NADPH-cytochrome P450 réductase (Livingstone et Farrar, 1984), éléments indispensables au transfert des électrons. Ces auteurs ont démontré que ce système enzymatique chez *M. edulis* est lié à la membrane du réticulum endoplasmique et est principalement localisé dans la glande digestive, site privilégié d'accumulation des hydrocarbures chez ces organismes. Ainsi, le système de biotransformation par le biais du CYP présente de nombreuses similitudes avec celui décrit chez les mammifères. Toutefois, quelques particularités ont été mises en évidence essentiellement au travers de l'étude du métabolisme du BaP. A l'inverse de ce que l'on observe chez les vertébrés, il semblerait que le NADPH ne soit pas nécessaire pour le métabolisme du BaP dans les microsomes de glande digestive de *M. edulis* (Livingstone *et al.*, 1989). L'intervention d'une source endogène de réducteurs est suggérée par les auteurs, qui toutefois restent intrigués par cette observation. D'après les connaissances actuelles, l'enzyme impliquée dans le métabolisme du BaP chez *M. edulis*, pourrait faire partie de la classe III des CYP identifiés chez les mammifères. A ce jour, deux voies métaboliques du BaP sont suggérées chez *Mytilus*. La première, correspond à la voie classique à deux électrons, qui aboutit principalement à la formation d'époxydes, de phénols et de diols comme chez les mammifères (**Fig. I-7**). Les CYP impliqués dans ce chemin métabolique seraient inductibles (Livingstone *et al.*, 1989). A l'opposé, une voie impliquant un seul électron, probablement catalysée par un CYP particulier, serait majoritaire, constitutive, non-inductible et générerait essentiellement des diones (quinones, **Fig. I-11**) (Lemaire *et al.*, 1993, Livingstone *et al.*, 1990, 1997, Mitchelmore *et al.*, 1998). Chez l'escargot aquatique, *L. stagnalis*, l'utilisation de NADH ou de NADPH ne semble pas avoir d'importance pour la mesure des activités CYP (Wilbrink *et al.*, 1991a).

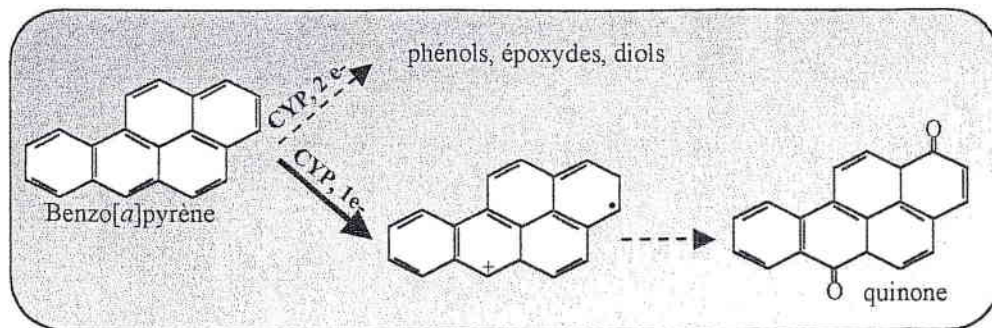


Figure I-11 : Voies métaboliques du BaP chez *Mytilus edulis*

## II-2.2. La famille multienzymatique des cytochromes P450

Les CYP forment une famille enzymatique multigénique. A ce jour, plus de 600 CYP différents sont dénombrés dans le monde vivant et sont regroupés en familles. La nomenclature proposée en 1989 par Nebert *et al.* est fondée sur le pourcentage de similitude des séquences protéiques des CYP. Ainsi, une famille regroupe des protéines présentant au minimum 40 % d'acide aminés identiques. Ces familles, désignées par un chiffre arabe (CYP1) sont divisées en sous-famille d'isoenzymes. Les séquences des enzymes d'une même sous-famille possèdent plus de 55 % d'identité et sont identifiées par une lettre majuscule (CYP1A). Le second chiffre arabe utilisé à l'intérieur d'une sous-famille indique individuellement les isoenzymes dans l'ordre où elles ont été identifiées (CYP1A1 et CYP1A2).

Tous les **mammifères** examinés possèdent 14 familles de CYP elles-mêmes divisées en 26 sous-familles (Nelson *et al.*, 1996), dont chacun des membres présente des similitudes quant à leur inductibilité et leurs spécificités de substrats. Les familles 1 à 3 (CYP1 à CYP3) sont les plus impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques. Le **tableau I-6** donne quelques exemples du spectre d'inducteurs de ces sous-familles chez l'homme et illustre clairement le chevauchement dans la spécificité des substrats (Rendic *et al.*, 1997).

Tableau I-6 : Substrats et inducteurs des principales sous-famille de CYP (Rendic *et al.*, 1997)

Sous-famille	Isoenzymes	Substrats	Inducteurs
CYP1A	CYP1A1	7-ETR, HAP (BaP)	HAP (BaP, BaA), 3MC, TCDD
	CYP1A2	7-ETR, 7-MTR, 7-BR, HAP (BaP)	HAP (BaP), 3MC, TCDD, PCB
CYP2A	CYP2A6	7-BR, 7-ETC	
CYP2B	CYP2B6	7-PTR, 7-BR, 7-ETC, HAP	PB
CYP2F	CYP2F1	7-PTR, 7-BR, 7-ETC,	
CYP3A	CYP3A4 ou CYP3A5	7-BR, HAP (BaP), cortisol, testostérone	barbituriques

3MC : 3-méthylcholanthrène, 7-ETR : 7-éthoxyrésorufine, 7-MTR : 7-méthoxyrésorufine, 7-PTR : 7-pentoxyrésorufine, 7-BR : 7-benzoxyrésorufine, 7-ETC : 7-éthoxycoumarine, PB : phénobarbital, PCB : polychlorobiphényl, TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-dioxine

Les membres de la famille **CYP1A** sont responsables de l'activation métabolique de certains composés tel que des médicaments, des polluants. Le **CYP1A1** et le **CYP1A2** de cette famille sont les plus impliqués dans l'activation de pro-cancérogènes. Les inducteurs les plus puissants de ces sous-familles sont les polluants environnementaux tel que le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-dioxine (TCDD) et les HAP (**Fig. I-7**). L'isoenzyme CYP1A1 est considérée comme la plus active chez l'homme et la plus impliquée dans l'activation métabolique des polluants.

Chez les mammifères, l'activité de chacune de ces sous-familles peut être évaluée à l'aide d'un ou de plusieurs substrats dont la spécificité n'est pas absolue (**Tab. I-6**). Ainsi, chez l'homme, l'activité éthoxyrésorufine-*O*-dééthylase (EROD) est attribuée à la sous-famille CYP1A, l'activité pentoxyrésorufine-*O*-déalkylase (PROD) à la sous-famille CYP2B, l'activité éthoxycoumarine-*O*-dééthylase (ECOD) aux sous-familles CYP2A et CYP2B et l'activité méthoxyrésorufine-*O*-dééthylase (MROD) préférentiellement à l'isoenzyme CYP1A2.

Chez les **mollusques**, l'identification et la caractérisation des sous-familles de CYP responsables du métabolisme spécifique de différents substrats n'ont connu d'avancées significatives que récemment.

Des études réalisées par Northern Blot ont montré une hybridation entre les ARN de glande digestive de *M. edulis* et des sondes d'ADNc du CYP1A de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), du CYP3A et 11A d'homme et du CYP 4A1 de rat (Wootton *et al.*, 1995), indiquant l'expression de multiples CYP dans cet organe. La présence d'un épitope 'CYP1A-like' dans la glande digestive de *M. edulis* (Porte *et al.*, 1995) et de *M. galloprovincialis* (Livingstone *et al.*, 1997) a également été observée par Western blot à l'aide d'anticorps polyclonaux anti-CYP1A de perche. Plus récemment, une étude similaire conduite avec des anticorps polyclonaux de foie de perche (CYP1A), de truite arc-en-ciel (CYP3A) et de rat (CYP2B, 2E et 4A) ont dévoilé différentes bandes, indiquant l'existence de multiples épitopes (Peters *et al.*, 1998a). Ainsi, la présence d'un minimum de cinq formes de CYP est suspectée dans la glande digestive de *Mytilus* sp. Des précautions sont toutefois requises quant à l'interprétation exacte du nombre de sous-familles présentes. En effet, un même épitope peut être reconnu par des anticorps dirigés contre différents CYP, alors qu'un même CYP peut avoir des épitopes qui peuvent être reconnus par différents anticorps. De plus, les anticorps utilisés proviennent de vertébrés, embranchement éloigné des mollusques. Néanmoins, l'augmentation de l'intensité des bandes pour trois des cinq sous-familles (CYP1A, 2E et 4A) après exposition de *M. galloprovincialis* à un site pollué en PCB et HAP signale un système de régulation interdépendant entre ces différentes formes de CYP (Peters *et al.*, 1998b).

Des homologues ont donc été mises en évidence entre les CYP des vertébrés et des mollusques. Par contre, à l'inverse des vertébrés où la spécificité des substrats est établie, des études complémentaires sont nécessaires chez les mollusques. En effet, alors que l'activité EROD n'a pas été détectée chez l'escargot *Lymnaea stagnalis* (Wilbrink *et al.*, 1991a), elle est présente chez le gastéropode *Planorbis* (Meimberg *et al.*, 1997). De plus, l'exposition au 3-méthyl-cholanthrène (3MC), inducteur préférentiel de la sous-famille CYP1A chez les vertébrés, de *M. edulis* provoque une induction de l'activité EROD dans la glande digestive (Livingstone *et al.*, 1988). Cette induction est également observée chez *M. galloprovincialis* après exposition au phénobarbital (PB), inducteur préférentiel de la sous-famille CYP2B chez les vertébrés (Galli *et al.*, 1988). De plus, l'Aroclor 1254, un mélange de 3MC et de PB, augmente significativement les activités EROD et PROD chez le gastéropode *Planorbis* (Meimberg *et al.*, 1997). Ces quelques exemples mettent bien en évidence le chevauchement de spécificité des substrats, donc la difficulté d'attribuer chez les mollusques une activité enzymatique à une ou plusieurs isoenzymes. Ce chevauchement semble plus important chez les mollusques que chez les mammifères et correspond certainement à une spécificité plus réduite chez ces organismes inférieurs, reflet probable de l'évolution entre ces deux embranchements.

### II-2.3. Mécanisme d'induction

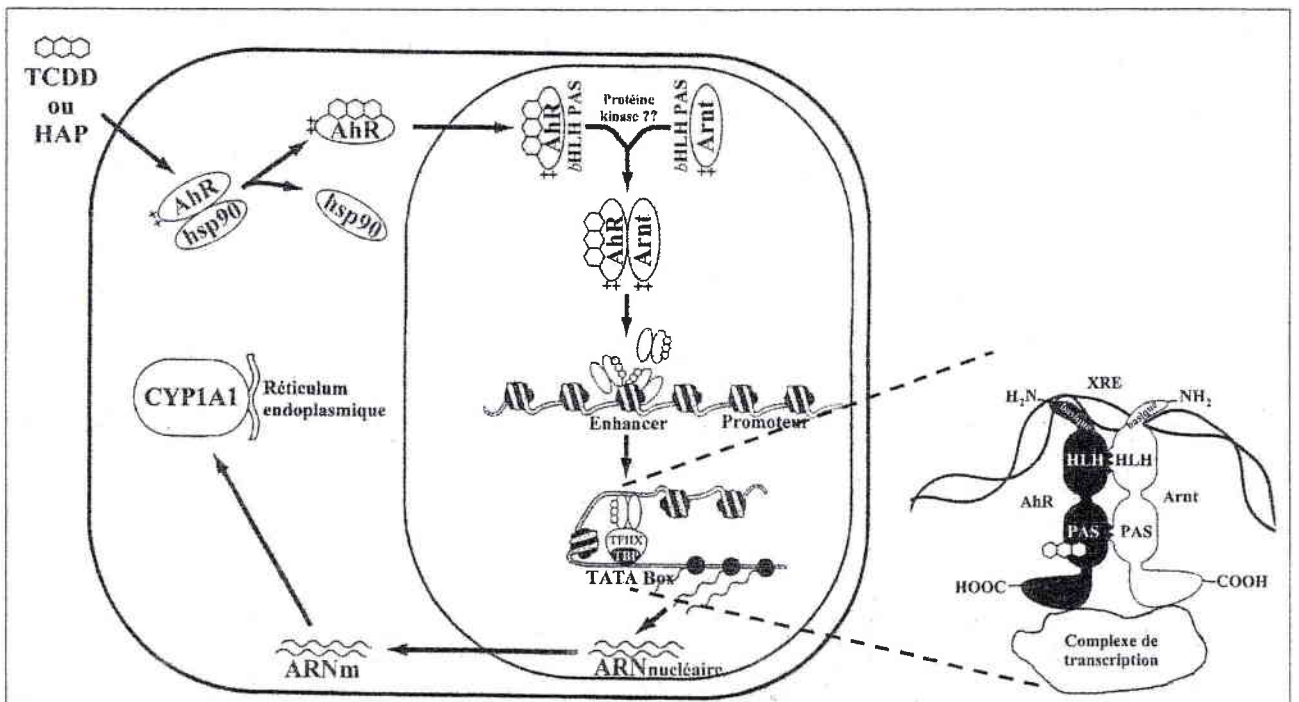


Figure I-12 : Mécanisme d'induction du CYP1A1 chez les mammifères (Whitlock *et al.*, 1996)

Le mécanisme d'induction des CYP chez les **mammifères** a été particulièrement bien élucidé pour le CYP1A1 (Fig I-12, Whitlock *et al.*, 1996, Sogawa et Fujii-Kuriyama, 1997, Denison et Heath-Pagliuso, 1998). Les inducteurs lipophiles tels que les HAP ou la 2,3,7,8-

tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) diffusent passivement à l'intérieur de la cellule et se fixent sur le récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR), qui chez certaines espèces est maintenu dans une configuration réceptive grâce à la protéine de choc thermique de 90 kDa (hsp90) (Phelan *et al.*, 1998). L'interaction entre l'inducteur et AhR se situe au niveau d'une région nommée PAS, car elle présente des homologies avec des protéines de régulations de *Drosophila* nommées Per, Arnt et Sim. La protéine hsp90 se désolidarise alors du complexe AhR-ligand qui peut ainsi pénétrer à l'intérieur du noyau. Ce complexe forme un hétérodimère avec la protéine nucléaire Arnt par l'intervention probable d'une protéine kinase. Ce nouveau complexe, AhR-ligand/Arnt, pourra alors se fixer sur une région spécifique de l'ADN qui est la séquence de réponse aux xénobiotiques (XRE). Cette fixation s'opère grâce à la présence d'une région en hélice-boucle-hélice à terminaison basique (*bHLH*) en région *N*-terminale de AhR et Arnt, qui reconnaît spécifiquement le domaine XRE. Cette structure, *bHLH*, ainsi que la région PAS, contribuent aux interactions entre AhR et Arnt. Après fixation du complexe AhR-ligand/Arnt sur le domaine XRE, l'ADN change de conformation afin de rendre possible l'interaction entre les facteurs de transcription généraux (TBP, "TATA-binding protein" ; TFIIX) et le promoteur (Whitlock *et al.*, 1996). Il en résulte une stimulation de la transcription des gènes correspondants (Israel et Whitlok, 1984). Par ce mécanisme, les HAP tels que le BaP, le BaA et le 3MC induisent les gènes des CYP1A1 et 1A2 chez de nombreux mammifères (Israel & Whitlok, 1983 ; Okey, 1990 ; Whitlok, 1990 ; Landers & Bunce, 1991 ; Gulyaeva *et al.*, 1994 ; Kikuchi *et al.*, 1994).

Autant la littérature concernant le récepteur Ah est abondante pour les vertébrés et plus particulièrement les mammifères, autant celle-ci est extrêmement limitée et confuse pour les **invertébrés**. A l'heure actuelle, la présence du récepteur Ah n'a pas été mise en évidence par marquage par photoaffinité d'extrait cytosolique de glande digestive chez neuf invertébrés, représentant l'embranchement des mollusques, des annélides, des arthropodes ou des échinodermes (Hahn *et al.*, 1992, 1994). Toutefois, ces auteurs émettent l'hypothèse que le récepteur Ah pourrait être présent chez ces organismes à des concentrations extrêmement faibles, soit dans des tissus non examinés, soit à des stades de développement bien spécifiques ou encore uniquement chez certains invertébrés. Cette même technique a permis d'identifier chez la palourde, *Mercenaria mercenaria*, deux protéines fixant spécifiquement l'analogue radioactif du TCDD (Brown *et al.*, 1995). La taille de ces protéines (28 et 39 kDa) est nettement inférieure à celle du récepteur Ah chez les mammifères et les poissons (100 à 145 kDa). L'expression de ces protéines particulières chez *M. mercenaria* est variable suivant le tissu, avec une concentration plus importante dans les branchies et les gonades en comparaison avec la glande digestive et le



rein. Ces auteurs n'ont pas pu certifier que ces protéines soient des analogues du récepteur Ah des vertébrés. La présence d'un gène chez le nématode *Caenorhabditis elegans* qui présente des séquences contenant les domaines bHLH et PAS suggère l'existence de structures homologues aux AhR et l'Arnt des vertébrés. Néanmoins, leurs fonctions restent encore à élucider (Hahn *et al.*, 1997, Hahn, 1998).

L'identification d'un récepteur Ah dans les poissons primitifs et la présence probable d'un homologue chez le nématode *C. elegans*, indique l'ancienneté de cette protéine. En effet, au cours de la phylogenèse, cette protéine a évolué allant jusqu'à se dupliquer. Ainsi, les poissons les plus évolués et les mammifères possèdent deux récepteurs Ah, AhR1 et AhR2. La fonction du deuxième récepteur est actuellement inconnue, mais semble agir comme un régulateur négatif de AhR1 (Hahn *et al.*, 1997).

### II-3. Les enzymes du système du glutathion

#### II-3.1. Le glutathion

Le glutathion est un tripeptide constitué d'acide glutamique, de cystéine et de glycine (Fig. I-13). Cette molécule est présente dans tous les organismes vivants et représente la très grande majorité des thiols intracellulaires. La forme réduite du glutathion (GSH) prédomine largement par rapport à la forme oxydée (GSSG) dans laquelle deux molécules de glutathion sont liées par un pont disulfure. Les proportions physiologiques sont d'environ 95 % pour le GSH et 5 % pour le GSSG. Cet équilibre, assuré en permanence par la glutathion réductase (GR), traduit l'importance fonctionnelle du groupement sulfhydryle du GSH (Meister, 1983).

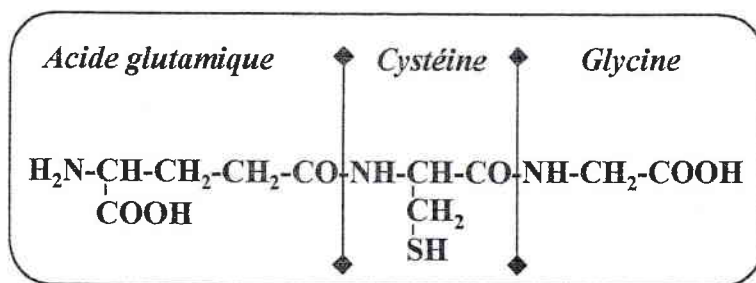
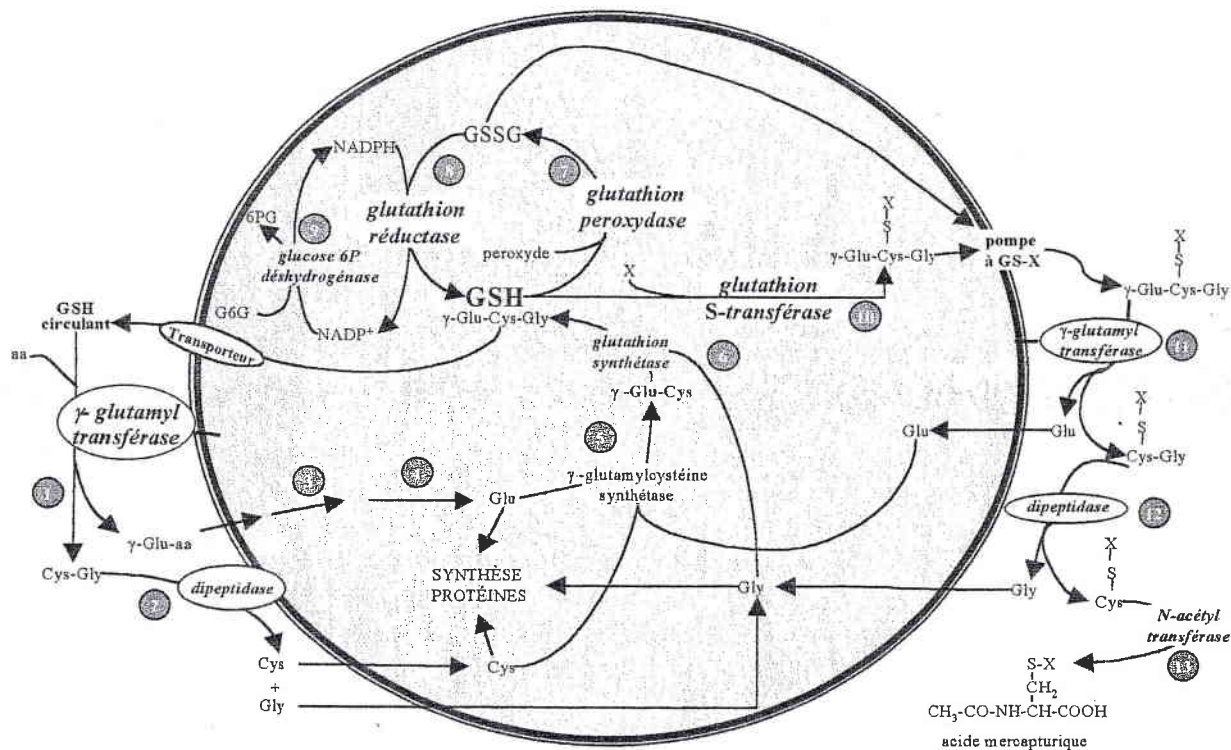


Figure I-13 : Structure du glutathion réduit

#### ⌘ Biosynthèse du glutathion

Toutes les cellules peuvent synthétiser le glutathion à partir de ses trois éléments constitutifs par action consécutive de la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase et de la glutathion synthétase (Fig.I-14, réactions 5 et 6).



**Figure I-14 : Synthèse du glutathion intracellulaire et implication dans les voies de détoxication**

Le GSH circulant, essentiellement d'origine hépatique, est dégradé par la  $\gamma$ -glutamyl transférase qui, en présence d'acides aminés extracellulaires, catalyse la formation d'aminés  $\gamma$ -glutamylés et de cystéinylglycine (Orlowski et Meister, 1970 réaction 1). Les acides aminés  $\gamma$ -glutamylés pénètrent alors à l'intérieur de la cellule et l'action successive de la  $\gamma$ -glutamyl cyclotransférase et de la 5-oxoprolinase (réactions 3 et 4) génère les acides aminés correspondants et du L-glutaminate. La cystéinylglycine, pour sa part, est clivée par une dipeptidase membranaire (réaction 2), libérant ainsi la glycine et la cystéine. Les trois acides aminés constituant le glutathion sont alors présents à l'intérieur de la cellule.

### **Implication dans la détoxication**

Les fonctions principales du GSH intracellulaire résident d'une part, dans la protection cellulaire contre les agents oxydants et d'autre part, dans son implication dans les voies de détoxication des xénobiotiques (**Fig. I-14**). La première fonction est assurée par la glutathion peroxydase (GPX, réaction 7) et la glutathion réductase (GR) qui maintient l'équilibre entre le GSH et le GSSG en faveur du premier (réaction 8). L'activité de la GR dépend de la production de NADPH par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (réaction 9). La seconde fonction consiste en l'addition nucléophile de  $GS^-$  sur le xénobiotique par l'action de la glutathion-S-transférase (GST, réaction 10). Le conjugué ainsi formé est exporté hors de la cellule par une pompe transmembranaire ATP-dépendante, pompe à GS-X, identifiée, entre autres, dans le foie et le rein (Ishikawa, 1992).

Cette pompe comporte au moins trois domaines, un domaine P où se produit une phosphorylation, un domaine G de reconnaissance du GSH et un domaine C qui possède une affinité particulière pour la fonction électrophile du conjugué (Ishikawa, 1990). Le GS-conjugué ainsi exporté est clivé par la  $\gamma$ -glutamyl transférase et par une dipeptidase extracellulaire (réactions 11 et 12). Le cystéinyl S-conjugué obtenu parvient ~~au foie,~~ à l'intestin grêle ou au rein où il est transformé en acide mercapturique (réaction 13) par l'intermédiaire d'une N-acétyl-transférase avant élimination dans les urines ou les fèces.

Dans la glande digestive de l'escargot *L. stagnalis* (0,14  $\mu\text{mol/g}$ , Wilbrink *et al.*, 1991b), la concentration en GSH est extrêmement faible en comparaison avec celles que l'on observe chez les mammifères (4  $\mu\text{mol/g}$  dans le foie de rat, Larson *et al.*, 1983, 9,5  $\mu\text{mol/g}$  dans le foie de souris, Griffith et Meister, 1978).

### II-3.2. Les glutathion S-transférases, GST

Les GST (EC 2.5.1.18) font partie des enzymes dites de conjugaison de phase II du métabolisme des xénobiotiques. Ces enzymes peuvent intervenir après la phase de fonctionnalisation ou directement sur le xénobiotique. Leur rôle principal est de conjuguer le GSH à des composés contenant un centre électrophile. Cette conjugaison permet d'inactiver le xénobiotique mais également d'augmenter sa solubilité, facilitant son expulsion hors de la cellule par les pompes membranaires à GS-X. Les molécules contenant des centres électrophiles sont extrêmement nombreuses (HAP, pesticides...). Certaines GST douées d'activité peroxydases peuvent également avoir un rôle dans la lutte contre les ERO (Lawrence et Burk, 1976).

#### ☞ Famille multienzymatique

Chez les mammifères, les GST sont une famille multigénique tout comme les CYP. La nomenclature adoptée identifie chaque isoenzyme par une lettre majuscule, un chiffre arabe et éventuellement une lettre minuscule, indiquant respectivement la classe (identité > 40 %), la sous-famille et le variant allélique (Hayes et Pulford, 1995).

Les GST sont constituées essentiellement d'isoenzymes cytosoliques mais également microsomales et mitochondriales. Chez l'homme, les GST cytosoliques, composées de deux sous-unités d'environ 25 kDa, sont séparées en quatre classes principales d'isoenzymes différentes présentant des spécificités de substrats résumés dans le **tableau I-7**. La classe **Alpha** et la classe **Thêta** présentent de fortes activités peroxydases, mises en évidence avec l'hydroperoxyde de cumène (CuOOH) comme substrat. Toutes les isoenzymes, à l'exception de la classe Thêta, catalysent la transformation du 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB), souvent appelé à ce titre substrat universel des GST. La classe Thêta se distingue également des autres classes, puisque la séquence des enzymes en acides aminés partage très peu d'identité avec celles



de classe Alpha, **Mu** ou **Pi**. Elle semble également être plus proche des GST retrouvées dans des embranchements moins évolués tels que le nématode *C. elegans* (Board *et al.*, 2000). Il semble donc, que les GST Thêta soient des représentantes d'une classe ancestrale de GST (Pemble et Taylor, 1992).

**Tableau I-7 : Substrats des GST cytosoliques humaines**

Sous-famille	Isoenzymes	Substrats préférentiels (activité)
GST Alpha	GST A1	CDNB (modérée), DCNB (faible), CuOOH (modérée), ECA (modérée)
	GST A2	CuOOH (forte), CDNB (modérée), DCNB (modérée), ECA (modérée)
	GST A3	?
	GST A4	HNE, CDNB (faible), CuOOH (faible), ECA (modérée)
GST Mu	GST M1	CDNB (forte), DCNB (modérée), ECA (modérée), CuOOH (faible)
	GST M2	Quinone, CDNB (forte), DCNB (forte), ECA (forte), CuOOH (faible)
	GST M3	CDNB (faible), DCNB (faible), ECA (faible), CuOOH (faible)
	GST M4	CDNB (faible), DCNB (faible), ECA (faible), CuOOH (faible)
	GST M5	CDNB (modérée)
GST Pi	GST P1	BPDE, CDNB (modérée), DCNB (faible), ECA (forte), CuOOH (faible)
GST Thêta	GST T1	ECA (faible), CuOOH (modérée), DCM
	GST T2	CuOOH (forte)

BPDE : benzo[a]pyrène diol-époxyde, CDNB : 1-chloro-2,4-dinitrobenzène , CuOOH : hydroperoxyde de cumène  
DCM : dichlorométhane, DCNB : 1,2-dichloro-4-nitrobenzène, ECA : acide éthacrynique

Néanmoins, une activité mesurée avec le CDNB comme substrat (GST<sub>CDNB</sub>) a été retrouvée chez de nombreux macro-invertébrés aquatiques (crustacés, annélides et mollusques), avec des niveaux d'activité relativement élevés, variant de 100 nmol/min.mg de protéines (annélide *Eryobdella octoculata*) à 6.000 nmol/min.mg de protéines (hexapode *Ischnura elegans*). Ces activités mesurées dans l'organisme entier sont de 10 à 600 % plus importantes que celles rapportées dans le foie de rat (Dierickx, 1984).

Chez les **mollusques**, cette activité GST<sub>CDNB</sub> a été détectée aussi bien pour des espèces aquatiques, marines (*Cerithidea obtusa*, *Elizia orbicularis*) ou dulçaquicoles (*Indoplanorbis exustus*, *Lymnaea stagnalis*) que terrestres (*Achatina fulica*) (Balabaskaran *et al.*, 1986, Wilbrink *et al.*, 1991b). Elle est essentiellement présente dans la fraction cytosolique, mais elle a été détectée dans certains cas, à des niveaux extrêmement faibles, dans les fractions microsomales et mitochondriales (Balabaskaran *et al.*, 1986). Chez l'escargot terrestre *Achatina fulica*, cette activité est distribuée dans tout le corps avec une activité spécifique prédominante dans le rein, suivi par la glande digestive, l'intestin, les organes reproducteurs, le cœur et le pied

(Balabaskaran *et al.*, 1986). Cet organisme semble ne contenir que deux formes distinctes de GST, alors que cinq isoenzymes ont été identifiées dans la glande digestive du gastéropode *Nassarius obsoletus* et une seule chez le gastéropode *Cerithium floridanum* (Lee *et al.*, 1988). Par contre, trois formes ont été mises en évidence chez le bivalve *M. edulis* (Sheenan *et al.*, 1991).

L'analyse comparée de la séquence d'ADNc de GST purifiée de glande digestive de calmar (*Ommastrephes sloani pacificus*) présente 32 à 34 % d'identité avec celle de la classe *Pi*, 29 à 32 % d'identité avec la classe *Alpha* et 19 à 23 % d'identité avec les autres classes de GST des vertébrés. De plus, l'analyse du gène de GST de calmar montre un enchaînement d'introns et d'exons similaire à celui du gène de la GST *Pi* des vertébrés (Tomarev *et al.*, 1993). La présence de GST *Pi* est fortement suggérée dans la fraction cytosolique de branchies de *M. edulis* chez qui 60% de similitude ont été rapportés entre une forme de GST et 20 résidus de la séquence N-terminale de la GST *Pi* de souris (Fitzpatrick *et al.*, 1995). De plus, cette forme de GST est également reconnue par un anticorps anti-GST *Pi* de rat. Toutefois, elle métabolise aussi bien le 1,2-dichloro-4-nitrobenzène (DCNB), l'hydroperoxyde de cumène (CuOOH) que l'acide éthacrynique (ECA) qui sont reconnus préférentiellement par respectivement les isoenzymes *Mu*, *Alpha* et *Pi* chez les mammifères (Hayes et Pulford, 1995).

Ces résultats montrent donc des similitudes de structures et d'activités métaboliques entre les isoenzymes d'invertébrés et plus particulièrement de mollusques, et celles de vertébrés. Par contre, ils ne permettent pas de répartir les isoenzymes de GST de mollusques dans les classes définies chez les mammifères. Il semblerait, que les GST des mollusques cumulent les propriétés spécifiques de différentes classes définies chez les vertébrés, suggérant la présence de GST ancestrales. Si tel est le cas, il est possible que les GST de mollusques présentent une faible affinité pour le GSH, comme c'est le cas pour l'isoenzyme Thêta humaine, limitant ainsi l'efficacité des techniques de purification employant des colonnes GSH-agarose, donc l'identification de nouvelles isoenzymes.

### ➤ *Mécanisme catalytique des GST cytosoliques*

Des études cristallographiques de la structure tridimensionnelle des GST ont montré que les sous-unités des GST sont repliées en deux domaines séparés, de structure différente. Le domaine I forme un site nommé G dans lequel se fixe le GSH (Adang *et al.*, 1989). Le domaine II plus grand, contient le site H de fixation des substrats hydrophobes (Nishihira *et al.*, 1995). Si le site de fixation du GSH est hautement spécifique, le site destiné au second substrat est accessible à une variété de molécules hydrophobes. Chaque sous-unité est caractérisée par ces deux domaines et possède un site actif qui agit indépendamment de celui de l'autre sous-unité.

Le GSH se complexe aux GST où il semble exister sous forme d'anion thiolate GS<sup>-</sup> (Graminski *et al.*, 1989). Une fois l'ion GS<sup>-</sup> formé et fixé dans le site actif des GST, un changement de conformation s'opère facilitant l'accès des substrats hydrophobes au site H. Le thiolate est alors capable de réagir spontanément par attaque nucléophile avec le pôle électrophile de ces substrats hydrophobes ancrés à proximité (Jakoby, 1978). La catalyse des GST résulte donc des capacités combinées de l'enzyme à promouvoir la formation de GS<sup>-</sup> et à fixer des composés électrophiles hydrophobes dans un site adjacent.

### ☞ *Régulation de l'expression des GST par les HAP*

La régulation de l'expression des GST est extrêmement complexe. La diversité structurale des composés capables d'augmenter l'expression de ces enzymes suggère la présence de mécanismes régulateurs distincts. En effet, sur le gène *GST A1* de la souris un élément de réponse aux électrophiles (EpRE) a été identifié par Frilling *et al.* (1990). De plus, le gène *GST A2* de rat présente un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE), aux antioxydants phénoliques (ARE), aux barbituriques (*Barbie box element*) et enfin aux xénobiotiques nommé XRE (Hayes et Pulford, 1995). Ce dernier est identique à celui découvert sur le *CYP1A1* de divers mammifères, suggérant des mécanismes de régulation similaire pour ces deux gènes (Fujisawa-Sehara *et al.*, 1986 ; Neuhold *et al.*, 1989 ; Paulson *et al.*, 1990). En effet, le gène *GST A2* de rat contient la même séquence core que celle identifiée sur le gène *CYP1A1* de rat. Toutefois, à l'inverse des gènes *CYP*, le gène *GST A2* ne comporte qu'un seul élément XRE. Cette particularité commune tend à expliquer les résultats de Ding *et al.* (1985) qui ont rapporté une augmentation de l'activité GSTA2 dans le foie de rat traité par le 3MC. L'induction de la GST peut se réaliser suivant deux modalités, d'une part bifonctionnelle lorsque les xénobiotiques augmentent l'expression des enzymes de phase I et de phase II, d'autre part monofonctionnelle pour les xénobiotiques qui induisent uniquement les enzymes de phase II.

A notre connaissance, aucune étude de ce type n'a été réalisée chez les mollusques.

### **II-3.3. Les glutathion peroxydases, GPX**

Chez les **mammifères**, la famille des GPX (EC 1.11.1.9) regroupe quatre isoenzymes différentes : la GPX classique (GPX1), la GPX du tractus-intestinal (GPX2), la GPX plasmatique (GPX3) et la PHGPX (*phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*, GPX4). Les trois premières GPX sont solubles et multimériques, alors que la GPX4 est une forme microsomale de structure monomérique. Les formes hydrosolubles sont localisées dans le cytosol et dans la matrice des mitochondries. Elles sont hautement spécifiques du GSH, mais peuvent réduire aussi bien les peroxydes inorganiques (peroxyde d'hydrogène, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qu'organiques (CuOOH et *tert*-butyl-hydroperoxyde, *t*BuOOH). La PHGPX est localisée dans les

membranes des mitochondries, du noyau et du réticulum endoplasmique. Elle réduit spécifiquement les substrats phospholipidiques (Maiorino *et al.*, 1991).

Les GPX ont une fonction catalytique strictement sélénodépendante. Ces enzymes présentent la particularité de posséder dans leur structure primaire un acide aminé rare, la sélénocystéine (Sec) qui est codée par le codon stop TGA (Böck *et al.*, 1991).

Les GPX sont directement impliquées dans la lutte contre les ERO, puisqu'elles constituent la voie majeure de dégradation des peroxydes. Elles réduisent ces molécules, générant en parallèle du GSSG :  $ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + GSSG + H_2O$ . Les GPX assurent une fonction antioxydante complémentaire aux autres antioxydants non-enzymatiques ( $\alpha$ -tocophérol, acide ascorbique) et enzymatiques (SOD, CAT).

La connaissance de la régulation de ces enzymes chez l'homme progresse, puisque deux éléments de réponse aux agents oxydants (ORE1 et ORE2) ont été identifiées (Cowan *et al.*, 1993). Cette découverte prouve donc que le niveau d'expression de la GPX est soumis à un contrôle par l'état redox de la cellule, afin d'ajuster son abondance à la quantité de peroxydes ou de radicaux libres présents dans la cellule.

Chez les **invertébrés**, les connaissances de ces enzymes en sont encore au stade préliminaire. L'activité GPX mesurée aussi bien avec  $H_2O_2$  qu'avec l'hydroperoxyde de cumène (CuOOH) a été détectée dans la glande digestive et les organes respiratoires mais également dans les tissus musculaires de quatre invertébrés marins : la moule *M. edulis*, la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus*, le crabe *Carcinus maenas* et l'étoile de mer *Asterias rubens*. Elle prédomine toutefois dans les tissus digestifs (Gamble *et al.*, 1995). A notre connaissance, seule une étude a approfondi les investigations sur cette famille d'enzymes et a fait état d'homologies de séquences entre les ARN provenant des différents tissus des organismes cités précédemment et l'ARN de la GPX humaine (Goldfarb *et al.*, 1989).

#### **II-3.4. La glutathion réductase, GR**

Chez les mammifères, la GR (EC 1.6.4.2) est une enzyme dimérique comprenant une molécule de FAD par sous-unité (Carlberg et Mannervik, 1975). Ces deux molécules flaviniques peuvent être réduites par le NADPH, ce qui permet la réduction du GSSG en GSH. En effet, le GSSG résultant de l'oxydation du GSH décrite lors de l'action des peroxydases ne présente aucun intérêt pour la cellule, l'atome de soufre étant bloqué dans le pont disulfure. La GR sert donc à régénérer le stock de GSH, seule forme active dans le maintien de l'équilibre redox cellulaire.

#### II-4. Inductibilité par les HAP chez les invertébrés, cas particulier des mollusques

La réponse du système de biotransformation des invertébrés aux polluants a été étudiée par des approches en conditions contrôlées (**Tab. I-8**) et *in situ* (**Tab. I-9**). Ces deux voies de recherche sont un préambule indispensable pour l'identification de nouveaux biomarqueurs et pour la détermination des contraintes d'application. Les tableaux **I-8** et **I-9**, n'ont pas la prétention d'être exhaustifs mais ont pour ambition de synthétiser diverses études réalisées chez les invertébrés, plus spécifiquement les mollusques, avec l'objectif d'en dégager un certain nombre d'observations. La totalité des études recensées concerne les mollusques aquatiques et plus précisément les bivalves. A notre connaissance aucune expérimentation n'a été réalisée sur des mollusques terrestres.

Dans cet embranchement, exception faite de l'escargot *Lymnaea stagnalis* (Wilbrink *et al.*, 1991a), les activités associées au cytochrome P450 (BaPH, ECOD, EROD, PROD) sont augmentées dans la totalité des expérimentations recensées dans le **tableau I-8** (Suteau *et al.*, 1988, Galli *et al.*, 1988, Meimberg *et al.*, 1997, Schlenk *et al.*, 1988). Cette observation est également valable pour divers invertébrés tels que les échinodermes (Den Besten *et al.*, 1993) et les crustacés (Fossi *et al.*, 1996, 1997, Ishizuka *et al.*, 1996). Les HAP, mais également divers xénobiotiques, sont responsables de ces augmentations. Dans le cas de la palourde *Planorbis*, selon l'espèce considérée, les activités associées aux CYP augmentent d'une façon progressive 3 ou 9 jours après exposition à l'aroclor. Le facteur d'augmentation varie de 3 à 10 selon l'espèce (Meimberg *et al.*, 1997). A l'inverse, aucune réponse temps-dépendante n'est observée après injection de BaP ou de polychloro-biphényle (PCB) dans l'étoile de mer *Asterias rubens*. En effet, chez *A. rubens* l'augmentation de l'activité BaPH est maximale environ 4 jours après l'exposition (Den Besten *et al.*, 1993). Par contre, une réponse dose-dépendante au BaP est observée. Cette relation dose réponse est assez exceptionnelle. En effet, les réponses les plus couramment observées sont une augmentation maximale pour une dose bien définie suivie, soit d'une stabilisation, soit d'une diminution progressive de l'activité. Une augmentation maximale de l'activité ECOD est effectivement observée dès l'injection de la plus faible dose de 3MC dans le crabe *Eriocheir japonicus* (Ishizuka *et al.*, 1996). Par contre, une augmentation transitoire des activités a été rapportée chez la moule *Mytilus edulis* après exposition à un mélange HAP/cuivre, chez la moule *M. galloprovincialis* après exposition au phénobarbital (Galli *et al.*, 1988) et chez l'annélide *Eisenia fetida* après contact avec du BaP (Saint-Denis *et al.*, 1999).

Contrairement au grand nombre de travaux réalisés sur les CYP, peu d'études se sont intéressées aux activités associées au glutathion. Seules quatre équipes se sont attachées à compléter leurs travaux par la mesure de divers paramètres biochimiques impliqués directement ou indirectement dans le métabolisme des xénobiotiques. D'après les résultats récoltés, il semblerait que l'activité

GST répond moins aux polluants que l'activité CYP. En effet, alors que cette dernière est augmentée, la glutathion *S*- transférase reste stable (Suteau *et al.*, 1988, Fossi *et al.*, 1996, 1997, Saint-Denis *et al.*, 1999). Toutefois, ces deux enzymes peuvent également présenter le même profil comme c'est le cas chez l'escargot *L. stagnalis* exposé à l'atrazine (Baturu *et al.*, 1996).

Les expérimentations réalisées *in situ* par prélèvement d'organisme sur des sites contaminés principalement par des HAP voire des PCB montrent, à nouveau, la sensibilité des cytochromes P450 (**Tab. I-9**). En effet, exception faite de l'étude réalisée par Suteau *et al.* (1988) l'augmentation de l'expression ou de l'activité de ces enzymes est rapportée dans toutes les études recensées. De plus, ces travaux ont révélé des corrélations positives entre l'activité BaPH (Garrigues *et al.*, 1990, Narbonne *et al.*, 1991) et la concentration de HAP dans les sédiments ou dans les organismes. Ces mêmes corrélations sont établies en utilisant comme paramètre biochimique la quantité totale de CYP (Solé *et al.*, 1994, 1996, Porte *et al.*, 1991). De plus, des corrélations sont rapportées entre la concentration en PCB et l'ARNm du CYP1A-like dans la glande digestive de *M. galloprovincialis* (Livingstone *et al.*, 1993). Par contre, l'activité GST, explorée uniquement dans deux études, ne montre aucune variation (Solé *et al.*, 1996, Livingstone *et al.*, 1995). Les activités antioxydantes (GR, GPX, SOD et CAT), présentent pour leur part des profils très variables. En effet, pour les organismes prélevés *in situ*, soit ces activités restent stables (Solé *et al.*, 1996, Orbea *et al.*, 1999, Livingstone *et al.*, 1995), soit elles augmentent (Solé *et al.*, 1995, 1994). Alors que pour les organismes transplantés, les activités GR et GPX diminuent (Doyotte *et al.*, 1997, Cossu *et al.*, 1997, 2000). Dans le second cas, l'augmentation de l'activité SOD et CAT est corrélée à la quantité de HAP bioaccumulée dans les moules (Porte *et al.*, 1991, Solé *et al.*, 1994), et l'augmentation de l'activité GPX est corrélée aux PCB (Solé *et al.*, 1994). Ces différences de réponses des enzymes antioxydantes entre les organismes récoltés sur site et ceux transplantés pour une durée bien précise reflètent probablement l'adaptation des organismes à leur environnement. En effet, alors que dans le premier cas les organismes sont soumis à une pollution qu'on pourrait qualifier de chronique, dans le second cas les animaux provenant d'un milieu exempt de pollution puis transplantés sur sites pollués subissent une pollution "aiguë".

En résumé, d'après ces quelques travaux il semble que l'activité CYP soit un marqueur potentiel dont il reste à déterminer les conditions d'utilisation. En effet, il est clairement établi que cet ensemble enzymatique est soumis à des variations biotiques telles que la maturité sexuelle et l'âge, et à des variations abiotiques telles que la température, la nourriture aussi bien chez les mollusques (Solé *et al.*, 1995), les crustacés (Ishizuka *et al.*, 1996), que chez les poissons (Stien *et al.*, 1998). De plus, l'exploration d'activités de conjugaison mais également



d'activités antioxydantes nécessite des études complémentaires pour une validation potentielle de ces enzymes en tant que biomarqueurs de pollution par les HAP.

**Tableau I-8 : Variations des biomarqueurs chez les invertébrés exposés à une pollution dans des conditions contrôlées**

Espèces	Procédure Expérimentale		Variations des paramètres			Références
	Exposition	Contaminants	CYP	GST	Autres	
<b>MOLLUSQUES</b>						
<i>Mytilus edulis</i> (moule)	Mésocosme (4 doses=c,f,m,e.) 115 j (pour e, 25 j)	HAP + Cu	↑ BaPH (m)	→	↑ EH (m et e)	Suteau <i>et al.</i> , 1988
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (moule)	Contamination de l'eau 24 h	PB (200-400-600mg/L) 2 doses en 24h	ECOD h ↑ 200-400 mg/L ↓ 600 mg/L ↑ CYPtot			Galli <i>et al.</i> , 1988
<i>Planorbis planorbis</i> , <i>Planorbis carinatus</i> (palourde)	Contamination de l'eau 1 mesure par jour durant 14j	Aroclor 1254 (3MC + PB)	↑EROD PRODh après 3j pour <i>P. p</i> après 9j pour <i>P. c</i>			Meimberg <i>et al.</i> , 1997
<i>Cryptochiton stelleti</i> (chiton)	Dose orale 3 semaines	βNF 10mg/kg (1 dose/semaine)	EROD et ECOD h nd ↑ BaPH			Schlenk <i>et al.</i> , 1988
<i>Lymnaea stagnalis</i> (escargot)	Contamination de l'eau ou nourriture 24 à 76 h	PB (100-1000ppm dans l'eau) 3MC (750µg imprégnés dans Bemax)	EROD nd h → CYP, PROD h			Wilbrink <i>et al.</i> , 1991a
	Mésocosme 21 j	atrazine (5 - 25 - 125 µg/L) HCB (0,5- 1,25- 5 µg/L)	↓ BaPH h ↑ BaPH h	↓ h ↓↑ h		Baturo <i>et al.</i> , 1996
<b>AUTRES INVERTÉBRÉS</b>						
<i>Asterias rubens</i> (étoile de mer)	Injection 3,7,14 et 28 j	BaP (10 mg/kg)	↑BaPH (4j)			Den Besten <i>et al.</i> , 1993
		PCB (0,65 mg/kg)	↑BaPH (3j)			
<i>Carcinus aestuarii</i> (crabe)	Injection 3 j	BaP (0,1-0,5-2,5-40 mg/kg)	↑BaPH (0,5 et + mg/kg)			Fossi <i>et al.</i> , 1996 et 1997
		PCB (0,16-0,65-3,2 mg/kg)	↑BaPH (3,2 mg/kg)			
		BaP (1 ou 10 µg)	↑ BaPH h (1µg)	→ h		
<i>Eriocheir japonicus</i> (crabe)	Dose orale durant 3 j	PCB (10 ou 100µg)	↑ BaPH h (100µg)	↑ h		Ishizuka <i>et al.</i> , 1996
		MeHg (1 ou 10µg)	↑ BaPH h (1µg)	→ h		
		3MC (0,2-1-5ou 40mg/kg/j)	ECOD↑h ↑ CYP h			
<i>Eisenia fetida andrei</i> (ver de terre)	Contact avec sol artificiellement 1- 2- 7 et 14 j	BaP 0,05-1-100 ou 1000mg BaP/kg sol	MROD ↑ 0,05 et 1mg ↓ 100mg et 1g	→	→ CAT, AChE ↑ MDA t=1j	Saint-Denis <i>et al.</i> , 1999

c, f, m, e = dose : contrôle, faible, moyenne et élevée, h = hépatopancréas ou glande digestive, nd = non détectable

βNF = β-naphtoflavone, 3MC = 3-méthylcholanthrène, AChE = EC 3.1.1.7, acétyl-choline estérase, marqueur de neurotoxicité, BaP = benzo[a]pyrène, BaPH = BaP-hydroxylase, CAT = catalase, Cu = cuivre, CYPtot = mesure par pic à 450 nm, ECOD = 7-éthoxycoumarine-O-dééthylase, EH = époxyde hydrolase, EROD = 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase, GPX = glutathion peroxydases, GST = glutathion S-transférases, HAP = hydrocarbures aromatiques polycycliques, HCB = hexachlorobenzène, MDA = malondialdéhyde, marqueur du stress oxydant, produit de la peroxydation lipidique, PB = phénobarbital, PCB = polychlorobiphényle, PROD = penthoxyrésorufine-O-dééthylase

**Tableau I-9 : Variations des biomarqueurs chez les mollusques exposés à une pollution dans des conditions non contrôlées**

Espèces	Procédure Expérimentale		Variations des paramètres			Références
	Collecte <i>in situ</i>	Contaminant	CYP	GST	Autres	
<b>MOLLUSQUES</b>						
<i>Mytilus edulis</i> (moule)	Langesundfjord 4 stations (1,2,3,4)	HAP, PCB, Cu	→ BaPH e	↑ (2)	→ EH e	Suteau <i>et al.</i> , 1988
	Côte Espagnole 6 mois après un accident pétrolier, sur 5 sites	HAP	→ BaPH h ↑ CYP1A-like protéine h ↑ CYPtot h	→ h	→ SOD, DTD h	Solé <i>et al.</i> , 1996
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (moule)	Côte Française (juin-septembre 87)	HAP	↑ BaPH e		↑EH e	Guarrigues <i>et al.</i> , 1990
	Côte Française	HAP	↑BaPH e			Narbonne <i>et al.</i> , 1991
	Estuaire Basque 1 fois/mois pendant 1an	HAP			→ CAT h	Orbea <i>et al.</i> , 1999
	Côte Espagnole Site réf. et portuaire	HAP, PCB	↑ CYPtot h		→ GPX h ↑ CAT h ↑ SOD h	Porte <i>et al.</i> , 1991
	Côte Italienne +/- proche industries	HAP, PCB	↑ CYP1A-like mRNA h ↑ CYP1A-like protéine h			Livingstone <i>et al.</i> , 1993
	Côte Italienne	HAP, PCB		→ h	→ CAT, SOD h	Livingstone <i>et al.</i> , 1995
	Côte Espagnole Site réf. et portuaire janvier, mars et juin	HAP, PCB	↑ CYPtot h		↑ GPX, SOD et CAT h	Solé <i>et al.</i> , 1995
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (moule)	Côte Espagnole Site réf. et portuaire	HAP, PCB	↑ CYPtot h		↑ SOD h	Solé <i>et al.</i> , 1994
<i>Crassostrea gigas</i> (huître)						
<i>Tapes semidecussata</i> (clams)						
<i>Unio tumidus</i> (moule)	<b>Transplantation</b> rivière +/- proche cokerie 1 sem	HAP, PCB, Métaux			↓GR, GPX hb → CAT, SOD et MDA hb	Doyotte <i>et al.</i> , 1997
	<b>Transplantation</b> rivière +/- proche cokerie 15 et 30 j	HAP, PCB, Métaux			↓ GR, GPX hb ↑MDA b → MDA h → CAT, SOD hb	Cossu <i>et al.</i> , 1997 et 2000

h = hépatopancréas ou glande digestive, b = branchies, e = organisme entier

BaPH = BaP-hydroxylase, CAT = catalase, Cu = cuivre, CYP = cytochrome P450, DTD = DT-diaphorase, ECOD = 7-éthoxycoumarine-O-dééthylase, EH = époxyde hydrolase, GPX = glutathion peroxydases, GR = glutathion réductase, GST = glutathion S-transférases, HAP = hydrocarbures aromatiques polycycliques, MDA = malondialdéhyde, PCB = polychlorobiphényl, SOD = superoxyde dismutase



### **III- Métabolisme des xénobiotiques chez les végétaux, cas particulier des bryophytes**

Le métabolisme des xénobiotiques chez les végétaux peut, comme pour les animaux être divisé en trois phases. Pour ces organismes, les réactions de fonctionnalisation (Phase I) et de conjugaison (Phase II) sont couplées à un procédé de stockage (Phase III). Les plantes, à l'inverse des animaux, ne possèdent pas de système excréteur à l'exclusion d'une exsudation racinaire très limitée. Les conjugués solubles sont donc stockés dans les vacuoles alors que les composés insolubles sont incorporés dans les parois cellulaires.

Toutefois, par leurs aptitudes à métaboliser un grand nombre de xénobiotiques, incluant les PCB et les HAP, les plantes ressemblent à de nombreux égards aux animaux (Sandermann, 1992). Cette ressemblance se retrouve aussi bien au niveau des systèmes métaboliques visant à éliminer les polluants qu'au niveau des systèmes antioxydants. Toutefois, les plantes possèdent quelques particularités que nous allons tenter de souligner dans ce chapitre.

Les systèmes de biotransformation ont principalement été étudiés chez les plantes supérieures et plus particulièrement chez celles qui présentent un intérêt agronomique. Nous nous sommes donc référés aux connaissances acquises chez les végétaux supérieurs et quand cela était possible une comparaison a été réalisée avec celles définies chez les végétaux inférieurs.

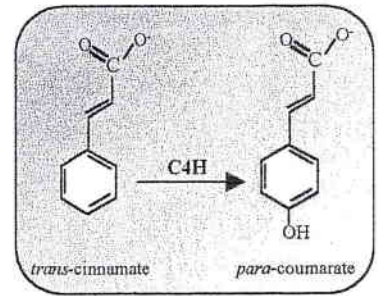
#### **III-1. Le cytochrome P450, CYP**

A l'inverse des CYP des bactéries et des mammifères qui sont étudiés depuis plus de 40 ans, les CYP des plantes n'ont été caractérisés que récemment. Le faible niveau d'activité et l'instabilité de ces enzymes dans les extraits de plantes ont été les deux obstacles majeurs à l'avancée des connaissances dans ce domaine (Chapple, 1998). En conséquence, les données concernant le nombre d'isoenzymes de CYP existant chez les végétaux, ainsi que leur expression restent encore très partielles (Schuler, 1996).

A l'inverse des animaux, aucune activité CYP n'a encore été découverte dans les mitochondries. Il semblerait que les CYP existent principalement dans la membrane du réticulum endoplasmique.

Tout comme les CYP des animaux, ces enzymes interviennent dans la biosynthèse de molécules endogènes (stérols, hormones, terpènes, flavonoïdes...), mais également dans le métabolisme des xénobiotiques tels que les herbicides.

L'activité dominante et ubiquiste détectée chez les plantes est celle de l'acide *trans*-cinnamic-4-hydroxylase (CA4H, CYP73), qui catalyse la conversion de l'acide *trans*-cinnamique en acide *p*-coumarique (Fig. I-15). Ce produit va suivre différentes voies métaboliques et générer des composés constituant la paroi cellulaire (lignine) et des protecteurs des UV (flavonoïdes).



**Figure I-15 : Réaction catalysée par le CYP73**

La 7-éthoxyrésorufine et la 7-éthoxycoumarine, substrats modèles pour les CYP des mammifères, sont également catabolisés par divers CYP existant chez les plantes (Schuler, 1996). L'activité acide laurique hydroxylase a récemment été détectée dans de nombreuses espèces d'algues (Pflumacher *et al.*, 1999).

Les CYP des plantes interviennent dans les processus de détoxication des herbicides, pesticides et nombre de xénobiotiques. Ainsi, la résistance des plantes aux herbicides provient d'une hydroxylation rapide de ces derniers en produits inactifs (Frear *et al.*, 1991). La diversité des herbicides métabolisés suggère l'implication de différents CYP. Actuellement, l'identification de ces enzymes n'a pas encore été réalisée.

Les mécanismes de régulation de l'expression des CYP impliqués dans le métabolisme de substrats endogènes et/ou exogènes ne sont pas encore élucidés (Schuler, 1996).

## III-2. Les enzymes associées au glutathion

### III-2.1. Le glutathion, GSH

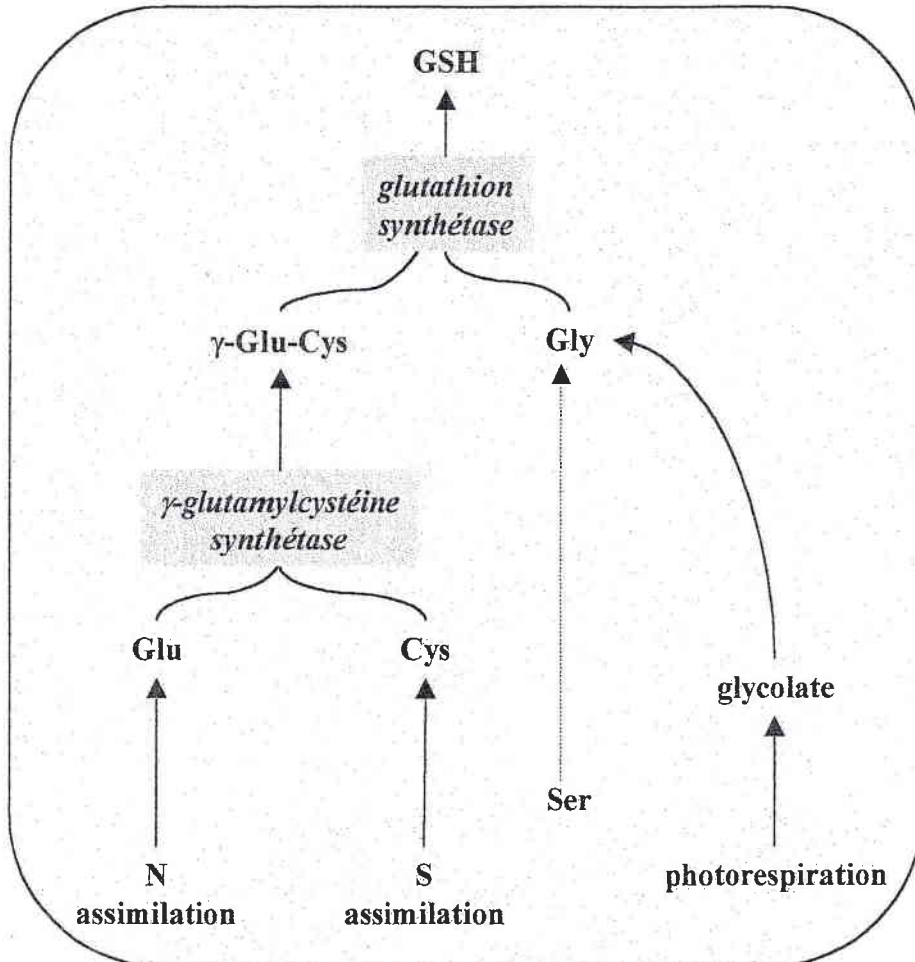
Chez les plantes, le glutathion existe sous forme réduite et sous forme oxydée comme chez les animaux. Par contre, certaines plantes contiennent des tripeptides homologues au GSH, dans lesquels l'acide aminé Gly est remplacé par un autre acide aminé. Ces homologues sont le  $\gamma$ -Glu-Cys- $\beta$ -Ala (homoglutathion, Klapheck, 1988a), le  $\gamma$ -Glu-Cys-Ser (hydroxyméthylglutathion, Klapheck *et al.*, 1992) et le  $\gamma$ -Glu-Cys-Glu (Meuwly *et al.*, 1993). Les formes oxydées de  $\gamma$ -Glu-Cys- $\beta$ -Ala et  $\gamma$ -Glu-Cys-Ser peuvent être réduites par la GR de levure (Klapheck, 1988, Klapheck *et al.*, 1992), suggérant une fonction physiologique et biochimique similaire au glutathion,  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly.

#### 🦋 Biosynthèse du glutathion

La biosynthèse du glutathion semble être commune chez tous les organismes. Deux étapes ATP-dépendantes catalysées par la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase et la glutathion synthétase forment

séquentiellement le  $\gamma$ -Glu-Cys et enfin le glutathion (**Fig. I-16**). Les espèces produisant le  $\gamma$ -Glu-Cys- $\beta$ -Ala possèdent une activité homoglutathion synthétase dont l'affinité pour la  $\beta$ -Ala est plus forte que pour la Gly (Klapheck *et al.*, 1988b).

Le glutathion peut être synthétisé dans le cytosol et les chloroplastes où les deux enzymes impliquées dans la synthèse du GSH ont été détectées (Noctor et Foyer, 1998). Dans les feuilles des plantes, 10 à 50 % du GSH sont localisés dans les chloroplastes, ce qui correspond à une concentration de l'ordre de 0,8 à 2,4 mM (Polle, 1997). Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour établir la concentration dans les autres compartiments.



**Figure I-16 : Biosynthèse du glutathion chez les plantes (Noctor et Foyer, 1998)**

N = azote, S = soufre

La synthèse du glutathion chez les plantes est dépendante de la lumière qui influence la concentration en glycine par le processus de photorespiration (Leegood *et al.*, 1995). La photorespiration correspond à la consommation d'oxygène avec relargage de dioxyde de carbone au cours des phases diurnes. Le glycolate, produit intermédiaire de cette voie métabolique, est capable de générer, par interventions successives de la glycolate oxydase et de la glutamate-glyoxylate aminotransférase, de la glycine, et influence donc la production de GSH.

### ☞ *Rôles Physiologiques*

Chez les plantes, les fonctions physiologiques du glutathion peuvent être divisées en deux catégories : métabolisme du soufre et défense. En effet, le GSH est la forme prédominante de thiol non-protéique (Rennenberg, 1982) qui régule l'absorption du soufre *via* les racines (Lappartient et Touraine, 1996). Le GSH intervient également dans la détoxification des xénobiotiques par les GST (Marrs, 1996) et est impliqué dans la détoxification des métaux lourds étant le précurseur de la synthèse de la phytochélatine (Grill *et al.*, 1989), qui complexe les métaux lourds grâce au groupement thiol de la cystéine. Chez les plantes, comme chez les animaux, le GSH joue également un rôle crucial en tant qu'antioxydant.

Les plantes, à l'inverse des animaux, ne possèdent pas de système d'excrétion. Le conjugué au glutathion est emmagasiné dans les vacuoles. Ces conjugués sont véhiculés vers les vacuoles par une pompe ATP-dépendante similaire à la pompe GS-X caractérisée chez les mammifères (Marrs *et al.*, 1996).

#### **III-2.2. Les glutathion S-transférases, GST**

Les GST des plantes catalysent, comme chez les animaux, la conjugaison de nombreux substrats électrophiles au glutathion. Les GST jouent un rôle majeur par leur capacité à inactiver des produits toxiques. La première GST végétale qui a été décrite chez le maïs était responsable de la détoxification de l'atrazine (Frear *et al.*, 1970). Depuis, cette activité a été trouvée dans de nombreuses plantes supérieures telles que le tabac, le soja et le blé (Marrs, 1996). Certaines GST présentent des activités glutathion peroxydase (Bartling *et al.*, 1993), comme la GST du petit pois *Pisum sativum* (Edwards, 1996). D'autres opèrent apparemment comme de simples transporteurs d'auxine (acide indole 3 acétique) (Jones, 1994), substance naturelle qui stimule l'élongation des racines. Cette fonction de transporteurs semble avoir pour objectif la prévention d'effets cytotoxiques résultant d'une accumulation excessive de cette molécule à l'intérieur des cellules (Listowski *et al.*, 1988).

#### ☞ *Famille multienzymatique*

La classe Thêta, ancêtre des GST, est supposée être présente avant la divergence des procaryotes et des eucaryotes. Les GST des plantes ont généralement été considérées comme des membres de cette classe (Marrs, 1996), qui peut se diviser en trois sous-groupes comme cela a été proposé en 1995 par Droog et ses collaborateurs.

Les trois sous-groupes composant la classe **Thêta** sont nommés : Type I, Type II et Type III. Les GST regroupées dans le Type I présentent le plus de ressemblances avec les GST animales de la classe Thêta suggérant qu'elles pourraient être les GST les plus archaïques chez les plantes. Ce groupe inclut les quatre isoenzymes caractérisées chez le maïs. Les GST de Type II interviennent

dans la coloration des plantes, comme l'expression des gènes relatifs à l'éthylène (l'éthylène a une fonction sur le mûrissement des fruits et est également impliqué dans l'induction de la sénescence des plantes). Enfin, les GST de type III semblent être spécifiques aux plantes. Ces dernières se distinguent tellement des GST de classe Thêta que Droog a proposé, en 1997, une nouvelle classe nommée **Tau**. La validité de cette classe repose sur des identités de séquences d'acides aminés et la conservation de résidus spécifiques. Les GST qui n'appartiendront pas à cette classe, intégreront par défaut la classe Thêta.

Actuellement il n'y a pas réellement d'uniformité de nomenclature comme nous avons pu le rapporter chez les animaux. Effectivement comme l'a souligné justement Droog (1997), la classification actuelle repose sur un nombre limité de séquences (environ 13 séquences plus ou moins complètes) et de connaissances sur les rôles fonctionnels des GST de plantes. Toutefois, d'après cet auteur, l'existence d'un minimum de deux classes de GST chez les plantes, Thêta et Tau, est évidente.

Dans ces deux classes, des activités GST faibles et fortes ont été mesurées avec le CDNB comme substrat. Plus récemment, les GST ont été identifiées dans des algues vertes, rouges et brunes avec le CDNB et le DCNB comme substrats aussi bien dans la fraction microsomale que cytosolique. L'activité GST<sub>CDNB</sub> dans la fraction cytosolique est largement prédominante (Pflumacher *et al.*, 1999).

#### ☞ *Mécanisme catalytique*

La structure tridimensionnelle de la GST2 de classe Thêta d'*Arabidopsis* révèle des similitudes de topologies avec les GST de mammifères (Reinemer *et al.*, 1996). La sous-unité de la GST d'*Arabidopsis* présente deux domaines similaires aux domaines I et II correspondants respectivement aux sites G et H mentionnés chez les mammifères. Le domaine I semble être présent dans les GST de plantes de classe Thêta, qui possèdent donc les résidus nécessaires à la liaison au glutathion. La structure du domaine I des GST appartenant à la classe Tau diffère légèrement de celle de la classe Thêta. La variabilité du domaine II, par contre, est plus importante (Droog, 1997). Ces similitudes supposent un mécanisme catalytique proche de celui décrit précédemment chez les animaux.

#### ☞ *Régulation de l'expression*

Jusqu'à aujourd'hui aucun élément similaire à l'élément de réponse aux xénobiotiques (XRE) n'a été découvert chez les plantes. Par contre, un élément présentant quelques similitudes avec l'élément de réponse aux électrophiles (EpRE) des mammifères, nommé *ocs* (ocopine synthase) a été trouvé chez *Arabidopsis*. Cet élément est inductible en réponse à une variété d'agents

électrophiles comme les hormones et les métaux lourds. Les plantes possédant l'élément de réponse ocs sont : le soja, le blé et le tabac (Marrs, 1996).

Les GST de type I contiennent logiquement un élément de réponse à l'auxine (AuxRE), et celles de type II un élément de réponse à l'éthylène (ERE) (Marrs, 1996).

### III-2.3. La glutathion peroxydase, GPX

A la différence des animaux où la GPX est très bien connue et caractérisée, chez les plantes sa simple existence est controversée. En 1979, Smith et Shrift ont signalé l'absence de cette activité enzymatique dans les plantes **supérieures**. En 1985, Drotar et ses collaborateurs ont mis en évidence, dans des cultures cellulaires de maïs, la présence d'une activité peroxydase utilisant exclusivement le glutathion comme source de thiol, et indifféremment l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le tBuOOH ou le CuOOH comme peroxyde. Ils ont retrouvé ce même type d'activité, qu'ils supposent être une activité glutathion peroxydase, dans des cultures d'épinard, de sycomore, mais pas dans celles de soja. En 1994, Elstner et Osswald parlent de la GPX comme d'une sélénoenzyme utilisant les peroxydes organiques et minéraux pour oxyder le glutathion, attribuant à cette enzyme toutes les fonctions et caractéristiques de la GPX des animaux.

Des expérimentations plus poussées ont révélé des homologies de séquences de l'ordre de 40 % entre les ADNc de GPX des animaux et ceux de *Nicotiana sylvestri* (Criqui *et al.*, 1992). Toutefois, l'ADNc de la GPX de *N. sylvestri* contient un codon TGT ou TGC qui code la cystéine du site actif, au contraire des animaux qui possèdent le codon stop TGA qui code la sélénocystéine. Selon les auteurs, la GPX détectée dans *N. sylvestri* n'est donc pas une sélénoenzyme comme chez les animaux.

Dans les plantes **inférieures**, de nombreux tests réalisés sur des extraits d'algues vertes (*Dunaliella primolecta*) et d'algues rouges (*Porphyridium cruentum*) n'ont pas permis de démontrer la présence d'une activité GPX (Gennity *et al.* 1985) qui, par contre, a été détectée dans l'algue *Euglena gracilis* (Overbaugh et Fall 1985). Elle présente une affinité particulière pour H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette enzyme ne contient pas de sélénium, comme les GPX des plantes supérieures, ce n'est donc pas une sélénoprotéine. Cette dernière est localisée dans le cytoplasme alors que la GPX d'*Arabidopsis thaliana* et de *Brassica campestris* est présente dans le stroma des chloroplastes (Eshdat *et al.*, 1997).

### III-2.4. La glutathion réductase, GR

Chez certaines espèces de plantes, différentes formes de GR existent (Edwards *et al.*, 1994). L'activité principale de la GR des feuilles des plantes **supérieures** est localisée dans le stroma des chloroplastes (Polle, 1997). En effet, dans les cellules mésophylliennes des feuilles de pois, 77 à 82 % de l'activité GR est présente dans cet organe. Une faible activité

mitochondriale (environ 3%) a également été détectée dans les feuilles de pois, mais pas dans celles de tabac (Edwards *et al.*, 1990). Dans les tissus non photosynthétiques, l'activité est au contraire prédominante dans le cytosol. La GR cytosolique représente environ 90 % de l'activité dans l'endosperme de fève et 70 % dans les racines de pois (Bielwaski et Joy, 1986, Klapheck *et al.*, 1990).

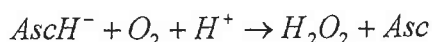
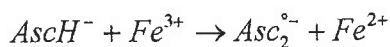
Par contre, l'activité GR dans les chloroplastes est faible pour les eucaryotes photosynthétiques inférieurs. Elle ne représente, respectivement, que 22 % et 13 % de l'activité dans les algues *Euglena* et *Chlamydomonas* (Shigeoka *et al.*, 1987, Takeda *et al.*, 1997, Serrano et Llobell, 1993).

### III-3. L'ascorbate et l'ascorbate peroxydase

#### III-3.1. L'ascorbate, Asc

Chez les plantes, l'ascorbate (Asc) est présent dans les tissus photosynthétiques et non-photosynthétiques (Foyer *et al.*, 1983). L'ascorbate est l'antioxydant hydrosoluble prédominant dans les feuilles des plantes, représentant environ 30 à 40 % de la totalité des composants dans les chloroplastes, ce qui correspond à une concentration de l'ordre de 12 à 25 mM (Polle, 1997).

Cette molécule présente de nombreuses propriétés antioxydantes comme la capacité d'éliminer les radicaux  $O_2^{\circ-}$ ,  $H_2O_2$  et  $OH^{\circ}$  et de régénérer l' $\alpha$ -tocophérol. Malheureusement, elle peut également avoir des propriétés pro-oxydantes associées à sa capacité à réduire le fer. Elle provoque la réduction de  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  et l'oxydation de  $O_2$  en  $H_2O_2$ , fournissant ainsi tous les composants nécessaires à la réaction de Fenton :

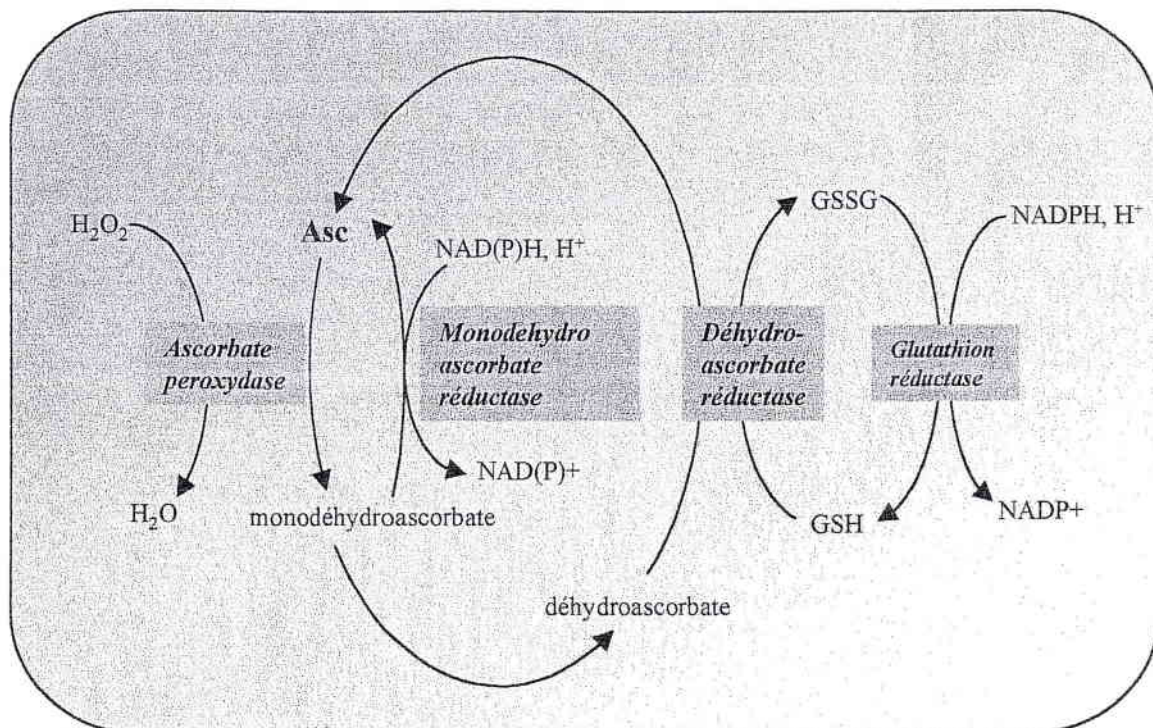


La voie de biosynthèse de l'ascorbate à partir du glucose est identifiée depuis longtemps. Par contre, la localisation de cette voie métabolique n'est pas clairement établie (Noctor et Foyer, 1998).

#### III-3.2. L'ascorbate peroxydase, APX (EC 1.11.1.7)

Chez les plantes, l'ascorbate peroxydase (APX) est la principale enzyme intervenant dans la prévention de l'accumulation du peroxyde d'hydrogène. Elle est considérée comme l'enzyme antioxydante par excellence.

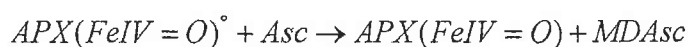
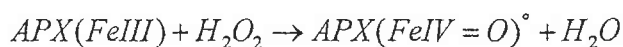




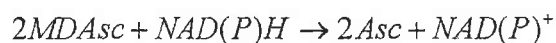
**Figure I-17 : Cycle ascorbate-glutathion dans les chloroplastes de plantes supérieures (Foyer et Halliwell, 1976)**

#### 🔍 Mécanisme réactionnel (Fig. I-17)

L'APX est une hémoprotéine qui catalyse la réduction de  $H_2O_2$  tout en oxydant l'ascorbate suivant un mécanisme catalytique qui repose sur un modèle de type ping-pong. L'enzyme ferrique ( $Fe^{III}$ ) est oxydée par  $H_2O_2$ , produisant un intermédiaire oxydé. Ce dernier oxyde l'ascorbate *via* deux réactions successives qui produisent deux molécules de monodéhydroascorbate (MDAsc) suivant la réaction ci-dessous :



Le MDAsc généré est alors réduit en Asc par l'intervention de la monodéhydroascorbate réductase. Cette enzyme est un FAD-enzyme qui est capable d'utiliser le NADPH ou le NADH comme donneur d'électron. Elle catalyse la réaction suivante :



La déhydroascorbate réductase, pour sa part, participe à la réduction du déhydroascorbate, généré par réaction spontanée, avec oxydation concomitante du glutathion.

#### 🔍 Localisation de l'APX

L'APX joue un rôle prédominant dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène chez les plantes. Toutefois, dans les glyoxysomes et les peroxysomes,  $H_2O_2$  sera essentiellement pris en charge



par la catalase qui est très largement majoritaire dans ces compartiments. En effet, la concentration en catalase est de 4 mM, alors que la concentration de l'APX est de 70  $\mu$ M dans les chloroplastes (Asada, 1997).

De 70 à 80 % de l'APX sont localisées dans les chloroplastes (Polle, 1997). Dans ces organites, 50 % sont liés aux thylacoïdes à proximité du photosystème I (Miyake et Asada, 1992, Polle, 1997), l'autre moitié, quant à elle, est localisée dans le stroma (Chen *et al.*, 1992, Polle, 1997). Cette enzyme a également été repérée dans le cytosol de feuilles, dans des tissus non-photosynthétiques, dans les peroxysomes et dans les glyoxysomes (Asada, 1997).

Comme l'APX, la monodéhydroascorbate réductase a été trouvée non seulement dans les chloroplastes mais également dans les mitochondries, les peroxysomes et le cytosol.

#### III-4. La catalase, CAT

C'est une enzyme héminique qui dégrade rapidement  $H_2O_2$  ( $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ ). Elle est connue comme l'une des enzymes les plus actives produites dans la nature (Scandalios *et al.*, 1997). La catalase est la seule enzyme capable de dégrader le peroxyde d'hydrogène sans consommation d'équivalent réducteur.

Toutes les plantes examinées présentent cette activité qui, dans certains cas, constitue une famille multi-enzymatique. Parmi les espèces qui présentent différentes isoenzymes, on peut citer le tabac (Havir et McHale, 1987, Willekens *et al.*, 1994), le coton (Ni *et al.*, 1990), le potiron (Yamaguchi *et al.*, 1986), la tomate (Gianinetti *et al.*, 1993) et le maïs (Scandalios *et al.*, 1997). Ce dernier végétal, *Zea mays*, présentant une grande importance sur le plan agronomique, a fait l'objet d'une attention particulière quant aux propriétés biochimiques, génétiques et moléculaires de la CAT (Scandalios, 1990).

Dans cet organisme, trois gènes nucléaires *Cat1*, *Cat2* et *Cat3* codant trois isoenzymes biochimiquement différentes CAT-1, CAT-2 et CAT-3 ont été identifiés. Ces isoenzymes sont composées de quatre sous-unités d'environ 60 kDa qui sont structurellement identiques aux catalases des autres organismes (Chandlee *et al.*, 1983). Les isoenzymes CAT-1 et CAT-2 sont cytosoliques ou peroxysomales. Au contraire, l'isoenzyme CAT-3 est exclusivement mitochondriale (Scandalios *et al.*, 1980).

La présence d'une séquence homologue à l'élément de réponse aux antioxydants (ARE) de la GST de rat a été mise en évidence dans ces 3 gènes. L'ARE représente un élément de réponse en *cis* qui active les gènes pour protéger les cellules eucaryotes contre le stress oxydant. Un second élément de réponse, mais celui-ci aux métaux (MRE) est présent uniquement dans le gène *Cat2*. Ce motif a été trouvé dans la région promotrice de la métallothionéine qui peut lier les métaux lourds et est donc impliquée dans la détoxification de ces derniers.

### III-5. Localisation préférentielle des antioxydants

Comme cela a été mis en évidence pour l'APX et la catalase, les systèmes antioxydants des plantes sont localisés dans tous les compartiments sub-cellulaires (**Fig.I-18**). Ces systèmes sont composés d'antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. La connaissance de cette répartition est importante pour appréhender, suivant la cible du polluant, l'antioxydant ou les antioxydants susceptibles d'être davantage impliqués dans les processus de détoxication.

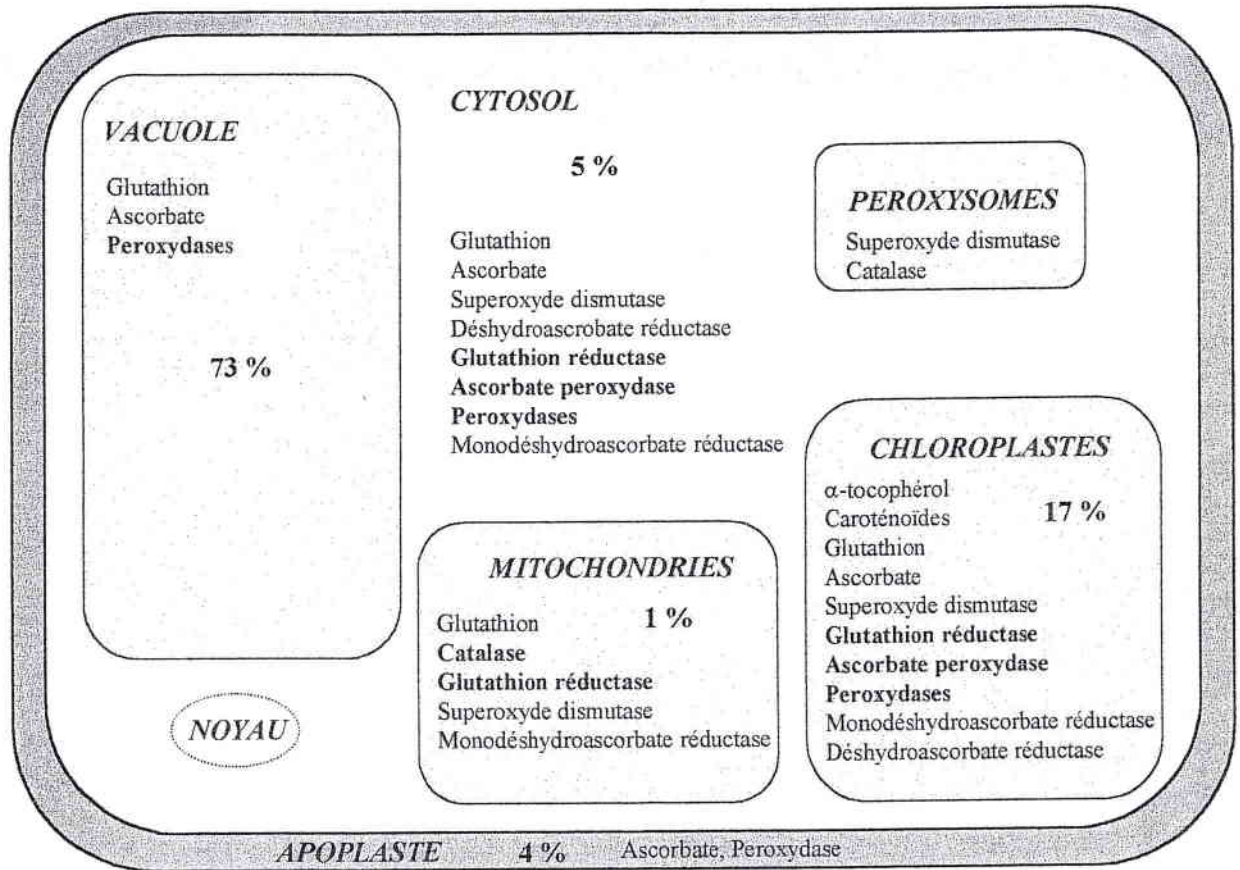


Figure I-18 : Localisation sub-cellulaire du système antioxydant chez les plantes (Polle, 1997)

### III-6. Inductibilité par les HAP

L'induction d'enzymes et/ou les changements de profils d'isoenzymes ont été fréquemment utilisés pour augmenter la résistance des plantes aux diverses agressions. Dans les études analogues à la notre, ces variations sont utilisées en tant que biomarqueurs d'effets de pollution. Les chercheurs se sont principalement intéressés à l'importance des changements des conditions environnementales tels que la température, l'humidité, le stress salin et l'intensité lumineuse sur les dommages oxydants des plantes. Les polluants de l'air comme le dioxyde de soufre, l'ozone ou les herbicides qui agissent sur les plantes par l'intermédiaire d'une production accrue de ERO sont également au cœur des travaux de recherche. Par contre, la pollution de l'air par les HAP a suscité nettement moins d'intérêt.

Les **tableaux I-10** et **I-11** résument certaines études rapportant les effets de la pollution par les HAP sur les enzymes de biotransformation chez les plantes.

L'APX est augmentée de 35 % après exposition contrôlée de racine d'artichaut *Helianthus tuberosus* au BaA (Robineau *et al.*, 1998). Le traitement de la mousse aquatique *Fontinalis antipyretica* par le BaP provoque le même niveau d'augmentation (25 %) de l'activité APX (Roy *et al.*, 1994). Dans ces deux cas de figures, l'activité GR est augmentée d'environ 25 %. À l'inverse, seule la mousse présente une augmentation de l'activité GST<sub>CDNB</sub>, suggérant l'implication de cette enzyme dans le métabolisme du BaP. Les profils de l'APX et de la GR sont inversés après pulvérisation de paraquat ou après soumission à un stress hydrique de feuilles de pois, *Pisum sativum*. Ces feuilles présentent également une diminution de l'activité CAT et SOD (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 1998). Il est intéressant de remarquer, pour les trois études où les organismes ont été exposés à un HAP, le même sens de variations des activités APX, CAT, GR et SOD.

La transplantation de *F. antipyretica* sur des sites plus ou moins chargés en HAP provoque, tout comme l'expérimentation en conditions contrôlées, l'augmentation des activités APX et SOD. Ces variations sont corrélées à la concentration en HAP dans l'organisme (Roy *et al.*, 1996). Il faut noter que ces augmentations sont nettement plus importantes lors de l'expérimentation *in situ*, reflet probable de la présence de divers HAP.

Ces différentes études montrent bien l'importance de l'APX chez ces organismes lors d'une intoxication par un ou plusieurs HAP et l'implication des activités GST dans le métabolisme du BaP.

**Tableau I-10 : Variations des enzymes de biotransformation des xénobiotiques et de marqueurs de stress chez les plantes en conditions contrôlées**

Espèces	Procédure Expérimentale		Variations des paramètres étudiés					Références
	Exposition	Polluant	APX Asc	CAT	GST GSH/GSSG	GR	Autres	
<i>Mousse aquatique</i> <i>Fontinalis antipyretica</i> (entière)	milieu liquide 168 h	BaP 0,5 µM	+25% APX		+35% GST <sub>CDNB</sub>	+ 30%	SOD + 57%	Roy <i>et al.</i> , 1994
<i>Bois</i> <i>Pinus sativum</i> (feuille)	pulvérisation 6 h	Paraquat 100 µM	- 90% APX - 87% Asc	- 48%	- 73% GSH + 43% GSSG	- 48%	SOD - 50%	Iturbe- Ormaetxe <i>et al.</i> , 1998
	stress hydrique 7-9 j		-50% APX -40% Asc	- 50%		- 50%	SOD 0%	
<i>Artichaut</i> <i>Helianthus tuberosus</i> (racine)	milieu liquide 48 h	BaP ou PB 260 µM					CYP76B1 augmentation des transcripts	Robineau <i>et al.</i> , 1998
		BaA 0,5 µM	+35% APX		0% GST <sub>CDNB</sub>	+ 25%	SOD + 20%	

APX = ascorbate peroxydase, Asc = ascorbate, BaA = benzo[*a*]anthracène, BaP = benzo[*a*]pyrène, CAT = catalase, GR = glutathion réductase, GSH = glutathion réduit, GSSG = glutathion oxydé, GST = glutathion *S*-transférases, PB = phénobarbital, SOD = superoxyde dismutase

**Tableau I-11 : Variations des enzymes de biotransformation des xénobiotiques et de marqueurs de stress chez les plantes en conditions non contrôlées**

Espèces	Procédure Expérimentale		Variations des paramètres étudiés					Références
	Exposition	Polluant	APX Asc	CAT	GST GSH/GSSG	GR	Autres	
<i>Mousse aquatique</i> <i>Fontinalis antipyretica</i> (entière)	Transplantation "moss-bags" 35 j Port	HAP (26 ng/L de 2 à 3 cycles) (15 ng/L de 4 à 5 cycles)	+ 150% APX			+ 0%	PX + 100% SOD + 70%	Roy <i>et al.</i> , 1996
<i>Chenopodium rudecta</i>	Transplantation sur site proche : trafic ou industrie 3 mois						MDA + 48% pour site fortement industrialisé + 0% site +/- proche du trafic	Gonzalez <i>et al.</i> , 1997
<i>Sida</i> <i>albanica</i>	Collectée sur les côtes françaises	HAP					CA4H + 50 %	Narbonne <i>et al.</i> , 1991

APX = ascorbate peroxydase, Asc = ascorbate, CA4H = cinnamic acide 4-hydroxylase, CAT = catalase, GR = glutathion réductase, GSH = glutathion réduit, GSSG = glutathion oxydé, GST = glutathion *S*-transférases, MDA = malondialdéhyde, PX = peroxydase, SOD = superoxyde dismutase

*~ Objectifs & Stratégie ~*

Les HAP ne font pas partie des polluants actuellement contrôlés par les réseaux de surveillance de la qualité de l'air, bien qu'ils soient reconnus comme des composés hautement réactifs. Les raisons de cette lacune sont probablement liées aux difficultés techniques inhérentes à ces molécules (échantillonnage et dosage). L'utilisation de biomarqueurs, permettant d'évaluer les effets biologiques des HAP sur des organismes sentinelles, représente donc une alternative intéressante, que nous avons cherché à développer dans ce travail.

Dans le but d'aborder au mieux cette étude, il nous a paru pertinent d'explorer divers paramètres biochimiques, parallèlement, dans un organisme animal et végétal.

Comme de nombreux mollusques, les gastéropodes terrestres sont capables d'accumuler les métaux (Beeby, 1985, Berger et Dallinger, 1989). L'espèce *Helix aspersa* (petit gris), plus particulièrement, est employée fréquemment en tant que bioindicateur de la pollution métallique. Les métaux provoquent en effet chez ces individus une inhibition de la croissance (Gomot, 1997) et du développement du tractus génital (Gomot-De Vaufleury et Kerhoas, 2000). Cet organisme permet l'exploration individuelle de trois organes (glande digestive, rein et toit de la cavité palléale) qui nous permettront d'étudier au mieux les capacités métaboliques de ce dernier. De plus, la possibilité de réaliser un élevage contrôlé en laboratoire est un atout majeur pour limiter au mieux les variabilités abiotiques et biotiques.

Chez les végétaux, les mousses possèdent des caractéristiques morphologiques intéressantes pour l'étude de la pollution atmosphérique. En effet, ces dernières sont dépourvues de systèmes vasculaires et de racines et présentent une grande surface d'échange avec l'air d'où elles prélèvent la totalité de leurs substances nutritives, mais également les polluants. Ces propriétés en font des bioaccumulateurs performants de métaux lourds (Steinnes *et al.*, 1992) et de polluants organiques, tels que les HAP (Thomas *et al.*, 1984, Milukaité, 1998, Holoubek *et al.*, 2000). Parmi douze plantes étudiées, comprenant des plantes inférieures et des feuilles ou des aiguilles de plantes supérieures, les mousses sont apparues comme les plus efficaces pour l'étude de l'accumulation des HAP (Thomas *et al.*, 1984, 1985). Ces différentes propriétés, font qu'elles sont employées pour la surveillance active de métaux (Wegener *et al.*, 1992) et des HAP (Viskari *et al.*, 1997) aussi bien par prélèvement d'espèces autochtones pour la surveillance passive de la pollution atmosphérique par les métaux, (Steinnes *et al.*, 1992) que par l'utilisation de la technique des transplants, "Moss-bags" (Wegener *et al.*, 1992, Viskari *et al.*, 1997). L'espèce *Pleurozium schreberi* a été sélectionnée pour nos travaux pour trois raisons. Tout d'abord, elle tolère une grande variété de conditions climatiques, telles que des températures extrêmes et une déficience en eau (Vitt *et al.*, 1988), ensuite, elle est utilisée dans une étude européenne coordonnée par le 'Nordil Council', pour la détermination de la charge atmosphérique en métaux



lourds et enfin, elle est reconnue comme étant performante pour la surveillance des dépôts de HAP originaire du trafic routier (Viskari et al., 1997) et pour évaluer le flux de BaP (Milukaité, 1998).

Ainsi, *Helix aspersa* et *Pleurozium schreberi* ont été retenus comme organismes modèles. Les variations des enzymes du système du glutathion (GST, GPX et GR) ont été étudiées dans ces deux organismes. Chez *H. aspersa* le CYP a également fait l'objet de notre attention alors que chez *P. schreberi* l'APX et la CAT ont complété ce panel d'activités enzymatiques. Cette étude multi-paramétrique, tant au niveau des organismes étudiés que des enzymes examinées, est indispensable lors d'une première exploration pour l'identification d'un ou plusieurs biomarqueurs.

Après avoir défini les conditions essentielles à une bonne utilisation des organismes que nous avons choisis, nous avons établi les niveaux de base des paramètres biochimiques que nous désirions explorer.

Cette étude préliminaire achevée, la stratégie déployée comprend trois types de démarches caractérisées par une exposition des organismes à une pollution de complexité croissante. En premier lieu, la réponse des différents paramètres biochimiques a été étudiée après exposition des organismes à une pollution simple et contrôlée. Dans ce cadre, le naphtalène a été choisi pour sa capacité à se sublimer à température ambiante et, représentant l'un des éléments majeurs des gaz d'échappement. La seconde approche a consisté à évaluer la variation de ces paramètres dans une ambiance de travail chargée en une multitude de HAP plus ou moins lourds. Cette opportunité nous a été offerte par l'Institut National de Recherche et de Sécurité (Vandœuvre Lès Nancy) qui nous a permis de réaliser cette expérimentation dans une industrie dont le procédé de fabrication génère une grande quantité de HAP. Les organismes ont donc été implantés sur une chaîne de production à une distance plus ou moins importante de la source génératrice de HAP. L'exposition aux HAP de ces derniers a été estimée par la mesure du BaP qui a été choisi comme traceur de cette famille de polluants. Cette phase était une étape intermédiaire avant l'étude de la pollution atmosphérique en milieu urbain, dont la complexité associe divers types de polluants et conditions climatiques. Celle-ci a été réalisée dans l'agglomération Nancéienne où les organismes ont été implantés sur trois sites sélectionnés en fonction leur niveau de pollution.

*~ CHAPITRE II ~*

*Matériels & Méthodes*



~ CHAPITRE II ~

*Matériels & Méthodes*

<b>I- Matériels biologiques.....</b>	<b>69</b>
I-1. L'escargot : <i>Helix aspersa</i> .....	69
I-2. La mousse : <i>Pleurozium schreberi</i> .....	69
<b>II- Préparation des échantillons .....</b>	<b>69</b>
<b>III- Mesure des activités enzymatiques .....</b>	<b>71</b>
III-1. Les cytochromes P450 : l'activité EROD, PROD et ECOD.....	71
III-2. Les glutathion S-transférases .....	72
III-2.1. Activité GST <sub>CDNB</sub> .....	72
III-2.2. Activité GST <sub>NQO</sub> .....	73
III-3. Les glutathion peroxydases.....	73
III-4. La glutathion réductase.....	74
III-5. L'ascorbate peroxydase.....	75
III-6. La catalase .....	75
III-7. Le dosage des protéines.....	76
<b>IV- Protocoles d'exposition .....</b>	<b>76</b>
IV-1. Expérimentation en conditions contrôlées : intoxication par le naphthalène (NAP) .....	76
IV-2. Expérimentation semi-contrôlée, en milieu industriel.....	76
IV-3. Expérimentation non contrôlée, en milieu urbain .....	78
IV-3.1. Descriptif des sites.....	78
IV-3.2. Procédure expérimentale pour les escargots.....	78
IV-3.3. Procédure expérimentale pour les mousses.....	79
<b>V- Analyses statistiques.....</b>	<b>80</b>

## I- Matériels biologiques

### I-1. L'escargot : *Helix aspersa*

Un élevage a été mis en place suivant les recommandations de Gomot-De Vaufleury (2000) dans des conditions contrôlées de température ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) et de lumière (photopériode de 18 h à l'aide d'une lampe type lumière du jour Mazdafluor TF "P" 36W/JR 865).

Les accouplements sont réalisés dans les conditions ainsi définies. Les pontes obtenues sont identifiées. Après éclosion, les escargots d'une même ponte sont répartis par lot de soixante sur papier humide déposé dans des bacs à souris, en polystyrène cristal (IFFA CREDO), à couvercle plat. Le nettoyage des boîtes et le changement de nourriture (Helixal, premier âge, Société Lépine, Clairveaux-les-Lacs) sont réalisés trois fois par semaine. Après quinze jours de nursery, les escargots sont répartis par lots de cinq dans des boîtes doubles. Les cycles de nettoyage et de nourriture sont identiques aux précédents. Après 1 mois de croissance, la nourriture est alors du type deuxième âge et ne contient plus de facteurs de croissance. La croissance des animaux est stoppée avant l'âge de deux mois par mise en estivation (à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité). Le réveil se réalise par humidification des organismes qui sont ensuite remis en élevage jusqu'à l'âge de deux mois. Les expérimentations s'effectuent sur des animaux âgés de deux mois et provenant d'une même ponte.

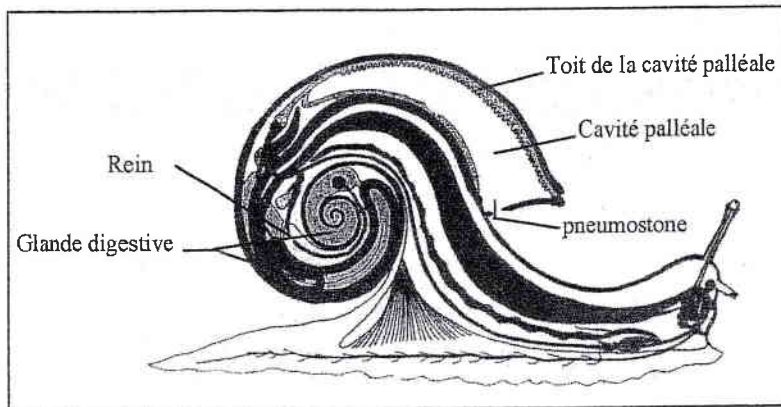
### I-2. La mousse : *Pleurozium schreberi*

A l'inverse des escargots, la culture de mousses est extrêmement délicate. En conséquence, huit jours avant de débiter une expérimentation, des tapis de *P. schreberi* sont prélevés dans une forêt de conifères à proximité de Haguenau (Bas-Rhin), site préservé au mieux de la pollution atmosphérique. Ces tapis de mousses sont ensuite acheminés au laboratoire dans des sachets micro-aérés, où ils sont débarrassés des débris végétaux et des insectes. Après ce nettoyage succinct, *P. schreberi* est acclimatée pendant huit jours dans des conditions contrôlées de température ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) et sous lumière naturelle. Durant cette période, elle est hydratée chaque jour avec de l'eau minérale Evian (Roy *et al.*, 1994).

## II- Préparation des échantillons

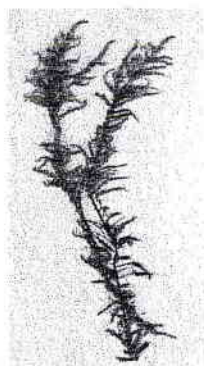
Après exposition, les escargots sont plongés directement dans l'azote liquide, puis conservés à une température de  $-80^\circ\text{C}$  jusqu'au moment de la préparation des extraits enzymatiques. Après

décongélation sur un verre de montre posé sur un lit de glace, la glande digestive, le rein et le toit de la cavité palléale sont rapidement isolés (**Fig. II-1**). Chaque organe est alors lavé, pesé, puis coupé en petits morceaux. L'homogénéisation est réalisée à l'aide d'un broyeur Ultra-Turrax (20.000 rpm, 5 sec), dans du tampon phosphate de potassium (0,1 M, pH 7,0) contenant 1 mM d'EDTA, à raison de 1 mL de tampon pour 100 mg d'organe.



**Figure II-1 : *Helix aspersa***

En ce qui concerne les mousses (**Fig. II-2**), après le traitement préliminaire, la partie chlorophyllienne des mousses est immédiatement récupérée et broyée sous azote liquide dans un mortier où elle est réduite en fine poudre. Un gramme de cette poudre est homogénéisé à l'aide d'un Ultra-Turrax (20.000 rpm, 5 sec) dans 5 mL de tampon phosphate de potassium (0,1 M, pH 7,0) contenant 1 mM d'EDTA et 3 mM d'Asc.



**Figure II-2 : *Pleurozium schreberi***

Les homogénats, d'escargots ou de mousses, ainsi préparés sont alors soumis à trois centrifugations successives :

- 10 min à 1.500 x g à 4°C (JOUAN, GR 412), élimination du culot
- 15 min à 12.000 x g à 4°C (JOUAN, MR 14.11), élimination du culot
- 60 min à 105.000 x g à 4°C (BECKMAN, TLX100), séparation des fractions cytosolique et microsomale.

Dans le cas des mousses, le dernier surnageant ainsi obtenu est immédiatement utilisé pour mesurer les différentes activités enzymatiques étudiées. Aucune analyse n'est réalisée sur les

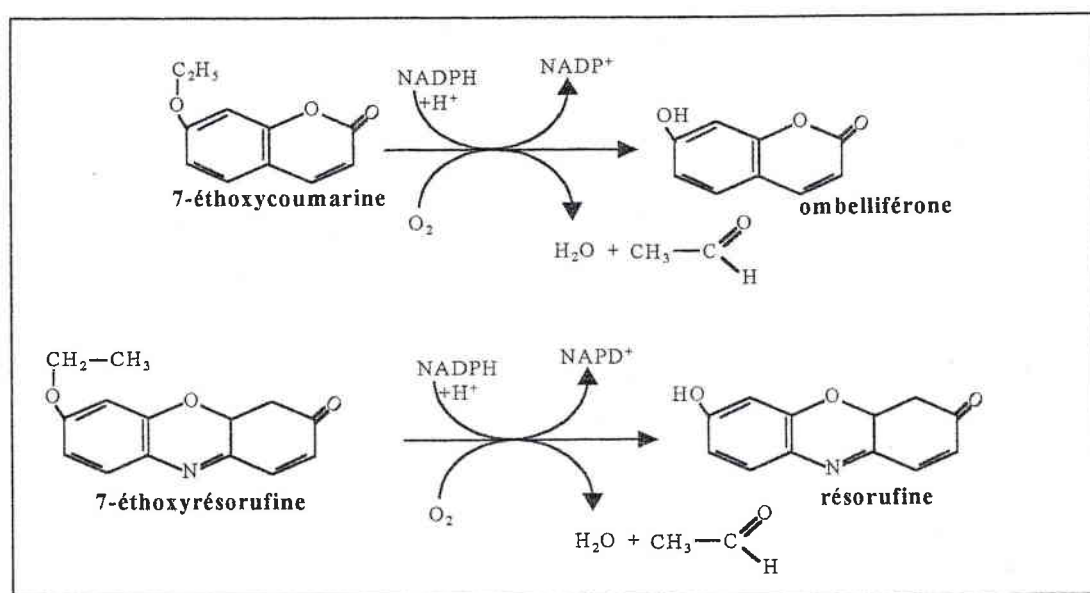
microsomes de mousses. A l'inverse, les microsomes d'escargot sont remis en suspension à l'aide d'un homogénéiseur de Dounce, dans un volume réduit de tampon phosphate de potassium 0,1 M (pH 7,4) contenant 1 mM EDTA, 1 mM DTT et 20 % (v/v) de glycérol, afin d'obtenir une concentration de protéines de 0,5 à 1 mg/mL. Les fractions cytosoliques et microsomales d'escargot sont conservées à -80°C jusqu'à la mesure des activités associées au glutathion et CYP.

### III- Mesure des activités enzymatiques

Les conditions optimales ont été déterminées pour chaque protocole de mesure d'activités des enzymes de *H. aspersa* et de *P. schreberi*. Les mesures ont donc été réalisées avec des concentrations de substrats correspondant à  $10 \times K_M$ , à l'exception de certains substrats dont la solubilité en milieu aqueux est un facteur limitant.

#### III-1. Les cytochromes P450 : l'activité EROD, PROD et ECOD

Les CYP sont une famille multienzymatique, dont l'activité des sous-familles peut être mesurée, chez les mammifères, par un substrat préférentiel. En effet, dans ces organismes, la 7-éthoxy- (7-ETR) et la 7-pentoxy-résorufine (7-PTR) sont dééthylées en résorufine préférentiellement par le CYP1A et le CYP2B et la 7-éthoxycoumarine (7-ETC) par les CYP2A et 2B (Rendic *et al.*, 1997). Ces dosages consistent donc à suivre, dans le cas des alkoxy-résorufines, la vitesse d'apparition du composé fluorescent, la résorufine (Burke *et al.*, 1985) et, pour la 7-ETC, de l'ombelliférone (Ullrich et Weber, 1972) au cours des réactions schématisées ci-dessous :



### Conditions expérimentales :

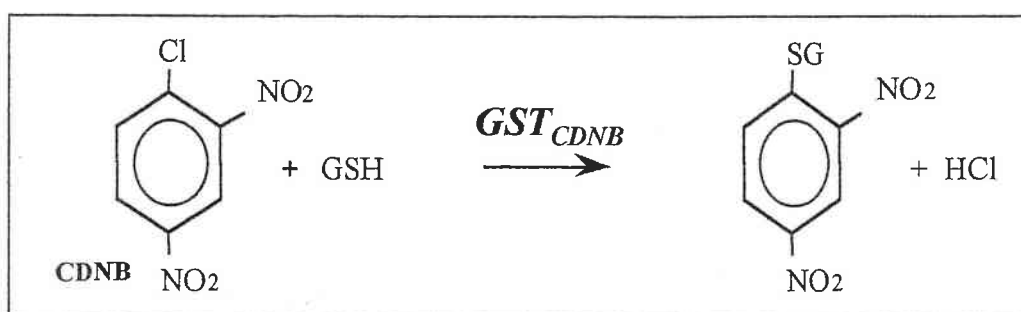
Réactifs	Concentrations finales
Protéines microsomales	100 à 200 µg/mL
Tampon K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,4)	100 mM
7-ETR ou 7-PTR ou 7-ETC	13 ou 15 ou 50 µM
Préincubation 1 min à 37 °C	
NADPH	250 µM

Les réactions sont déclenchées par addition de NADPH après une minute d'incubation à 37°C. L'augmentation progressive de la fluorescence générée par la production de résorufine ou d'ombelliférone est suivie par un spectrofluorimètre (SFM 25, KONTRON) à 37°C, respectivement à 530 nm ou 580 nm (longueur d'onde d'excitation) et 585 nm ou 460 nm (longueur d'onde d'émission).

## III-2. Les glutathion *S*-transférases

### III-2.1. Activité GST<sub>CDNB</sub>

Les glutathion *S*-transférases regroupent plusieurs isoenzymes en familles qui présentent des spécificités chevauchantes de substrat. Le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) est considéré comme un substrat universel, reconnu par la majorité des GST (Habig *et al.*, 1974), ce qui explique que certains parlent encore de GST totale. Comme, il est établi que les GST de la classe Thêta ne reconnaissent pas ce substrat (Meyer *et al.*, 1991), nous parlerons d'activité GST<sub>CDNB</sub>. Ce dosage consiste à suivre la vitesse d'apparition du conjugué au glutathion formé au cours de la réaction suivante :



### Conditions expérimentales

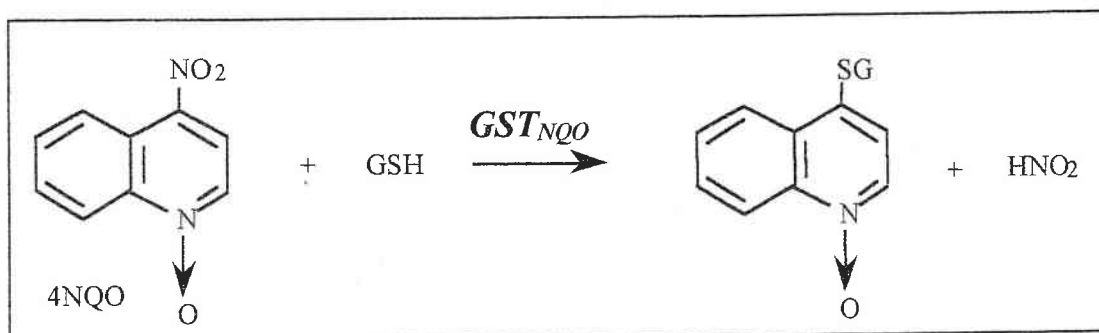
Réactifs	Concentrations finales	
	<i>P. schreberi</i>	<i>H. aspersa</i>
Protéines cytosoliques	170 µg/mL	8 à 40 µg/mL
Tampon K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 6,5)	100 mM	100 mM
CDNB (solvant éthanol)	2 mM	4 mM
GSH	16 mM	8 mM

La réaction est déclenchée par addition du CDNB et se déroule à 30°C. L'apparition du conjugué est mesurée à 340 nm par un spectrophotomètre (Uvikon 941, KONTRON) à double faisceau. La cuve de référence contient tous les réactifs sans l'extrait enzymatique.

Le coefficient d'extinction molaire du CDNB est  $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### III-2.2. Activité $\text{GST}_{\text{NQO}}$

Le 4-nitroquinoline-1-oxyde (NQO) est utilisé, chez l'homme, comme substrat afin de mesurer préférentiellement l'activité de l'isoenzyme GST de classe Pi (Stanley et Benson, 1988, Aceto *et al.*, 1990). En absence d'information sur l'existence d'isoenzyme de GST, il nous a donc semblé intéressant d'étudier l'activité GST parallèlement avec le CDNB et le NQO.



### Conditions expérimentales

Réactifs	Concentrations finales
Protéines cytosoliques	80 à 115 $\mu\text{g/mL}$
Tampon $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 6,5)	100 mM
NQO (solvant éthanol)	0,4 mM
GSH	8 mM

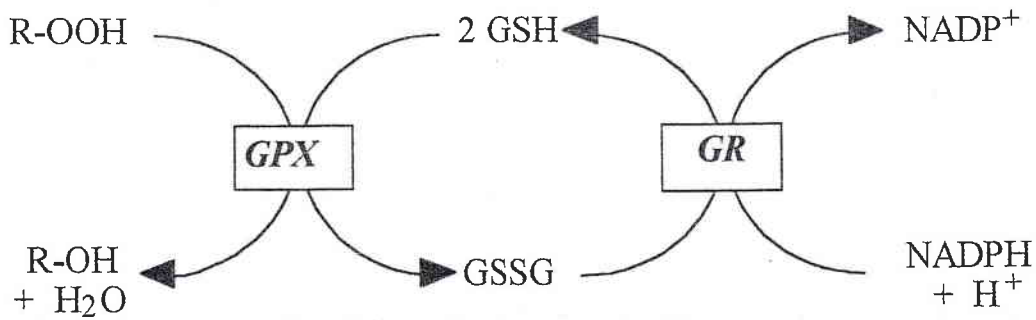
La réaction est déclenchée par addition du NQO et se déroule à 30°C. L'apparition du conjugué est mesurée à 350 nm.

Le coefficient d'extinction molaire du NQO est  $\epsilon = 7,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### III-3. Les glutathion peroxydases

Les GPX catalysent la réduction de peroxydes organiques avec oxydation concomitante du glutathion réduit (GSH) (Paglia et Valentine, 1967). Le GSH est ensuite régénéré par action d'une glutathion réductase (GR) exogène qui utilise le NADPH comme co-substrat. La vitesse de disparition du NADPH est proportionnelle à la vitesse d'oxydation du glutathion et sa mesure permet d'évaluer indirectement l'activité GPX.





Parmi les substrats reconnus par les GPX, l'hydroperoxyde de cumène (CuOOH) et le *tert*-butyl-hydroperoxyde (*t*BuOOH) ont été choisis. L'utilisation de ces 2 substrats permet de mettre en évidence deux types d'activités peroxydases. Ainsi, chez les mammifères, CuOOH et *t*BuOOH sont tous deux métabolisés par la GPX (séléno-dépendante), alors que seul le premier substrat peut être reconnu par certaines GST présentant une activité peroxydasique non séléno-dépendante.

### Conditions expérimentales

Réactifs	Concentrations finales
Protéines cytosoliques	80 µg/mL
Tampon K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,0)	100 mM
EDTA	0,5 mM
NADPH	0,4 mM
GR	1 U/mL
GSH	6 mM
Préincubation 5 min à 30 °C	
CuOOH ou <i>t</i> BuOOH (solvant éthanol)	2 ou 3,5 mM

La réaction est déclenchée par addition d'un peroxyde après 5 min d'incubation et se déroule à 30°C. La disparition du NADPH est mesurée à 340 nm.

Le coefficient d'extinction molaire du NADPH est  $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### III-4. La glutathion réductase

La mesure de l'activité GR consiste à suivre de façon indirecte la vitesse de réduction du GSSG en GSH en présence de NADPH (Carlberg et Mannervik, 1975). Cette mesure s'effectue en suivant la disparition du NADPH dans le milieu réactionnel.

### Conditions expérimentales

Réactifs	Concentrations finales	
	<i>P. schreberi</i>	<i>H. aspersa</i>
Protéines cytosoliques	80 µg/mL	80 à 250 µg/mL
Tampon K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 6,5)	100 mM	100 mM
NADPH	0,2 mM	0,2 mM
GSSG	7 mM	1 mM

La réaction est déclenchée par addition du GSSG et se déroule à 30°C. La disparition du NADPH est mesurée à 340 nm dans les mêmes conditions que pour la mesure des activités GPX. Le coefficient d'extinction molaire du NADPH est  $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### III-5. L'ascorbate peroxydase

L'activité APX est mesurée en suivant à 290 nm la diminution d'absorbance due à l'oxydation de l'ascorbate en déhydroascorbate par l'APX (Nakano et Asada, 1981).

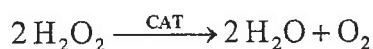
### Conditions expérimentales

Réactifs	Concentrations finales
Protéines cytosoliques	80 µg/mL
Tampon K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,0)	100 mM
EDTA	4 mM
Ascorbate	0,5 mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,5 mM

La réaction est déclenchée par addition du peroxyde d'hydrogène et se déroule à 30°C. Le coefficient d'extinction molaire l'ascorbate est  $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### III-6. La catalase

La disparition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est suivie afin de déterminer l'activité CAT dans le milieu réactionnel (Beers et Sizer, 1952).



### Conditions expérimentales

Réactifs	Concentrations finales
Protéines cytosoliques	80 µg/mL
Tampon K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,0)	100 mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30 mM



La réaction est déclenchée par addition de peroxyde d'hydrogène et se déroule à 30°C. La disparition de ce dernier est mesurée à 230 nm.

Le coefficient d'extinction molaire du peroxyde d'hydrogène est  $\epsilon = 62 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### **III-7. Le dosage des protéines**

Les concentrations de protéines sont mesurées selon le protocole de Lowry *et al.* (1951) dans chaque solution protéique testée afin de calculer les activités spécifiques.

Le dosage consiste à colorer les protéines en suspension grâce au réactif de biuret et au réactif de Folin-Ciocalteu. L'absorbance de la suspension, lue à 660 nm, est proportionnelle à la concentration de protéines jusqu'à 25  $\mu\text{g/mL}$ . La concentration de protéines dans les échantillons est estimée par comparaison à un étalonnage établi à partir de sérumalbumine bovine. Un contrôle de qualité réalisé à partir d'une solution protéique de concentration définie a été inclus dans chaque série de dosages.

## **IV- Protocoles d'exposition**

### **IV-1. Expérimentation en conditions contrôlées : intoxication par le naphthalène (NAP)**

Le dispositif d'exposition est composé de deux parties : une partie inférieure où le NAP est disposé sous forme solide et sature l'enceinte par sublimation et une partie supérieure où sont disposés les organismes (quarante escargots provenant de la même ponte et âgés de deux mois ou un tapis de mousses). Ces derniers n'étant jamais en contact direct avec le polluant, seule la contamination par voie aérienne est possible. Après trois jours d'exposition en conditions contrôlées (photopériode et température), les organismes sont récupérés. Ils suivent ensuite la procédure de préparation des échantillons biologiques, décrite ci-dessus, afin d'étudier la variation des différentes activités enzymatiques. En parallèle, un échantillon témoin est réalisé avec le même dispositif mais en absence de NAP.

Dans le cas des escargots, l'expérimentation se réalise en absence de nourriture afin d'éviter une voie de contamination supplémentaire par une éventuelle adsorption du NAP par la nourriture.

Ces expérimentations sont réalisées à deux reprises.

### **IV-2. Expérimentation semi-contrôlée, en milieu industriel**

En accord avec l'INRS (Institut National de Recherche et de Sécurité, Vandœuvre-Lès-Nancy, France), une expérimentation a pu être réalisée dans une industrie utilisant la fonte du brai de houille dans son procédé de fabrication. La combustion du brai de houille, émet

principalement des HAP dans l'atmosphère de cette usine qui devient ainsi un lieu d'expérimentation intéressant. Ces conditions permettent l'étude de l'impact d'un mélange de HAP sans interférence avec les conditions climatiques.

Dans cette usine, trois sites ont été sélectionnés en fonction de leur éloignement du four de fonte du brai de houille, source de la pollution. Sur chacun de ces sites, la concentration de BaP (dosé par chromatographie liquide haute performance) a été suivie durant la phase d'exposition par l'INRS. Ces sites ont été classés de la façon suivante :

- Site 1 : localisé à 10 m de la source de HAP  
lieu d'emballage de la marchandise  
[BaP] = 380 ng/m<sup>3</sup>
- Site 2 : distant de 5 m de la source de HAP  
peinture des objets fabriqués (source de contamination supplémentaire)  
[BaP] = 510 ng/m<sup>3</sup>
- Site 3 : situé à proximité de la source de pollution (four de fonte)  
[BaP] = 840 ng/m<sup>3</sup>

Un site 0 correspond à notre salle d'élevage, considérée comme exempte de HAP.

Dix escargots provenant de la même ponte et âgés de deux mois (pesant environ 8 g) sont placés dans des bacs à souris, en polystyrène cristal (IFFA CREDO), sans nourriture et couverts d'une grille de plastique alimentaire (de 5 mm de maille). Une cage de ce type est placée sur chacun des sites pour la durée journalière de l'occupation d'un poste de travail (huit heures). Cette expérimentation est réalisée pendant deux jours consécutifs. En parallèle, 20 g de mousses fraîches, préalablement acclimatées, sont disposés sur un bas nylon au-dessus d'un récipient contenant de l'eau afin d'éviter la déshydratation. Les mousses sont recouvertes d'un filet à cheveux pour éviter tout déplacement. Trois récipients de ce type sont disposés à côté des cages contenant les escargots.

Immédiatement après les huit heures d'exposition, les escargots sont plongés directement dans l'azote liquide et acheminés dans une bonbonne contenant de l'azote liquide au laboratoire où ils sont conservés à -80 °C jusqu'à analyse. Les mousses sont, pour leur part, transportées au laboratoire dans des sacs hermétiquement fermés sur le lieu de leur exposition. Arrivées au laboratoire, elles subissent immédiatement toutes les étapes décrites ci-dessus, afin de doser le jour même les différentes activités enzymatiques.

### IV-3. Expérimentation non contrôlée, en milieu urbain

#### IV-3.1. Descriptif des sites

Les sites ont été sélectionnés en concertation avec M. Pilloy (GEMCEA), M<sup>me</sup> Livertoux (Faculté de Pharmacie, Nancy), M. Garrec (INRA, Champenoux) et M<sup>me</sup> Bastin (Directrice AirLor). Ces derniers se situent dans l'agglomération nancéienne, en raison de la possibilité d'accéder aux mesures de polluants réalisées par l'association de surveillance de la qualité de l'air (AirLor) et à la pluviométrie (Communauté Urbaine du Grand Nancy).

Trois sites ont été retenus :

① Le parc d'AirLor :

- situé sur la colline de Brabois
- à proximité d'un parking

② L'agence EDF :

- située au centre de Nancy à proximité de la gare
- entourée de deux grandes voies de circulation majeure
- présence d'un carrefour comportant un feu tricolore

③ Le parc du Laboratoire des Ponts et Chaussées :

- situé à Tomblaine
- éloigné des voies de circulation

#### IV-3.2. Procédure expérimentale pour les escargots

Des groupes de vingt-cinq escargots âgés de deux mois et pesant environ 8 g sont transférés dans des cages installées sur les différents sites, suivant les recommandations de Gomot-De-Vaufleury et Pihan (2000). Ces cages sans fond (50 cm de côté et 20 cm de haut) s'enfoncent dans la terre afin de les protéger au mieux des différents prédateurs et éviter que les escargots ne s'échappent. Elles sont fabriquées en plastique alimentaire rigide (PVC) et recouvertes d'une grille de plastique de 5 mm de mailles, qui permet le passage de la lumière, de l'air et de la pluie. Durant les expérimentations, les escargots se nourrissent des éléments trouvés sur place (végétation et sol). Ils sont donc en contact avec la pollution du sol, de la végétation et de l'air (Fig. II-3).

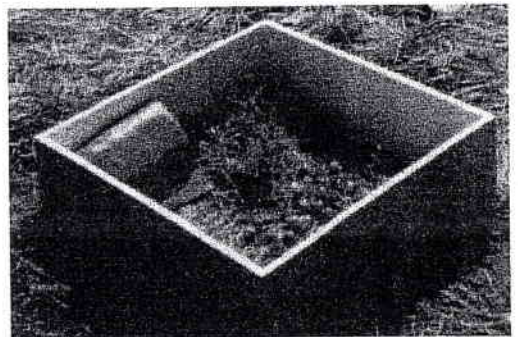


Figure II-3 : Cage à escargots

Les escargots ont été exposés sur les trois sites pendant une, deux ou trois semaines durant l'été et l'automne 1998.

#### IV-3.3. Procédure expérimentale pour les mousses

Après prélèvement et acclimatation au laboratoire, les mousses sont transplantées sur les sites d'EDF et du Laboratoire des Ponts et Chaussées grâce au système des "Moss-plates". Seuls ces deux sites ont fait l'objet de cette étude, car compte-tenu des contraintes expérimentales (nécessité de prélever et analyser le même jour) il n'était pas possible de travailler en parallèle sur les trois sites retenus. Le système des "Moss-plates" a été conçu par G AMBLARD (Laboratoire Pierre Süe, CEA de Saclay). Ce système est composé de deux parties (Fig. II-4), la partie inférieure servant de réservoir d'eau est munie d'un trop plein, la partie supérieure servant à l'exposition des mousses est percée pour permettre l'aération.

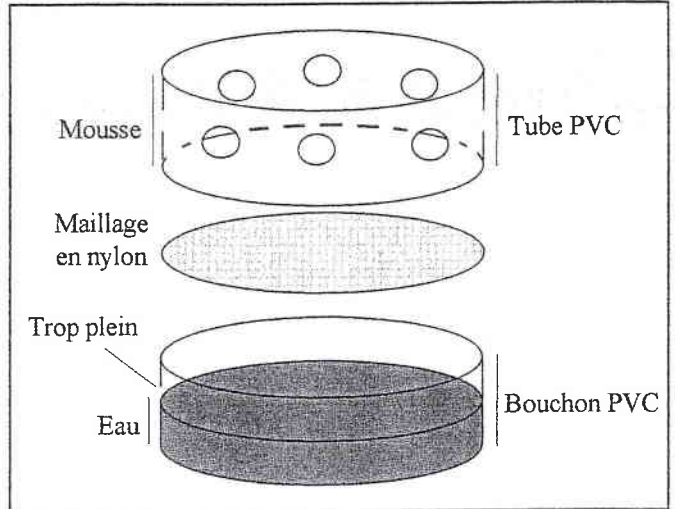


Figure II-4 : Système des "Moss-plates"

Ces deux éléments sont emboîtés et séparés par un bas en nylon afin d'éviter un contact direct entre l'eau et la mousse, tout en permettant une bonne diffusion de l'eau. La partie supérieure est recouverte d'un filet à mailles pour éviter la perte du matériel vivant.

Trois "Moss-plates" sont rassemblés pour former un triplet qui sera exposé sur les sites d'étude (Fig. II-5).

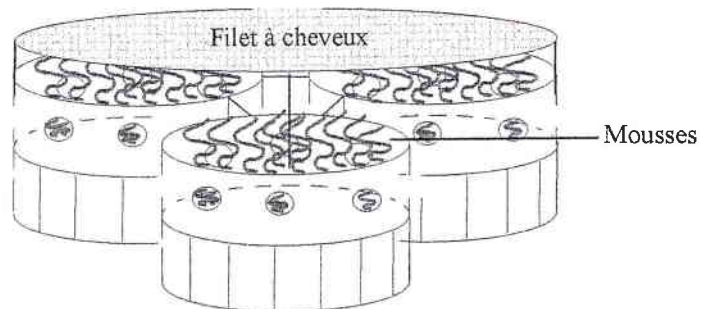
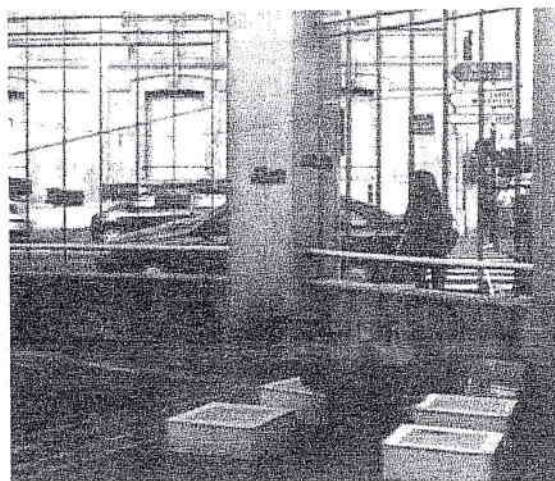


Figure II-5 : Triplet

Ce procédé permet de conserver les mousses tout en préservant leur état physiologique. En effet, les concepteurs du système ont vérifié que la photosynthèse continuait à se produire même durant des périodes de fortes sécheresses. Dans ce cas précis, il faut toutefois prendre certaines précautions, qui consistent à arroser régulièrement les mousses et à vérifier le niveau d'eau dans la partie inférieure du "Moss-plate". Ainsi, durant la période d'exposition, le niveau d'eau des "Moss-plates" est vérifié tous les deux jours. Avec la même périodicité, les mousses sont hydratées par trente brumisations d'eau Evian.

Ce procédé permet d'implanter les mousses sur les mêmes sites que les escargots (Fig II-6) et d'avoir ainsi une approche parallèle pour les deux types d'organismes.



**Figure II-6 : Site EDF équipé de "Moss-plates" suspendus et de quatre cages à escargots**

## **V- Analyses statistiques**

Toutes les analyses statistiques nécessaires à l'interprétation de ce travail ont été réalisées à l'aide du logiciel STATGRAPHICS Plus 2.1.

### ***Test de Mann-Whitney***

Ce test est un test non-paramétrique. Il est utilisé pour comparer deux échantillons provenant de deux populations. Son but est de vérifier s'il existe des différences entre les deux populations sur la base d'échantillons extraits aléatoirement de ces populations.

### ***Analyse de variance (ANOVA)***

Cette technique permet de comparer les moyennes de trois échantillons aléatoires ou plus, afin de déterminer s'il existe une différence entre les moyennes des populations dont sont issus les échantillons. Cette technique ne peut s'appliquer que si, d'une part les échantillons aléatoires sont indépendants et d'autre part, les distributions des populations sont approximativement normales et toutes de même variance  $\sigma^2$ . Ainsi, toutes nos données ont fait l'objet de transformation logarithmique.

### ***Analyse en composantes principales (ACP)***

L'ACP a pour but de représenter géométriquement des individus et des caractères dans un plan (nommé plan principal) afin de permettre une visualisation des points. Cette réduction n'est intéressante que si les  $p$  caractères initiaux sont indépendants et ont des coefficients de

corrélations non nuls. Cette procédure permet de dégager une structure dans les données et éventuellement d'orienter les investigations ultérieures.

### ***Régression linéaire***

L'objectif est d'identifier un modèle mathématique linéaire ( $y = ax + b$ ) qui lie deux variables dont la finalité est de décrire en moyenne l'une des variables (variable expliquée) à partir des valeurs prises par l'autre (variable explicative). Dans notre travail, la variable expliquée est une activité enzymatique et les variables explicatives sont les niveaux de polluants dans l'atmosphère.

*~ CHAPITRE III ~*

*Résultats & Discussions*



*~ PARTIE I ~*

*Exploration Préliminaire du  
Métabolisme des Xénobiotiques*

~ PARTIE I ~

*Exploration préliminaire du métabolisme des xénobiotiques*

I- Le gastéropode <i>Helix aspersa</i> .....	82
I-1. Variations interindividuelles .....	82
I-2. Influence de l'âge.....	83
I-3. Distribution et niveaux de base des enzymes considérées .....	85
II- La mousse <i>Pleurozium schreberi</i> .....	87
III- Récapitulatif.....	89

## I- Le gastéropode *Helix aspersa*

Avant d'effectuer toutes expérimentations sur l'inductibilité des systèmes enzymatiques que nous désirons tester en tant que biomarqueurs, il était nécessaire, dans un premier temps, de déterminer les niveaux de base de ces systèmes ainsi que leur variabilité. Les capacités de biotransformation des xénobiotiques n'étant pas connues chez *H. aspersa*, nous les avons étudiées sur trois organes qui nous semblaient présenter un intérêt dans ce travail : la glande digestive (GD), que l'on peut assimiler au foie des mammifères et que l'on peut, à ce titre, soupçonner d'être fortement impliquée dans ce type de métabolisme, le rein (R), qui est censé intervenir de façon importante dans les processus de détoxication, et enfin, le toit de la cavité palléale (TCP) qui, en relation directe avec l'air inspiré, peut être un organe intéressant à examiner pour un travail axé sur la pollution de l'air. L'étude parallèle de ces trois organes nous paraît indispensable afin d'explorer au mieux les capacités métaboliques de cet animal.

### I-1. Variations interindividuelles

L'exploration préliminaire du métabolisme du glutathion chez l'escargot a débuté par l'examen des variations interindividuelles que pouvaient présenter ces organismes, en l'absence de toute stimulation extérieure. Cette investigation a été réalisée sur des escargots de différents âges (1,5 ; 2 ; 2,5 et 3 mois), afin d'évaluer en parallèle l'influence de l'âge, abordée ultérieurement.

L'activité glutathion *S*-transférase a été mesurée avec le 1-chloro 2,4-dinitrobenzène (CDNB), substrat qui reflète l'activité globale des GST ( $GST_{CDNB}$ ). Le 4-nitroquinoline 1-oxyde (NQO) est utilisé chez les mammifères comme substrat préférentiel des GST de la classe Pi ( $GST_{NQO}$ ). En l'absence d'information sur la présence d'isoenzyme chez *H. aspersa*, il nous a semblé intéressant de mesurer l'activité GST à l'aide de ces deux substrats. Nous avons utilisé l'hydroperoxyde de cumène pour mesurer l'activité glutathion peroxydase totale ( $GPX_{CuOOH}$ ). A également été étudiée l'activité glutathion réductase.

Les premiers travaux effectués sur les escargots ont été réalisés avec des organismes provenant d'un élevage gastronomique. Les coefficients de variations (CV), alors observés, pouvaient atteindre 80 % et étaient rarement inférieurs à 50 %. Ainsi, afin de limiter au mieux ces variations interindividuelles, un élevage a été mis en place au laboratoire dans l'objectif de maîtriser un maximum de paramètres (nourriture, luminosité, âge) (Gomot De-Vaufleury, 2000).

De plus, dans la mesure du possible, afin de limiter les variations d'origine génétique, une même expérimentation est effectuée avec des organismes provenant d'une seule ponte. Le **tableau III-1** rassemble les valeurs des coefficients de variation pour les enzymes associées au glutathion. Ces CV se situent entre 10 et 55 %, tous âges et organes confondus, la valeur de 55 %, restant heureusement exceptionnelle. Les CV les plus fréquemment observés se situent entre 25 et 30 %. Ces ordres de grandeurs sont fréquemment trouvés pour des travaux réalisés sur des organismes différents et sont représentatifs des variations interindividuelles. En effet, des CV de 30 % sont rapportés pour les activités GST mesurées dans le foie de chevaine (Lenartova *et al.*, 1997).

**Tableau III-1 : Effet de l'âge sur la variabilité des activités enzymatiques associées au glutathion chez *H. aspersa***

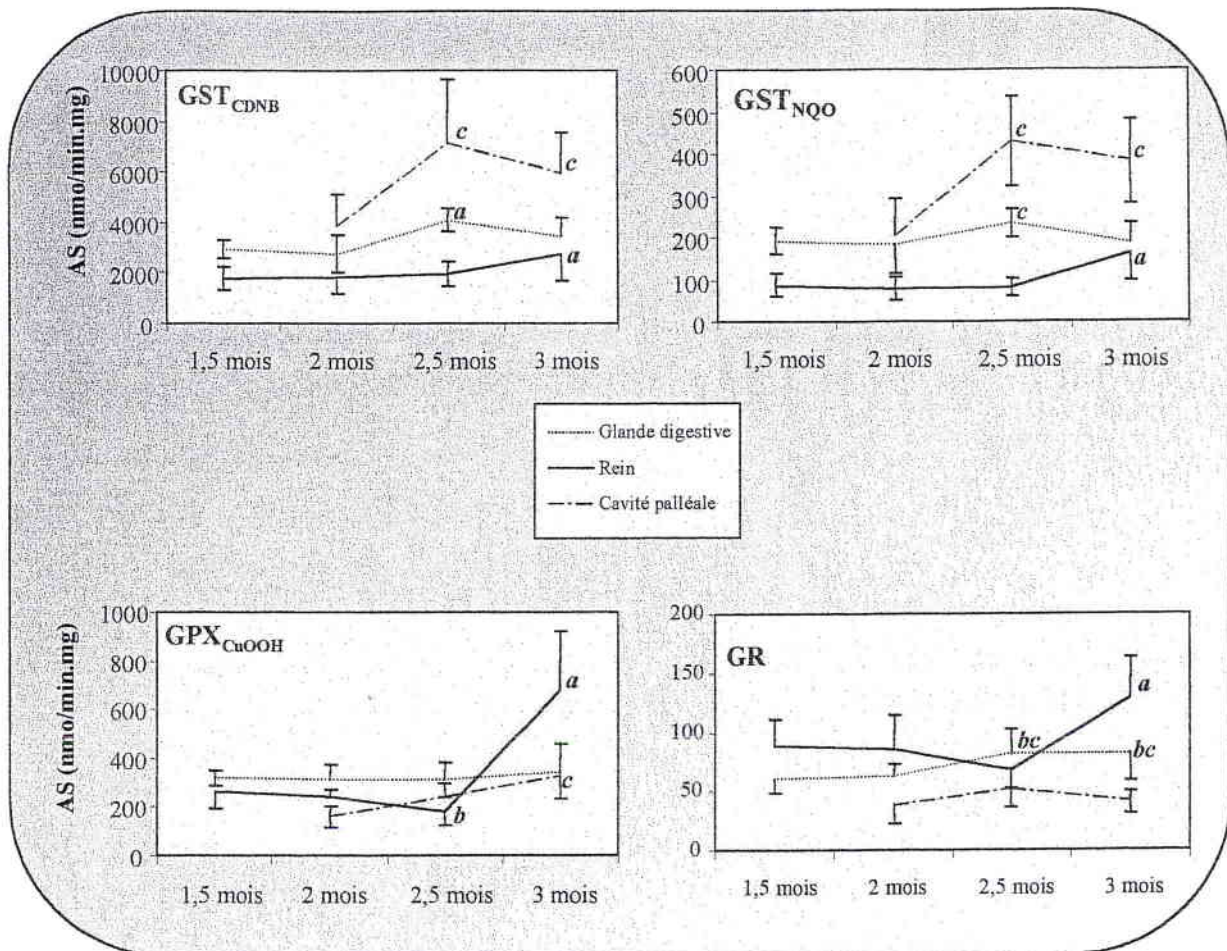
	Coefficients de variation calculés à partir de 8 échantillons indépendants (en %)											
	GST <sub>CDNB</sub>			GST <sub>NOO</sub>			GR			GPX <sub>CuOOH</sub>		
	GD	R	TCP	GD	R	TCP	GD	R	TCP	GD	R	TCP
1,5 mois	12	27	-	16	32	-	20	26	-	10	28	-
2 mois	27	34	32	34	36	43	18	35	42	20	10	26
2,5 mois	11	24	35	15	26	25	25	32	55	33	30	55
3 mois	23	39	26	25	39	26	26	27	29	33	35	29

GD = glande digestive, R = rein, TCP = toit de la cavité palléale

## I-2. Influence de l'âge

L'influence de paramètres biotiques, et plus particulièrement de la maturité sexuelle, sur les activités enzymatiques a largement été rapportée chez les mollusques aquatiques tels que *M. galloprovincialis* (Solé *et al.*, 1995, Orbea *et al.*, 1999). Afin d'éliminer la variabilité due au sexe, certains auteurs emploient des organismes hermaphrodites (Garrigues *et al.*, 1990, Saint-Denis *et al.*, 1999). Toutefois, les activités enzymatiques sont influencées par les cycles hormonaux. Ainsi, il nous a semblé nécessaire d'évaluer, chez *H. aspersa*, l'influence de l'âge donc de la maturité sexuelle (qui est atteinte aux environs de 3 mois dans nos conditions d'élevage) sur les niveaux de base des enzymes associées au glutathion.

Le **figure III-1** représente les variations des activités enzymatiques associées au glutathion dans les trois organes considérés pour des escargots âgés de 1,5 - 2 - 2,5 et 3 mois. Seul le toit de la cavité palléale n'a pu être étudié pour les escargots âgés de 1,5 mois, la quantité de tissu étant insuffisante pour réaliser la mesure des activités enzymatiques.



**Figure III-1 : Variations des activités enzymatiques associées au glutathion en fonction de l'âge chez *Helix aspersa***

Les données correspondent aux moyennes  $\pm$  l'écart-type de 8 échantillons indépendants. *a* indique une différence statistiquement significative avec les autres âges, *b* avec 1,5 mois et *c* avec 2 mois pour au minimum  $P < 0,05$  d'après le test ANOVA réalisé après transformation logarithmique des données

Les escargots âgés de 3 mois présentent dans 67 % des cas, des activités enzymatiques supérieures à celles déterminées pour les âges de 1,5 et/ou de 2 mois. Cette différence est statistiquement significative pour le rein où les activités GPX<sub>CuOOH</sub>, GR, GST<sub>CDNB</sub> et GST<sub>NQO</sub> sont augmentées d'un facteur de 2,8 à 1,5 comparativement aux organismes âgés de 2 mois. Des facteurs d'augmentation similaires, 2 à 1,5, sont observables pour les activités GPX<sub>CuOOH</sub>, GST<sub>NQO</sub> et GST<sub>CDNB</sub> du toit de la cavité palléale des escargots âgés de 3 mois comparés à ceux de 2 mois.

Dans 50 % des cas, les activités enzymatiques des escargots âgés de 2,5 mois diffèrent de celles des organismes plus jeunes. Les variations les plus importantes, d'un facteur 1,8 et 2,1, sont observées pour les activités GST<sub>CDNB</sub> et GST<sub>NQO</sub> pour le toit de la cavité palléale.

Les enzymes les plus sensibles à l'âge dépendent de l'organe examiné. Les activités GST varient davantage pour le toit de la cavité palléale alors que c'est la GPX<sub>CuOOH</sub> suivi de la GR qui sont les plus modifiées dans le cas du rein.

Cependant, ce sont les activités enzymatiques de la glande digestive qui restent les plus stables au cours de la croissance d'*H. aspersa*. Que ce soit pour le rein ou la glande digestive, les activités enzymatiques ne diffèrent pas entre les organismes âgés de 1,5 et 2 mois.

Ces résultats montrent donc des variations importantes chez les organismes âgés de 2,5 et 3 mois. Ces différences sont probablement imputables à la maturation sexuelle des escargots qui se produit généralement à cet âge dans nos conditions d'élevage. Cette métamorphose génère des changements morphologiques mais également physiologiques et biochimiques, auxquelles n'échappent pas les niveaux de bases des activités enzymatiques examinées. En effet, chez le bivalve *Mytilus galloprovincialis*, l'augmentation de l'activité métabolique durant la gamétogénèse et la période de frai est probablement responsable de l'augmentation de différentes activités enzymatiques telles que la GST et la GPX (Regoli, 1998).

Ce travail préliminaire a donc permis de définir l'âge des escargots qui semble le mieux adapté pour toutes les expérimentations envisagées. L'âge retenu est donc celui de 2 mois, car il offre la possibilité de prélever et d'étudier les trois organes (GD, R et TCP) tout en limitant les variations interindividuelles occasionnées par la phase de maturation sexuelle.

### **I-3. Distribution et niveaux de base des enzymes considérées**

Après avoir maîtrisé des causes importantes de variabilité indésirable des paramètres biochimiques, à savoir les conditions d'élevage et l'âge des animaux, nous avons établi pour chacun des trois organes les niveaux d'activités de base des enzymes associées au glutathion. Cette étude a été complétée par une exploration sommaire d'activités de phase I, à savoir les activités éthoxycoumarine-*O*-dééthylase (ECOD), éthoxyrésorufine-*O*-dééthylase (EROD) et pentoxyrésorufine-*O*-déalkylase (PROD).

Cette étude résumée par le **tableau III-2** démontre la présence de ces trois activités CYP chez *H. aspersa*. Leur niveau diffère entre les trois organes examinés. Ainsi, l'activité PROD est uniquement présente dans le rein, et à un niveau extrêmement faible (8 pmol/min.mg) alors que l'activité ECOD est observée dans le rein et la glande digestive, aux niveaux respectifs de 1 600 et de 140 pmol/min.mg. Seule l'activité EROD, bien qu'elle soit particulièrement basse, est identifiée dans les trois organes. Ces résultats diffèrent de ceux rapportés pour la glande digestive de l'escargot dulçaquicole *Lymnaea stagnalis* pour laquelle l'activité PROD est présente alors que l'activité EROD est absente (Wilbrink *et al.*, 1991a). Si ces données suggèrent fortement la présence de différentes sous-familles de CYP dans les organes d'*H. aspersa*, il serait néanmoins abusif d'attribuer ces diverses activités CYP à une sous-famille bien spécifique. Effectivement, la caractérisation et la classification des CYP chez les mollusques restent à faire.



Il est également intéressant de noter que l'activité CYP est plus importante dans le rein que dans la glande digestive qui est habituellement reconnue comme l'organe de détoxification par excellence. Cette distribution bien spécifique des activités CYP chez ce gastéropode terrestre prédispose certainement chacun de ces organes à des susceptibilités différentes aux polluants.

**Tableau III-2 : Niveaux constitutifs des activités enzymatiques de phase I et des activités associées au glutathion d'*Helix aspersa* (âgé de 2 mois)**

	Activités de phase I (pmol/min.mg)			Activités associées au glutathion (nmol/min.mg)			
	EROD	ECOD	PROD	GST <sub>CDNB</sub>	GST <sub>NQO</sub>	GR	GPX <sub>CuOOH</sub>
<b>GD</b>	12 ± 2	140 ± 20	nd	1500 ± 200	80 ± 20	40 ± 6	320 ± 50
<b>R</b>	36 ± 3	1600 ± 180	8 ± 1	1740 ± 350	100 ± 30	70 ± 20	25 ± 10
<b>TCP</b>	6 ± 2	nd	nd	2420 ± 1120	120 ± 40	30 ± 8	120 ± 70

Moyenne ± écart-type pour 9 échantillons indépendants, nd = non détectable

L'activité GST<sub>NQO</sub>, est environ 20 fois plus faible que l'activité GST<sub>CDNB</sub>, quel que soit l'organe considéré (**Tab. III-2**). A l'examen de ce rapport, mais également des valeurs superposables pour ces deux activités enzymatiques quel que soit l'organe considéré (**Fig. III-1**), deux hypothèses peuvent être émises. La première considère que le NQO est reconnu principalement par une isoenzyme spécifique, au même titre que chez l'homme. Cette isoenzyme serait alors exprimée de façon stable, toujours dans la même proportion quel que soit l'organe considéré. La deuxième hypothèse repose sur les différences d'affinité des GST observées pour les deux substrats utilisés ( $K_{MNQO} = 1,31 \pm 0,44$  mM et  $K_{MCDNB} = 0,41 \pm 0,06$  mM). La valeur élevée du  $K_{MNQO}$ , qui reflète une faible affinité des GST pour ce substrat, nous a d'ailleurs empêchés d'effectuer les mesures dans des conditions de vitesse maximale, en raison de la faible solubilité de ce composé.

Bien que la différence ne soit pas statistiquement significative, les activités GST semblent prédominer dans le toit de la cavité palléale. Cette prédominance, ainsi que ce facteur d'environ 20 entre l'activité GST<sub>NQO</sub> et GST<sub>CDNB</sub> sont également observables sur la **figure III-1**, malgré des niveaux d'activités enzymatiques différents entre ces deux études. Cette différence de niveaux de base est difficilement explicable sachant que les escargots proviennent d'un élevage où un maximum de paramètres est maîtrisé. Une explication envisageable est l'utilisation d'escargots provenant de deux pontes différentes, donc l'augmentation des variations génétiques.



Cette distribution des activités GST diffère de celle de l'escargot terrestre d'Afrique, *Achatina fulica*, pour lequel le rein affiche l'activité GST la plus importante (Balabaskaran *et al.*, 1986).

L'expression des autres enzymes associées au glutathion présente davantage de variations que celle de la GST. L'activité GR est deux fois plus importante dans le rein que dans la glande digestive et le toit de la cavité palléale. De plus, l'activité GPX est largement prédominante dans la glande digestive. Dans cet organe, cette activité est respectivement 3 et 15 fois plus importante que dans le toit de la cavité palléale et dans le rein. Toutefois, ces résultats sont à prendre avec précautions après examen des niveaux de base de l'activité GPX observé lors de l'étude de l'influence de l'âge (Fig. III-1), où la différence des activités GPX<sub>CuOOH</sub> entre organe est au plus de deux. Il semblerait que les variations des activités GPX soient particulièrement affectées par des variations génétiques accrues lors de l'utilisation de pontes différentes.

## II- La mousse *Pleurozium schreberi*

A notre connaissance, les capacités métaboliques de *P. schreberi* n'ont jamais été explorées. Ne pouvant réaliser une étude exhaustive, nous avons décidé de focaliser notre étude sur un nombre limité d'enzymes.

Comme pour *H. aspersa*, notre attention s'est portée sur les enzymes associées au glutathion (GST<sub>CDNB</sub>, GR, GPX<sub>CuOOH</sub>) qui semblent jouer un rôle similaire chez les animaux et les plantes. Par contre, si nous n'avons pas étudié l'activité CYP, il nous a semblé plus intéressant d'explorer l'activité ascorbate peroxydase (APX) qui, chez les plantes, est l'enzyme antioxydante par excellence. En parallèle, l'étude de la catalase (CAT) semblait intéressante à réaliser sachant que l'APX et la CAT ont les mêmes fonctions mais présentent une localisation sub-cellulaire différente. Supposant que le suivi concomitant de ces deux activités était susceptible donner des informations quant à la cible des polluants, nous les avons évaluées sur six échantillons de mousses prélevés dans une forêt et acclimatés pendant huit jours dans des conditions contrôlées décrites dans le chapitre matériels et méthodes.

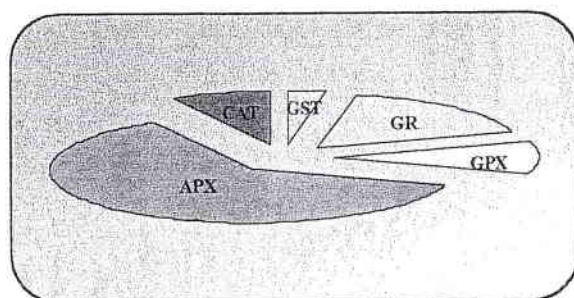
**Tableau III-3 : Niveaux de base des activités enzymatiques chez *P. schreberi***

	GST <sub>CDNB</sub>	GR	GPX <sub>CuOOH</sub>	APX	CAT
AS ± σ	31 ± 9	169 ± 26	100 ± 27	611 ± 177	81 ± 14
CV.(%)	29	15	27	29	17

AS = activité spécifique en nmol/min.mg, σ = écart-type calculé à partir de 6 échantillons indépendants

L'activité spécifique (AS) de l'APX représente environ 62 % de la totalité des activités explorées (Fig. III-2), avec une AS de 611 nmol/min.mg, comparable à l'activité trouvée chez la mousse aquatique *Fontinalis antipyretica* (800 nmol/min.mg, Roy *et al.*, 1994). Elle est environ 7 fois plus importante que l'AS de la CAT et de la GPX<sub>CuOOH</sub> (Tab. III-3). L'activité GR de *P. schreberi* est environ 3 fois plus faible chez *F. antipyretica* et *Tortula ruralis* (Roy *et al.*, 1994, Dhindsa *et al.*, 1990). En ce qui concerne l'activité GST<sub>CDNB</sub>, celle-ci est deux fois plus importante chez *F. antipyretica* et, deux fois plus faible chez *T. ruralis*.

Ces résultats montrent l'existence chez *P. schreberi* d'activités enzymatiques associées au glutathion et antioxydantes. Dans le système antioxydant cytosolique, l'activité APX semble tenir une place prépondérante chez *P. schreberi*. Le système ascorbate-glutathion sera probablement le plus actif dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène. Cette observation est en accord avec la littérature qui a largement démontré l'importance de l'activité APX dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène, chez les végétaux supérieurs.



**Figure III-2 : Proportion relative des activités enzymatiques**

### III- Récapitulatif

#### ↳ *Helix aspersa*

① Maîtrise partielle de la variabilité interindividuelle par la mise en place d'un élevage contrôlé

② Age retenu pour les expérimentations = 2 mois, avant la période de maturité sexuelle dans nos conditions d'élevage

③ Mise en évidence des activités de phase I et des activités associées au glutathion dans les trois organes explorés : glande digestive (GD), rein (R) et toit de la cavité palléale (TCP)

④ Distribution des activités enzymatiques :

PROD : R uniquement

ECOD : R >>> GD

EROD : R >> GD > TCP

GST<sub>CDNB</sub> : TCP > GD ~ R

GST<sub>NQO</sub> : TCP ~ GD ~ R

GR : R > DG ~ TCP

⑤ Niveaux de base

ECOD >>> EROD > PROD, quel que soit l'organe considéré

GST<sub>CDNB</sub> ~ 20 x GST<sub>NQO</sub>, quel que soit l'organe considéré

#### ↳ *Pleurozium schreberi*

① Présence des activités GST<sub>CDNB</sub>, GR, GPX<sub>CuOOH<sub>2</sub></sub>, CAT, APX

② APX = 77 % de l'activité spécifique totale des enzymes antioxydantes (APX + CAT + GPX)

*~ PARTIE II ~*

*Expérimentation en Conditions Contrôlées -*

*Exposition au Naphtalène*

~ PARTIE II ~

*Expérimentation en conditions contrôlées - Exposition au naphthalène*

I- Voie métabolique du naphthalène chez les mammifères.....	90
II- Exposition au NAP : variations des activités enzymatiques chez <i>Helix aspersa</i> .....	91
II-1. Le toit de la cavité palléale .....	92
II-2. La glande digestive .....	93
II-3. Le rein .....	94
II-4. Conclusions.....	95
III- Exposition au NAP : variations des activités enzymatiques chez <i>Pleurozium schreberi</i> .....	96
IV- Récapitulatif .....	98

Après avoir déterminé, chez *H. aspersa* et *P. schreberi*, les niveaux de base des différents paramètres biochimiques explorés, la réponse de ces derniers à une pollution simple et contrôlée est étudiée. Pour cela les organismes sont exposés durant trois jours à une atmosphère saturée en naphthalène (NAP). Cet HAP est composé de deux cycles aromatiques. Sa capacité de sublimation à température ambiante en fait un HAP extrêmement volatil, donc très facile d'utilisation pour ce type d'étude. Cette molécule est d'autant plus intéressante qu'elle est largement distribuée dans l'environnement urbain et représente l'un des éléments majeurs des gaz d'échappement (Lee *et al.*, 1995 et Marr *et al.*, 1999). C'est pourquoi, l'EPA a désigné le NAP comme l'un des polluants prioritaires (EPA, 1987). De plus, cette molécule exerce des effets néfastes sur la santé, tels que anémie hémolytique et cataracte. Elle est également suspectée cancérigène chez les animaux (Mulholland, 1998).

### I- Voie métabolique du naphthalène chez les mammifères

Le naphthalène (NAP) possède donc des caractéristiques chimiques et toxicologiques qui en font une molécule extrêmement intéressante à explorer. De plus, les voies métaboliques de ce composé sont bien identifiées chez les mammifères, ce qui facilitera la compréhension de ses effets.

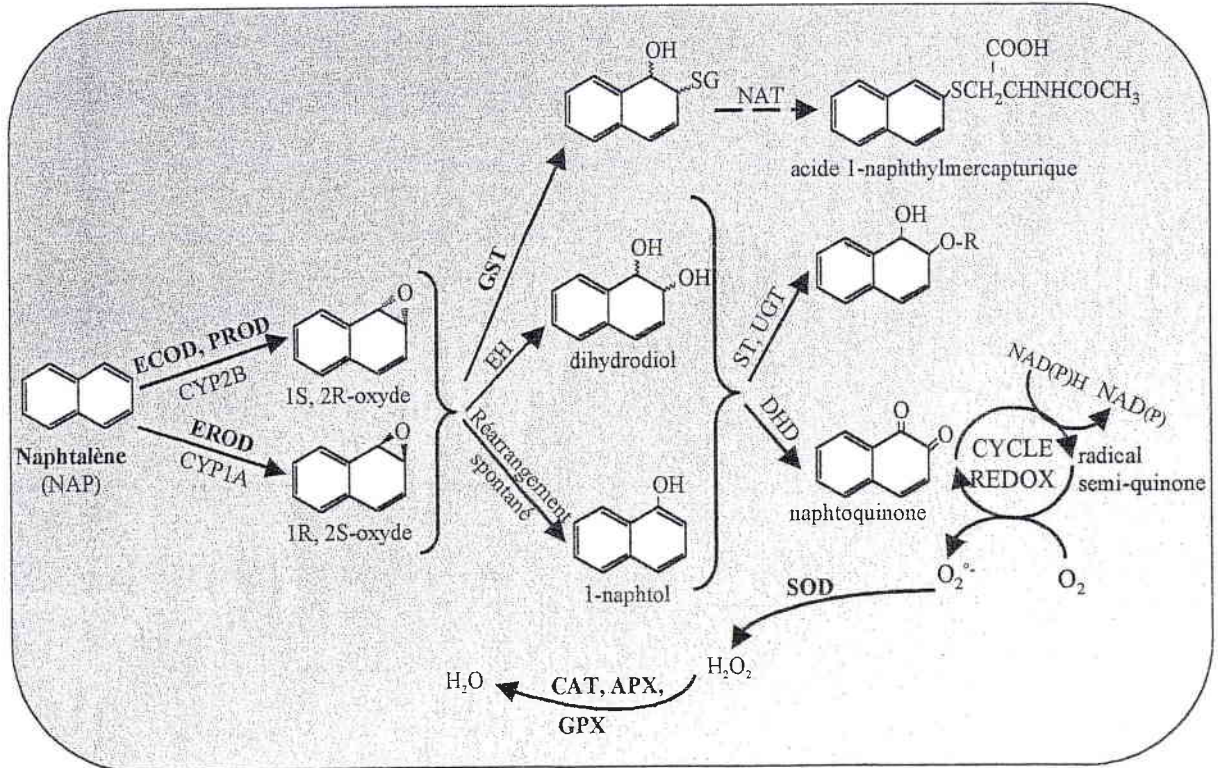


Figure III-3 : Métabolisme du naphthalène chez les mammifères



Comme pour la plupart des HAP, la toxicité induite par le NAP nécessite son activation par les monooxygénases à cytochrome P450. L'oxydation du NAP génère principalement deux énantiomères de naphthalène 1,2-oxyde (**Fig. III-3**). Dans le foie de rat, l'isoenzyme CYP1A1 favorise la formation de l'énantiomère 1R,2S (Van Bladeren *et al.*, 1984). A l'inverse, le CYP2B1 produit le (1S, 2R)-naphthalène 1,2-oxyde (Van Bladeren *et al.*, 1985). L'isoenzyme CYP2F2 dans le poumon de souris produit aussi l'énantiomère 1R,2S (Nagata *et al.*, 1990) qui semble être responsable de nécroses dans les cellules Clara (Buckpitt *et al.*, 1995). Cette époxydation stéréospécifique est donc dépendante du profil enzymatique des organes, qui déterminera ainsi leurs susceptibilités au NAP.

Ces deux époxydes peuvent suivre différentes voies métaboliques (**Fig. III-3**). Alors qu'*in vitro* leur conversion en naphthol par réarrangement spontané est démontrée (Jerina *et al.*, 1970), il semble qu'*in vivo*, les métabolites phénoliques proviennent essentiellement de la conversion par la microflore intestinale (Bakke *et al.*, 1985). Leur transformation par l'époxyde hydrolase (EH) microsomale conduit à la formation de dihydrodiols. Ces derniers, comme le naphthol, sont des substrats des ST et des UGT. Ils peuvent également être convertis en naphtoquinones par transformation enzymatique (dihydrodiol déhydrogénase, DHD) ou non-enzymatique (d'Arcy et Cohen, 1984). Les préjudices causés par le NAP proviennent majoritairement de ce dernier métabolite qui est transformé en radical semi-quinone. La plupart de ces molécules réduisent rapidement la molécule d'oxygène en anion superoxyde avec régénération concomitante de quinones. Cette étape engendre un stress oxydant dû à la formation de ERO (Vuchetich *et al.*, 1996) qui peuvent être pris en charge par les enzymes antioxydantes (GPX, CAT, APX). Les époxydes peuvent également être conjugués au glutathion par les GST. Il s'en suit différentes étapes de biotransformation jusqu'à l'obtention des dérivés d'acide mercapturique.

Le devenir des époxydes dépend de la distribution relative des isoenzymes de détoxification et varie donc en fonction des organes considérés. Ainsi, dans le poumon de souris, la voie métabolique majeure est la conversion du NAP en dihydrodiol et sa conjugaison au GSH (Kanehal *et al.*, 1991). A l'inverse, dans le foie de souris, la voie métabolique empruntée est nettement plus complexe et produit de nombreux métabolites tels que des glucuronides et des sulfoconjugués (Buonarati *et al.*, 1990).

## **II- Exposition au NAP : variations des activités enzymatiques chez *Helix aspersa***

La réponse des activités enzymatiques à l'exposition au NAP étant variable d'un organe à l'autre, chacun d'entre eux sera considéré séparément.



## II-1. Le toit de la cavité palléale

Quelles que soient les enzymes considérées, l'exposition au NAP ne semble pas avoir d'effet sur ces dernières (Fig. III-4). Deux hypothèses peuvent être avancées pour tenter d'expliquer cette absence d'effet.

La première hypothèse s'appuie sur le fait que la consommation d'oxygène dépend de l'activité de l'organisme : plus cette activité diminue plus la consommation d'oxygène chute (Ghiretti et Ghiretti-Magaldi, 1975). Or, pendant les trois jours d'exposition, les escargots étaient totalement amorphes. Cette absence d'activité a certainement limité la pénétration du NAP par le pneumostome (orifice qui connecte la cavité palléale avec l'extérieur). Toutefois, ces organismes étant hors de leur coquille pendant toute la durée de l'expérimentation, la respiration s'est probablement effectuée par voie cutanée (Ghiretti et Ghiretti-Magaldi, 1975). Ainsi, le NAP a pu pénétrer par le tégument. En conséquence, le toit de la cavité palléale ne serait pas un organe déterminant pour le métabolisme de ce polluant, qui semble avoir une action anesthésiante.

La seconde hypothèse envisageable considère que la production d'époxyde dans cet organe est très limitée en raison des faibles niveaux de CYP. Il est donc possible que les niveaux constitutifs de GST et de GPX soient suffisants pour éliminer les métabolites générés sans nécessiter une induction.

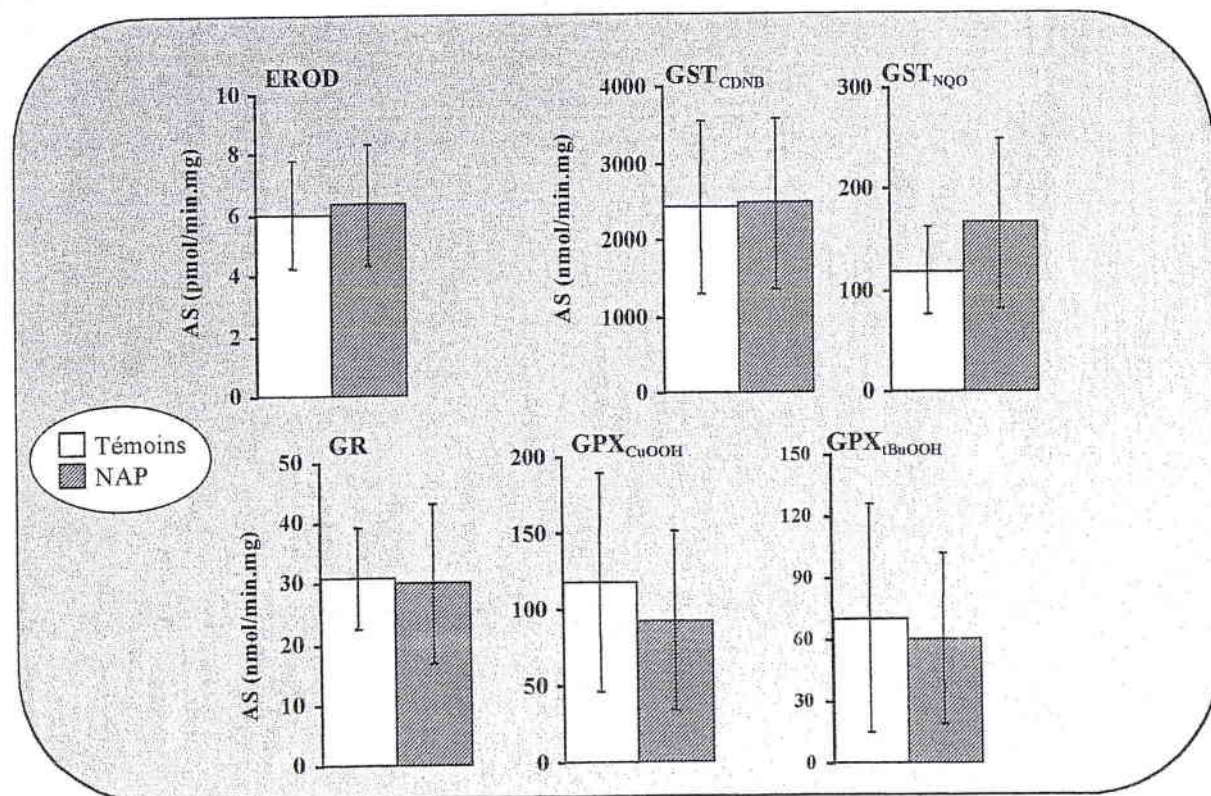


Figure III-4 : Variations des activités enzymatiques dans le toit de la cavité palléale d'*H. aspersa* après exposition au NAP

Les données correspondent à la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 9 échantillons indépendants. \* différence statistiquement significative suivant le test de Mann Whitney ( $P < 0,01$ ).

## II-2. La glande digestive

La glande digestive présente une augmentation faible mais statistiquement significative des activités EROD (1,3 fois) et ECOD (1,5 fois) (Fig. III-5). Cette induction est en accord avec celle observée dans le foie de souris, où l'injection intra-péritonéale de HAP de deux et trois cycles augmente faiblement l'activité EROD (Chaloupka *et al.*, 1995). Une induction de l'activité ECOD a également été observée dans les glandes digestives des bivalves *M. edulis* après exposition au 3MC (Livingstone *et al.*, 1988) et *M. galloprovincialis* après exposition au PB (Galli *et al.*, 1988). Cette induction fournit des époxydes, substrats des voies de métabolisation situées en aval.

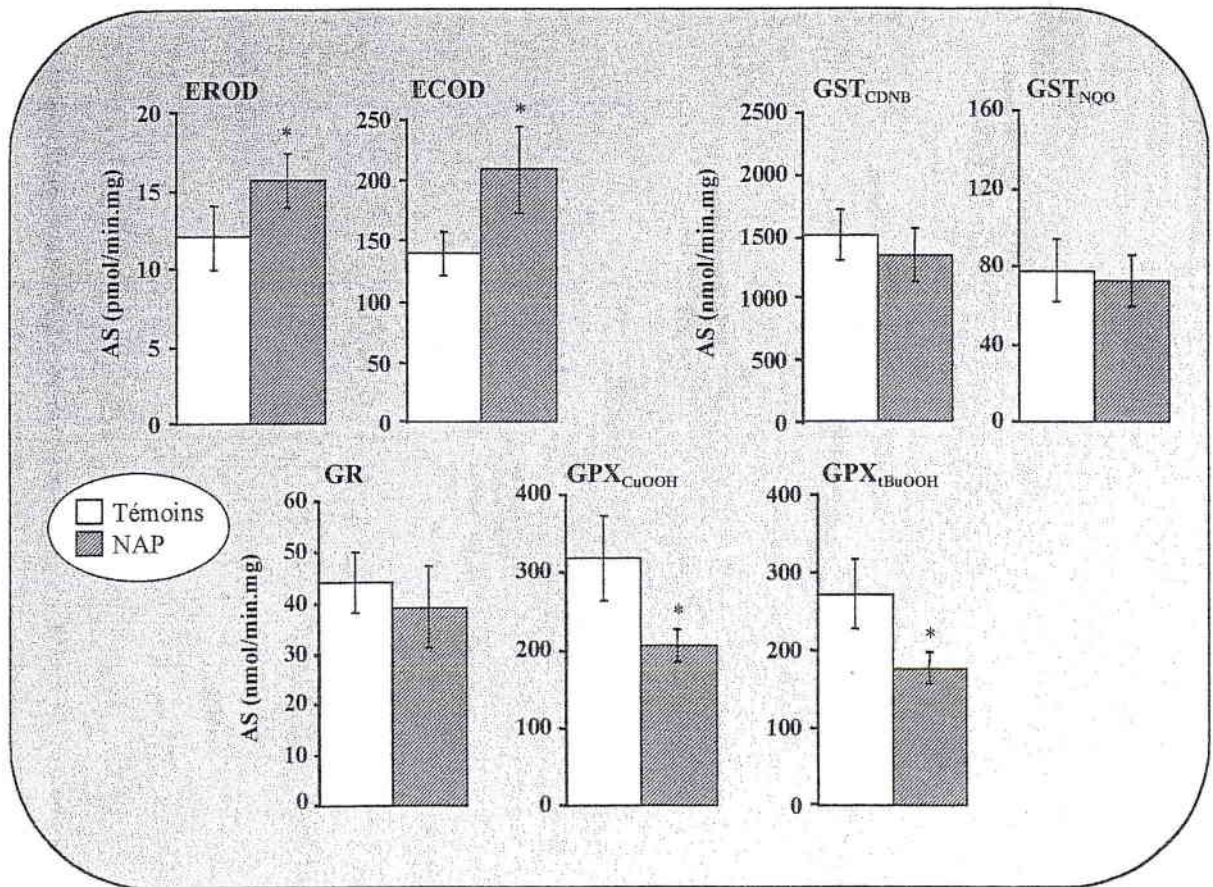


Figure III-5 : Variations des activités enzymatiques dans la glande digestive d'*H. aspersa* après exposition au NAP

Les données correspondent à la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 9 échantillons indépendants. \* différence statistiquement significative suivant le test de Mann Whitney ( $P < 0,01$ ).

Chez les mammifères, il est établi que l'induction du CYP est AhR-dépendante (Polland *et al.*, 1976). Cependant, l'intervention d'une voie alternative, indépendante du récepteur Ah semble être sollicitée lors de l'induction de l'expression du gène *CYP1A2* par des HAP à 3 cycles chez les souris (Chaloupka *et al.*, 1994). Il en est de même pour l'induction par le carbaryl de



l'expression du gène *CYP1A1* chez l'homme (Sandoz *et al.*, 1998). Il est donc possible, que le NAP, dont l'incapacité à se fixer au récepteur Ah a été démontrée, emprunte également ce type de voie alternative. La présence du récepteur Ah chez les mollusques étant sujette à controverses, il serait intéressant, dans un travail ultérieur, de déterminer la voie de signalisation mise en œuvre lors de l'induction des activités EROD et ECOD que nous avons observées après traitement au NAP.

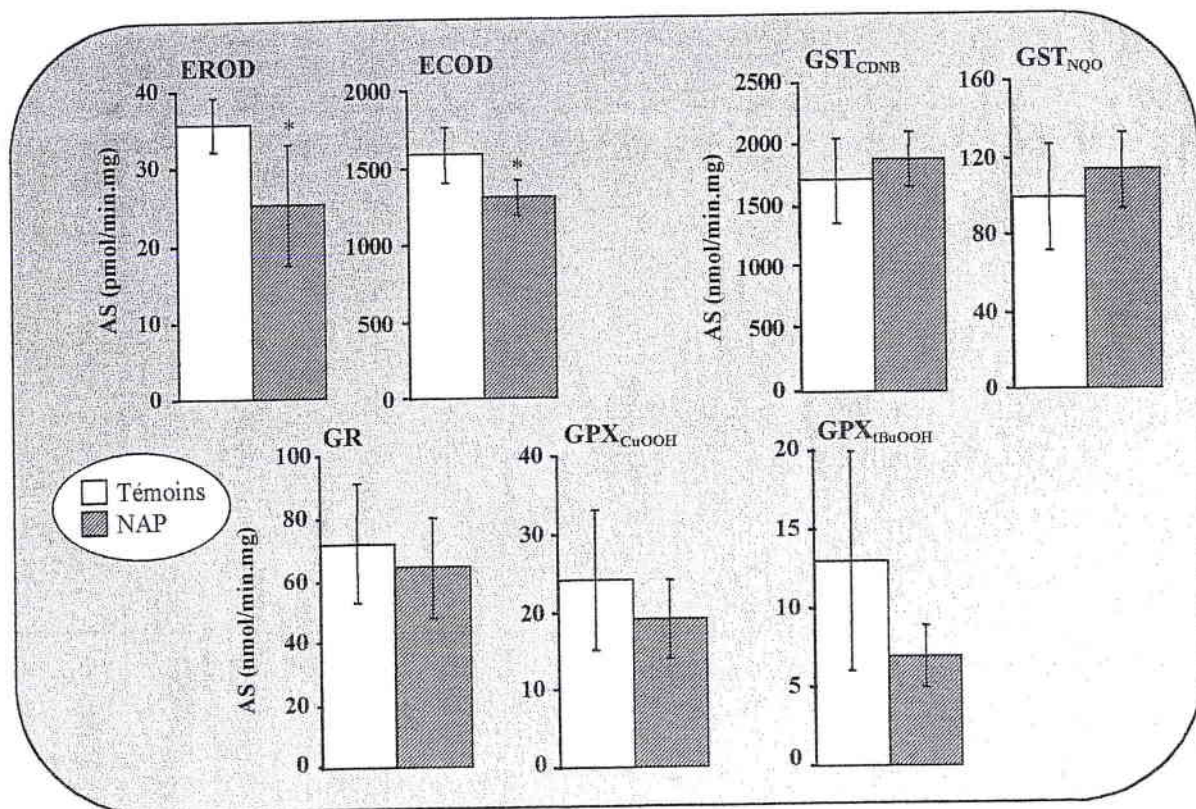
Alors que les activités GST et GR ne sont pas affectées par l'exposition au NAP, on observe que l'induction des activités EROD et ECOD est associée à la diminution des activités GPX d'un facteur 1,5. Une observation similaire a été rapportée chez des rats exposés par voie orale au NAP (Germansky et Jamall, 1988). Une augmentation de la peroxydation lipidique dans le foie, qui est associée à une réduction significative des activités GPX résulte de ce traitement *in vivo*. Alors que cette diminution de l'activité GPX n'est pas expliquée, l'implication du NAP dans les processus de la peroxydation lipidique est bien élucidée. En effet, l'administration orale de NAP chez des rats augmente significativement l'excrétion urinaire des métabolites de la peroxydation lipidique, comprenant le malondialdéhyde, le formaldéhyde et l'acétaldéhyde (Vuchetich *et al.*, 1996). L'origine de cette peroxydation lipidique se trouve dans la production accrue d'espèces réactives (Brasitus *et al.*, 1987) qui augmente la microviscosité des membranes mitochondriales et microsomales du foie et du cerveau de rat (Vuchetich *et al.*, 1996). Cette production d'espèces réactives, couplée à une déplétion du GSH observée chez les mammifères après exposition au NAP, tant dans des conditions *in vitro* (Richieri et Buckpitt, 1988) qu'*in vivo* (Warren *et al.*, 1982, Vuchetich *et al.*, 1996) conduit à un stress oxydant qui sera aggravé par la diminution de l'activité GPX.

### II-3. Le rein

A l'inverse de ce qui se passe pour la glande digestive, le traitement par le NAP diminue significativement les activités EROD et ECOD, respectivement d'un facteur 1,4 et 1,2 (Fig. III-6). Aucune variation significative n'est observable pour les enzymes associées au glutathion, bien qu'une tendance à la diminution des activités GPX puisse être observée.

En comparaison avec le toit de la cavité palléale et la glande digestive, les niveaux de base des activités CYP sont nettement plus élevés dans le rein, d'un facteur 10 et 3 respectivement pour ECOD et EROD. En conséquence, le métabolisme du NAP dans cet organe peut s'effectuer plus rapidement, plus efficacement et produire davantage de métabolites réactifs. Ces derniers peuvent être à l'origine de la génération d'un stress oxydant important (Fig. III-3). Or, une étude réalisée chez l'homme a montré que le stress oxydant peut réguler négativement l'expression du gène *CYP1A1* (Morel et Barouki, 1998). De plus, des travaux récents effectués chez des

vertébrés ont démontré que les ERO sont capables de réagir avec le site actif du CYP1A1 provoquant son inactivation (Schlezinger *et al.*, 1999). Ces observations peuvent expliquer la diminution des activités CYP observées dans le rein d'*H. aspersa*.



**Figure III-6 : Variations des activités enzymatiques dans le rein d'*H. aspersa* après exposition au NAP**

Les données correspondent à la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 9 échantillons indépendants. \* différence statistiquement significative suivant le test de Mann Whitney ( $P < 0,01$ ).

#### II-4. Conclusions

Les activités CYP répondent d'une façon organo-spécifique à l'exposition d'*H. aspersa* à une atmosphère saturée en NAP. Alors qu'elles sont augmentées dans la glande digestive, ces dernières diminuent dans le rein. Ce comportement inverse est probablement le reflet de concentrations différentes d'espèces réactives entre ces organes, dû à des niveaux d'activités basales forts distincts. A l'inverse, les enzymes associées au glutathion présentent le même comportement. Les activités GST ne sont pas modifiées, alors que les activités GPX sont diminuées dans la glande digestive, mais également dans le rein bien que statistiquement non-significatives.



### III- Exposition au NAP : variations des activités enzymatiques chez *Pleurozium schreberi*

*Pleurozium schreberi* a été exposée durant trois jours à une ambiance saturée en NAP, tout comme *H. aspersa*.

A notre connaissance, le métabolisme du NAP n'a pas été étudié chez les végétaux. Toutefois, les systèmes de biotransformation et antioxydants des animaux se retrouvent également chez les végétaux. Sans préjuger de leur importance relative, il était donc logique d'étudier les effets du NAP sur les enzymes du système du glutathion chez la mousse, en y adjoignant deux activités antioxydantes.

L'exposition au NAP de *P. schreberi* n'occasionne aucune modification statistiquement significative des différentes activités enzymatiques explorées (Fig. III-7). Toutefois, une tendance à l'augmentation des activités GST<sub>CDNB</sub> (1,3 fois), GST<sub>DCNB</sub> (1,6 fois), CAT (1,4 fois) et GPX<sub>BuOOH</sub> (1,5 fois) est visible.

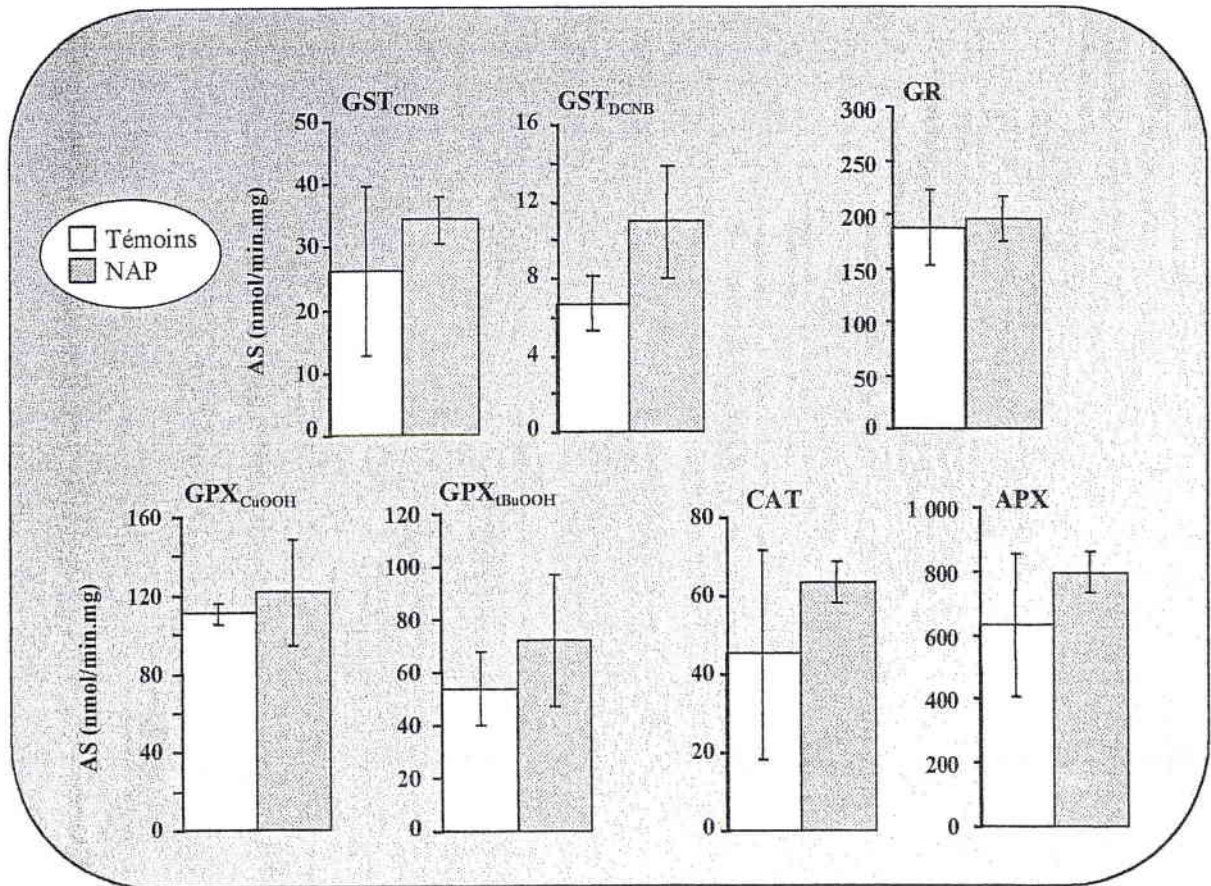


Figure III-7 : Variations des activités enzymatiques chez *Pleurozium schreberi* après exposition au NAP

Les données correspondent à la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 échantillons indépendants. \* différence statistiquement significative suivant le test de Mann Whitney ( $P < 0,01$ ).

Deux hypothèses, suggérées par des résultats obtenus sur la mousse aquatique *Fontinalis antipyretica*, peuvent être avancées pour tenter d'expliquer cette absence de réponse. Exposé à 2 µM de phénanthrène (HAP à 3 cycles) durant neuf jours, cet organisme n'est capable d'en métaboliser qu'une très faible quantité, la majeure partie de ce polluant étant adsorbée à la surface de la plante (Schrenk et Steinberg, 1998). Soit, le même phénomène se produit chez *P. schreberi* et explique cette tendance à l'augmentation de certaines activités explorées, soit, *P. schreberi*, connue comme accumulateur performant de HAP, accumule efficacement le NAP mais ne le métabolise pas ou, nécessite plus de 3 jours d'exposition pour qu'une variation des activités enzymatiques soit visualisable.

Une étude sur différents temps d'exposition, mais également sur plus de trois échantillons s'avère indispensable pour confirmer l'une ou l'autre de ces hypothèses.

## IV- Récapitulatif

### ↳ *Helix aspersa*

- ❶ Réponse organo-spécifique après 3 jours d'exposition au NAP
- ❷ TCP : aucune variation observée
- ❸ EROD et ECOD : ↗ GD et ↘ R
- ❹ GST : → GD et R
- ❺ GPX : ↘ GD et R (non significative pour R)

### ↳ *Pleurozium schreberi*

- ❶ Aucune variation significative GST, GR, GPX, CAT et APX après 3 jours d'exposition au NAP

GD = glande digestive, R = rein, TCP = toit de la cavité palléale, NAP = naphthalène



*~ PARTIE III ~*

*Expérimentation en conditions semi-contrôlées*

*- Exposition à un mélange de HAP*

~ PARTIE III ~

*Expérimentation en conditions semi-contrôlées - Exposition à un mélange de HAP*

- Voies métaboliques du benzo[ <i>a</i> ]pyrène chez les mollusques .....	99
I- Variations des activités enzymatiques chez <i>H. aspersa</i> .....	101
II-1. Les activités de phase I : EROD et ECOD.....	101
II-2. Les activités associées au glutathion.....	104
II- Variations des activités enzymatiques chez <i>P. schreberi</i> .....	107
V- Récapitulatif .....	109

Les expérimentations précédentes ont évalué la sensibilité des paramètres biochimiques choisis à une pollution atmosphérique par un HAP simple, dans des conditions contrôlées. Afin de tendre davantage vers une situation réelle, les variations de ces mêmes paramètres ont été étudiées dans des conditions expérimentales que nous pouvons considérer comme semi-contrôlées. Cette étude a été réalisée en milieu industriel. En effet, les principales causes d'exposition aux HAP des ouvriers sont liées à l'utilisation de procédés de combustion dans l'environnement du poste de travail. Cette situation est particulièrement manifeste lorsque les procédés de fabrication utilisent la combustion du brai de houille. Des études épidémiologiques et expérimentales permettent de classer le brai de houille comme un composé cancérigène pour l'homme qui augmente, notamment, les risques de cancer de la peau, du poumon et de la vessie (Groupe 1, IARC 1985).

Les organismes ont donc été installés, pendant 8 heures, sur une chaîne de production à une distance plus ou moins importante de la source de pollution, donc à une ambiance plus ou moins chargée en HAP. Le benzo[a]pyrène, considéré comme un marqueur représentatif de cette famille de composés émis par les procédés de fonte, a été choisi comme traceur (WHO, 1987). De plus, étant connu pour ses propriétés hautement cancérigènes, il permet d'estimer le "pouvoir cancérigène" de l'atmosphère (IARC, 1983). Ainsi, l'expérimentation a été effectuée sur trois postes de travail que nous avons désignés par un chiffre en fonction de la concentration en benzo[a]pyrène : site 1 = 380 ng de BaP/m<sup>3</sup>, site 2 = 510 ng de BaP/m<sup>3</sup> et site 3 = 840 ng de BaP/m<sup>3</sup>. *A priori*, l'atmosphère des sites 1 et 3 est principalement chargée en HAP. Par contre, un atelier de peinture se situant au niveau du site 2, des polluants de nature différente, en l'occurrence des solvants organiques, sont probablement présents à ce niveau. Le site témoin numéroté 0, correspond à notre salle d'élevage qui est considérée comme exempte d'HAP.

## **I- Voies métaboliques du benzo[a]pyrène chez les mollusques**

Des études réalisées sur des microsomes de glande digestive du bivalve *M. edulis* ont permis de mettre en évidence différentes voies de biotransformation du BaP [1] (Livingstone *et al.*, 1990). Ce polluant peut être métabolisé en intermédiaires réactifs suivant deux voies majeures (**Fig. III-8**).

La première voie, catalysée par les CYP, implique l'oxydation du BaP *via* un mécanisme à deux électrons et produit divers époxydes [2]. Ces métabolites vont successivement subir différentes réactions catalysées par les CYP et les EH générant ainsi un composé hautement réactif, le BaP 7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde [4] (BPDE). Le BPDE peut, entre autres, former

des adduits à l'ADN (Bigger *et al.*, 1994) ou être conjugué au glutathion [5] par les GST en vue d'une élimination ultérieure.

La seconde voie métabolique est également catalysée par les CYP, mais nécessite un seul électron. L'oxydation du BaP forme un radical cationique [6] qui peut également se lier aux macromolécules, dont l'ADN (Livingstone *et al.*, 1990). Ce métabolite peut conduire par oxydation spontanée à des quinones [7] qui initient la cascade radicalaire et produisent des ERO tels que l'anion superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et, le plus réactif, le radical hydroxyl ( $OH^{\circ}$ ) (Venier et Canova, 1996, Sjölin et Livingstone, 1997). Les ERO ainsi produits vont pouvoir occasionner un stress oxydant dont la sévérité dépendra de l'efficacité des défenses antioxydantes (SOD, CAT, GPX...).

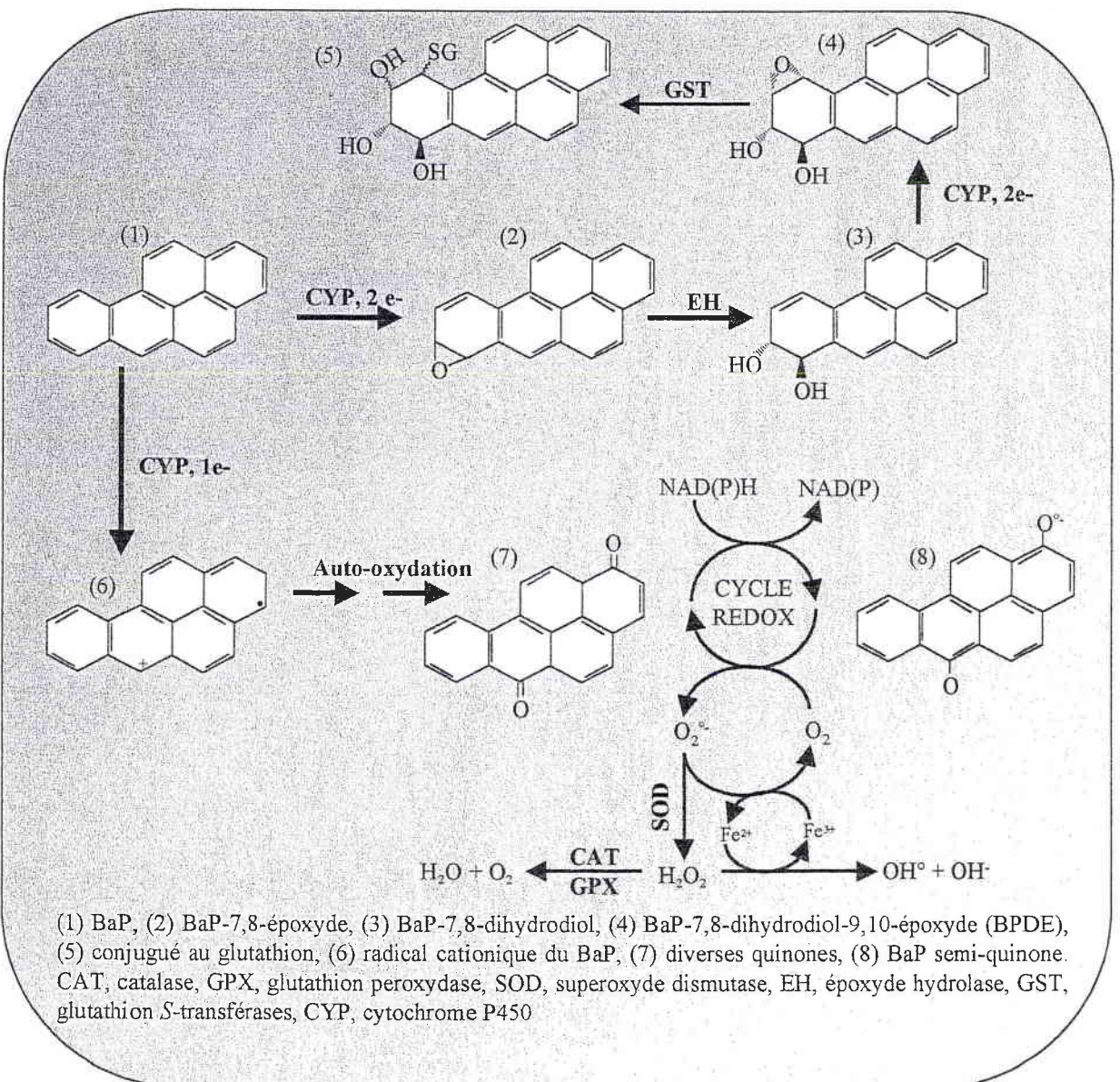


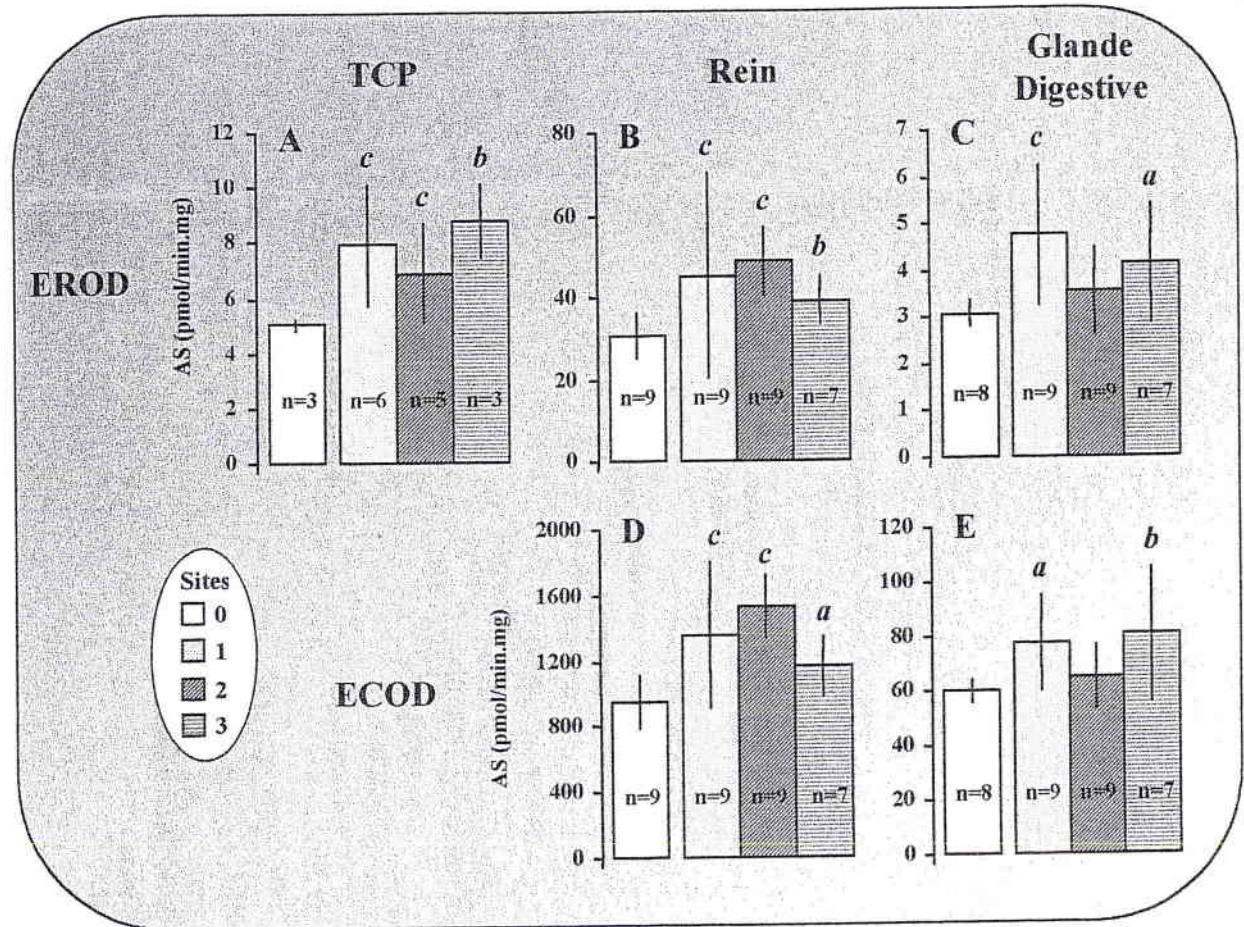
Figure III-8 : Voies métaboliques du benzo[a]pyrène chez *Mytilus edulis* (modifiée de Mitchelmore *et al.*, 1998)





## II- Variations des activités enzymatiques chez *H. aspersa*

### II-1. Les activités de phase I : EROD et ECOD



**Figure III-9 : Variations des activités de phase I dans les trois organes d'*Helix aspersa*, après 8 heures d'exposition à une atmosphère de travail chargée en HAP**

Les données correspondent à la moyenne  $\pm$  l'écart-type de n échantillons. Site 0 = site témoin, site 1 = 380 ng BaP/m<sup>3</sup>, site 2 = 510 ng BaP/m<sup>3</sup> et site 3 = 840 ng BaP/m<sup>3</sup>. Les différences statistiquement significatives par rapport au site 0, représentées par <sup>a</sup>  $P < 0,05$ , <sup>b</sup>  $P < 0,02$ , <sup>c</sup>  $P < 0,01$  ont été déterminées par analyse de variance (ANOVA), après transformation logarithmique des données.

Exception faite des résultats obtenus pour la glande digestive dans le cas du site 2, l'activité EROD est significativement augmentée après huit heures d'exposition, quels que soient le site et l'organe considérés (Fig. III-9, A, B et C). Ces inductions, bien que statistiquement significatives, sont faibles puisque les facteurs d'augmentation des activités sont compris entre 1,2 et 1,6 avec une moyenne de 1,4. L'activité ECOD, qui n'est pas détectée dans le toit de la cavité palléale, présente dans la glande digestive et le rein le même profil que l'activité EROD (Fig. III-9, D et E). Les facteurs d'induction des activités EROD et ECOD ne sont pas influencés par la concentration de BaP lorsque celle-ci varie dans l'intervalle considéré (380 à 840 ng/m<sup>3</sup>).

L'augmentation des activités CYP après exposition contrôlée au BaP a été observée aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés (Chap I, Partie III). Chez les vertébrés, plus particulièrement les poissons, l'augmentation de l'activité EROD a été rapportée chez de nombreuses espèces, exposées au BaP par des voies très variées. De telles inductions ont été signalées chez : le flet, *Platichthys flesus*, après injection intramusculaire de 1 mg de BaP/kg (Beyer *et al.*, 1997) ; le loup de mer, *Dicentrarchus labrax*, après injection intra-péritonéale de 20 mg de BaP/kg (Lemaire *et al.*, 1992) ; l'omble, *Salvelinus alpinus*, après exposition à une dose orale de 60 mg de BaP/kg (Wolkers *et al.*, 1996) et également la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, après 72 heures d'exposition statique à 100 µg de BaP/L (Cravedi *et al.*, 1998). Dans le cas du flet, l'induction maximale de l'activité hépatique EROD est atteinte deux jours après l'injection, puis diminue après quatre jours, jusqu'à retrouver son niveau de base seize jours après l'injection (Beyer *et al.*, 1997). De même, pour le loup de mer, l'injection provoque une induction maximale des activités hépatiques EROD et ECOD en vingt-quatre heures. Ces activités chutent 48 heures après le traitement pour atteindre leurs niveaux de base 168 heures après l'exposition (Lemaire *et al.*, 1992). Ces études mettent donc en évidence une induction transitoire des activités CYP lors d'intoxications aiguës.

Ce phénomène transitoire a également été signalé chez un invertébré, le ver de terre *Eisenia fetida andrei*. En effet, l'exposition de cet organisme à un sol contaminé par 0,05 mg de BaP/kg de sol, conduit à une augmentation de l'activité méthoxyrésorufine-*O*-dééthylase (MROD) après 1, 2 et 7 jours d'exposition, suivie d'une diminution de l'activité enzymatique après 14 jours d'exposition. Si la concentration en BaP est de 1 mg/kg de sol, alors l'augmentation se limite au premier jour d'exposition, si celle-ci est de 100 ou 1000 mg de BaP/kg alors, dès le premier jour, l'activité MROD descend sous le niveau de base (Saint-Denis *et al.*, 1999). En résumé, dans cette étude, l'activité MROD est augmentée pour la plus faible dose testée (0,05 mg de BaP/kg) et est diminuée aux concentrations les plus importantes (100 et 1 000 mg de BaP/kg).

Les résultats observés chez *H. aspersa* (Fig. III-9) mettent en évidence l'implication des CYP dans le métabolisme des HAP, pour les trois organes explorés. Cette implication se révèle par une induction précoce (après 8 heures d'exposition), mais non dose-dépendante, des activités EROD et ECOD. Cette absence de réponse dose-dépendante peut s'expliquer au regard des résultats bibliographiques rapportés précédemment, tant chez les vertébrés que chez les invertébrés. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène :

① Le temps d'exposition, limité à huit heures, est trop court pour pouvoir déceler une réponse dose-dépendante. Les exemples bibliographiques cités auparavant ont bien mis en évidence l'importance du paramètre "temps" dans l'induction des activités CYP. Ainsi, il est fort

probable que dans notre cas de figure, une durée de huit heures d'exposition soit trop courte pour visualiser une différence de réponse entre les trois concentrations étudiées (380, 510 et 840 ng de BaP/m<sup>3</sup>).

② La concentration de BaP est trop importante pour observer une réponse dose-dépendante. Il peut effectivement y avoir saturation du système dès 380 ng de BaP/m<sup>3</sup>. On note que les concentrations en BaP présentes dans cette atmosphère de travail sont nettement plus importantes que celles rencontrées en milieu urbain qui sont de l'ordre du nanogramme.

③ Les différences de concentrations de BaP entre les sites sont de quelques centaines de nanogrammes et peut-être insuffisantes pour mettre en évidence de façon claire une relation dose-effet.

④ Les deux hypothèses précédentes ne prennent en considération que l'effet du BaP qui est utilisé ici comme traceur reflétant la concentration de divers HAP. Or, la source de pollution provenant de la combustion du brai de houille, l'atmosphère contient un mélange plus ou moins complexe de HAP qui peuvent exercer des effets propres sur les activités explorées. De plus, la composition de l'atmosphère peut également être modifiée par la présence de polluants de nature différente, principalement émis au niveau du site 2, où des travaux de peinture sont réalisés. L'émanation sur ce site de solvants organiques (toluène, xylène), mais également de pigments, est donc indéniable. La modification de ce mélange complexe de polluants peut engendrer des effets aussi bien synergiques qu'antagonistes. Un tel effet antagoniste a été clairement identifié dans des cellules d'hépatomes de rat H4IIE. Le traitement de ces dernières par un mélange de fluoranthène et benzo[*k*]fluoranthène (BkF) occasionne une diminution de l'activité EROD. Or, le BkF est un inducteur puissant de l'activité EROD (Willett *et al.*, 1998). De plus, l'activité EROD est augmentée après traitement de cellules d'hépatomes de rat FaO par un mélange de HAP aux plus faibles concentrations, alors qu'elle est diminuée aux plus fortes concentrations. Il semblerait que la présence d'inhibiteurs dans le mélange, qui agissent aux plus fortes doses soit responsable de cette diminution (Chiarolini *et al.*, 1997). Ces hypothèses peuvent expliquer l'absence d'une réponse dose-dépendante, mais également l'absence d'induction des activités CYP dans la glande digestive au niveau du site 2.

Ces différentes hypothèses ne s'excluent nullement. En effet, il est absolument impossible de dissocier la variable temps d'exposition de la variable concentration. Ces deux composantes sont forcément impliquées dans les processus d'induction.

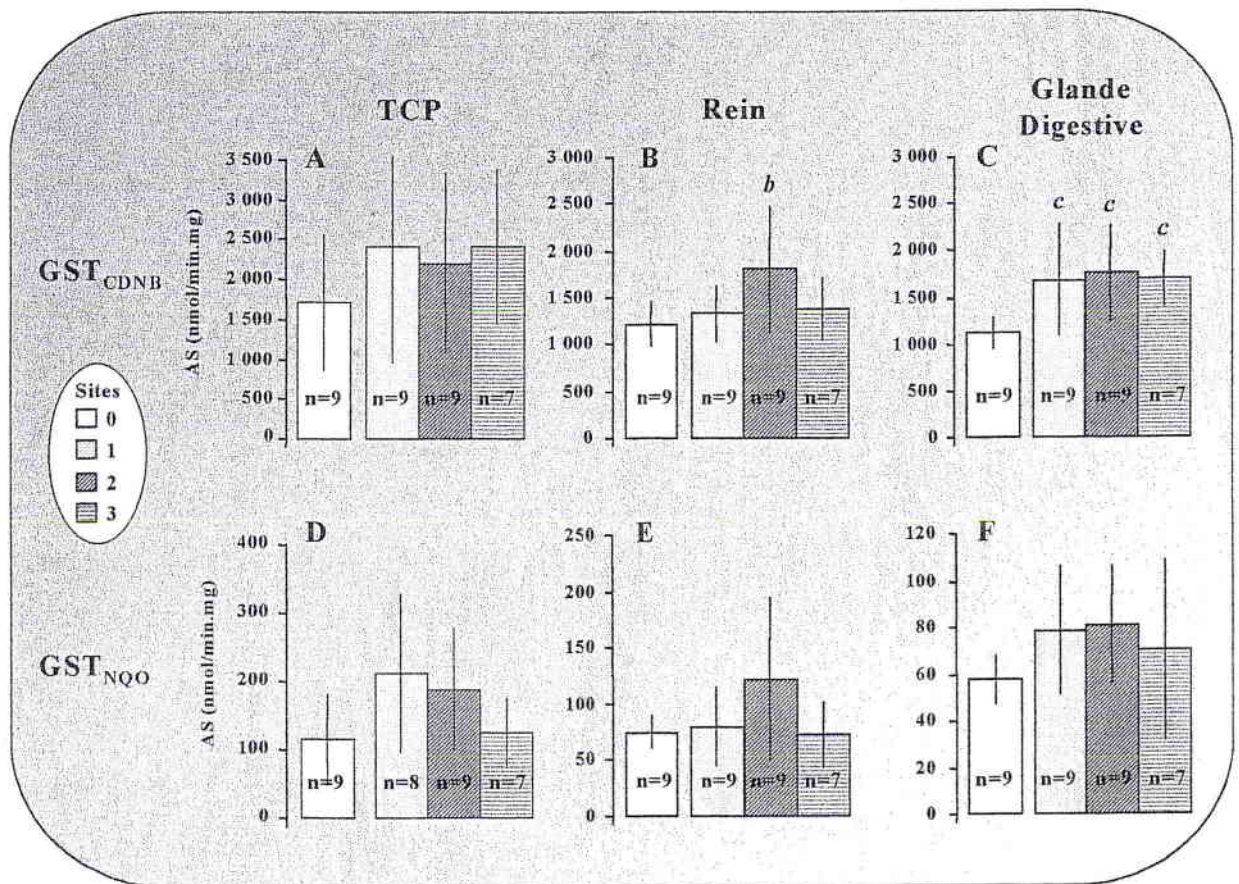
Pour vérifier le fondement de ces hypothèses des études complémentaires sont indispensables. Il serait nécessaire de réaliser la même expérimentation avec différents temps d'exposition mais également une plus grande gamme de concentrations. De même, le suivi de



plusieurs HAP, tant en phase gazeuse que particulaire, permettrait d'identifier le ou les HAP prédominants. Une fois les HAP majoritaires déterminés, des études en conditions contrôlées faciliteraient les interprétations quant aux effets synergiques ou antagonistes possibles.

## II-2. Les activités associées au glutathion

A l'inverse des activités CYP qui présentent une réponse similaire dans les trois organes, les activités associées au glutathion montrent très nettement une sensibilité organo-spécifique (Fig. III-10 et III-11).



**Figure III-10 : Variations des activités glutathion S-transférases dans les trois organes d'*Helix aspersa*, après 8 heures d'exposition à une atmosphère de travail chargée en HAP**

Les données correspondent à la moyenne  $\pm$  l'écart-type de n échantillons. Site 0 = site témoin, site 1 = 380 ng BaP/m<sup>3</sup>, site 2 = 510 ng BaP/m<sup>3</sup> et site 3 = 840 ng BaP/m<sup>3</sup>. Les différences statistiquement significatives par rapport au site 0, représentées par <sup>a</sup>  $P < 0,05$ , <sup>b</sup>  $P < 0,02$ , <sup>c</sup>  $P < 0,01$  ont été déterminées par analyse de variance (ANOVA), après transformation logarithmique des données.

Dans le toit de la cavité palléale, les activités associées au glutathion (GST, GPX et GR) ne sont pas significativement modifiées quel que soit le site considéré (Fig. III-10A, 10D, 11A, 11D et 11G). Les activités CYP de cet organe étant extrêmement faibles, les métabolites sont probablement formés en quantité mineure. Nous pouvons donc supposer que les niveaux de base des enzymes associées au glutathion sont suffisants pour éliminer ces derniers. Au regard de ces

résultats et de ceux obtenus lors de l'exposition contrôlée au NAP, il semble que cet organe présente peu d'intérêt en vue de l'identification de biomarqueurs.

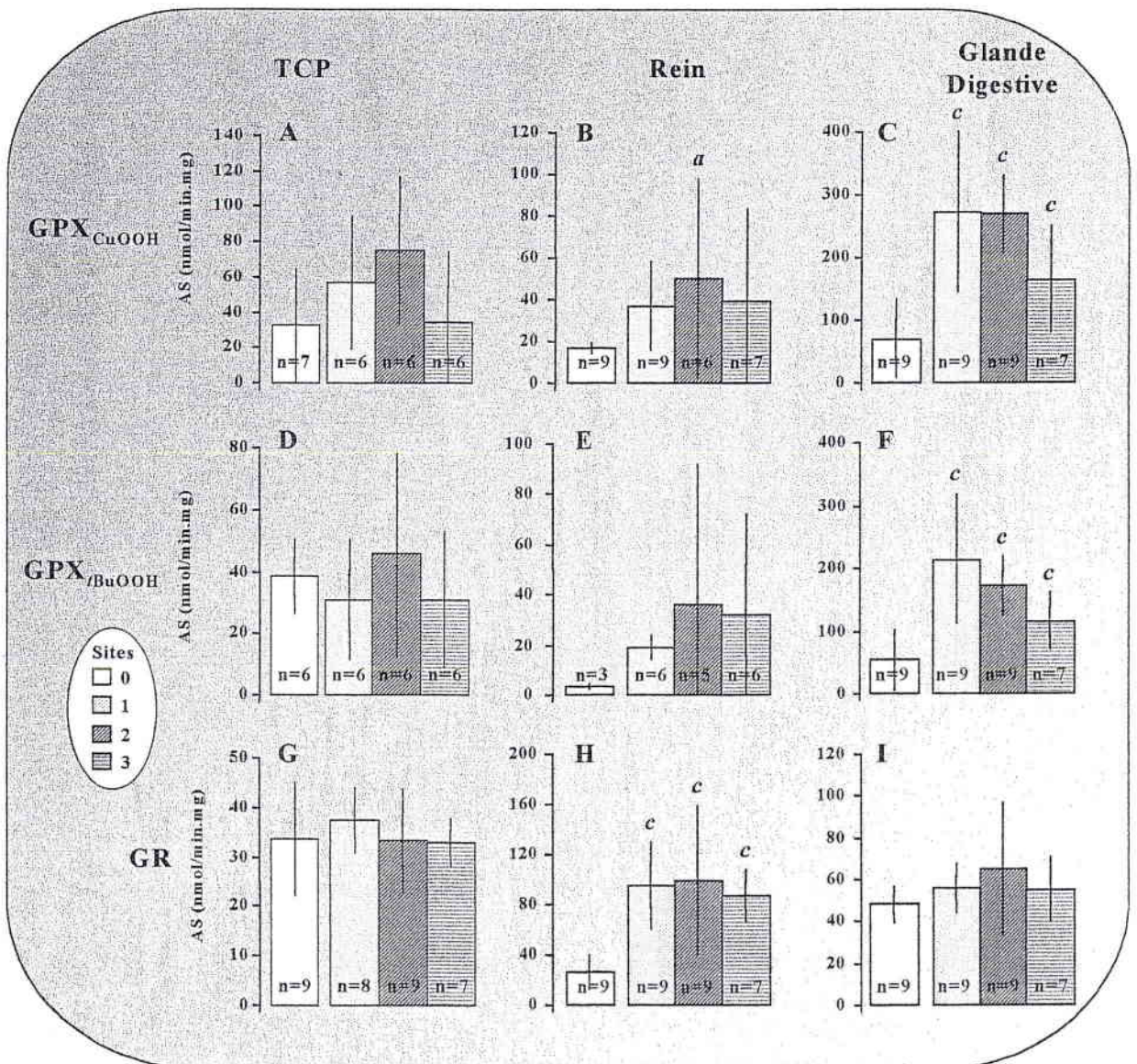
Dans le rein et la glande digestive, l'activité  $GST_{NQO}$  n'est pas affectée par ce type d'exposition. Au contraire, l'activité  $GST_{CDNB}$  dans le rein n'est significativement augmentée d'un facteur 1,5 que pour le site 2, alors que dans la glande digestive cette activité est significativement augmentée d'un facteur 1,5 quel que soit le site considéré (**Fig. III-10**). Pour ces deux organes, les profils des activités  $GST_{CDNB}$  et  $GST_{NQO}$  sont identiques. Il semble donc, que, comme nous l'avons suggéré dans la première partie de ce chapitre, le NQO reflète une activité globale qui paraît avoir peu d'intérêt.

La divergence des résultats pour l'activité  $GST_{CDNB}$  entre la glande digestive et le rein suggère que le BaP suit des voies métaboliques différentes dans ces deux organes. L'induction de cette activité enzymatique dans la glande digestive indique l'implication de cette enzyme dans les processus de détoxification du BaP. Celle-ci peut effectivement être capable de catalyser la conjugaison du GSH au BPDE (**Fig. III-8**), comme cela a été démontré chez le poisson chat, *Ictalurus punctatus* (Gallagher *et al.*, 1996). Dans le cas du rein, l'implication de diverses enzymes de conjugaison peut expliquer l'absence d'induction de la GST dans cet organe. En l'occurrence, l'UGT peut jouer un rôle déterminant, comme cela a été observé chez le loup de mer exposé au BaP où, l'activité UGT est fortement induite, alors que l'activité GST reste stable (Lemaire *et al.*, 1992). Il est également possible, que dans cet organe, tout comme chez *Mytilus edulis*, la voie principale de détoxification aboutisse aux quinones dont l'élimination est assurée par la cytochrome P450 réductase (**Fig. III-8**, Lemaire *et al.*, 1993, Michel *et al.*, 1995, Livingstone *et al.*, 1997). Le niveau constitutif de GST dans le rein est donc susceptible d'être suffisant pour conjuguer les diol-époxydes produits en faible quantité. Néanmoins, une induction est observée pour le site 2. Les émanations particulières au niveau de ce poste de travail, sont probablement responsables de ce phénomène.

Les activités GPX et GR présentent également des réponses organo-spécifiques (**Fig. III-11**). Alors que les activités  $GPX_{CuOOH}$  et  $GPX_{BuOOH}$  sont significativement augmentées dans la glande digestive d'un facteur de deux à quatre, l'activité GR n'est augmentée que dans le rein (3 à 4 fois). Bien que la différence soit statistiquement non-significative, les activités GPX mesurées dans le rein sont plus importantes pour les sites contaminés que pour le site témoin. En effet, ces dernières sont augmentées d'un facteur de deux à trois pour l'activité  $GPX_{CuOOH}$  et de six à dix pour l'activité  $GPX_{BuOOH}$ . Au regard des niveaux anormalement faibles de ces dernières, ces augmentations, tant dans le rein que dans la glande digestive, sont à prendre avec précautions



pour le site témoin. Les variations des niveaux de base de cette activité, déjà soulignées dans la première partie de ce chapitre, tendent à confirmer la sensibilité de cette enzyme à des paramètres non maîtrisés. Ces fluctuations rendent délicates l'interprétation des résultats, d'autant plus qu'au cours de l'exposition d'*H. aspersa* au NAP, une diminution de ces activités enzymatiques avait été observée dans les deux organes. Pour tenter d'expliquer ces divergences, l'évaluation du stress oxydant s'avère indispensable. Celle-ci pourrait se réaliser par le suivi des produits de la peroxydation lipidique, mais également du GSH. Cette dernière information, permettrait également d'expliquer l'augmentation du niveau de l'activité GR dans le rein, qui est probablement due à un besoin accru en GSH.



**Figure III-11 : Variations des activités glutathion peroxydases et glutathion réductase dans les trois organes d'*Helix aspersa*, après 8 heures d'exposition à un mélange de HAP**

Les données correspondent à la moyenne  $\pm$  l'écart-type de n échantillons. Site 0 = site témoin, site 1 = 380 ng BaP/m<sup>3</sup>, site 2 = 510 ng BaP/m<sup>3</sup> et site 3 = 840 ng BaP/m<sup>3</sup>. Les différences statistiquement significatives par rapport au site 0, représentées par <sup>a</sup>  $P < 0,05$ , <sup>b</sup>  $P < 0,02$ , <sup>c</sup>  $P < 0,01$  ont été déterminées par analyse de variance (ANOVA), après transformation logarithmique des données.

### III- Variations des activités enzymatiques chez *P. schreberi*

*P. schreberi* a été exposée dans les mêmes conditions qu'*H. aspersa*, à savoir une exposition de huit heures dans cette même atmosphère chargée en HAP. Les résultats obtenus sont représentés sur la **figure III-12**.

Autant les voies métaboliques du BaP chez les mollusques commencent à être bien élucidées, autant dans les cultures cellulaires de plantes, ainsi que dans les plantes entières, ces dernières ne sont que partiellement connues. En effet, l'altération du développement des plantes après exposition au BaP est expliquée par une probable activation de ce polluant en espèces réactives. Cette activation emprunterait des voies identiques à celles identifiées chez les animaux (Forrest *et al.*, 1989). Plus particulièrement, en présence de BaP les microsomes d'artichaut (*Helianthus tuberosus*) produisent des métabolites qui occasionnent une mutagénicité déterminée par le test d'Ames. La formation de ces métabolites nécessite certainement l'intervention du CYP (Higashi *et al.*, 1981).

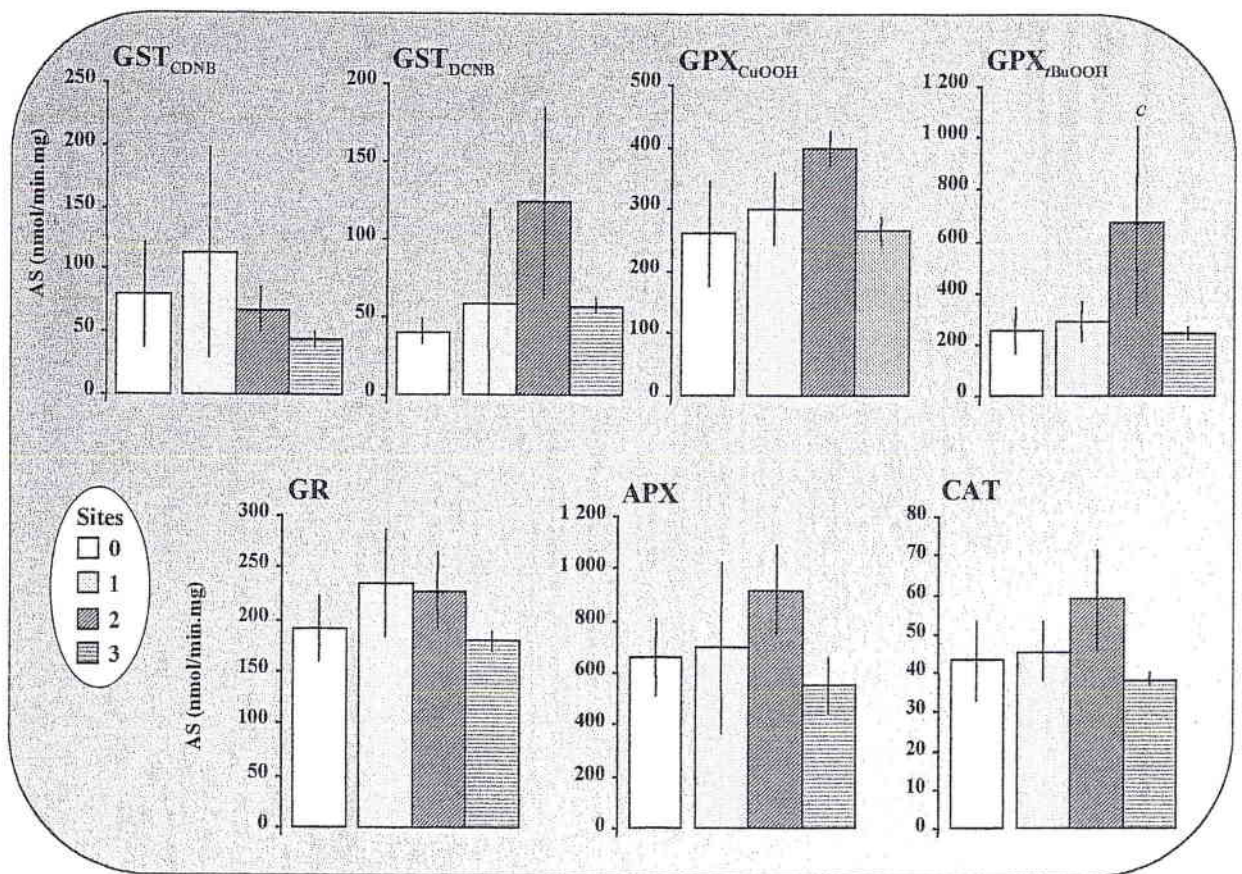
Récemment, des études réalisées sur des algues aquatiques ont mis en évidence l'implication des CYP et des peroxydases dans le métabolisme du BaP. De plus, différents produits d'oxydation, *i.e.* diols, quinones et phénols, ont été détectés dans ces organismes (Kirso et Irha, 1998). Ces produits, sont similaires à ceux identifiés chez les mollusques et suggèrent donc l'implication de systèmes enzymatiques identiques dans ces deux types d'organismes.

A l'exception de l'activité  $GPX_{tBuOOH}$  pour le site 2, aucune des activités enzymatiques explorées chez *P. schreberi* ne présente de variations significatives après huit heures d'exposition à une atmosphère chargée en HAP (**Fig. III-12**). Néanmoins, il faut souligner pour le site 2, la tendance à l'augmentation du niveau des activités  $GST_{DCNB}$ , GPX, APX et CAT. Il semblerait que les polluants supplémentaires générés sur ce site aient un pouvoir inducteur. Ils peuvent effectivement être plus réactifs que les HAP ou peuvent interagir avec les HAP produisant ainsi des espèces plus actives.

Au premier abord nos résultats semblent contradictoires avec ceux rapportés chez la mousse aquatique, *Fontinalis antipyretica*, dont les activités APX, SOD et peroxydase sont significativement augmentées après 35 jours de transplantation sur différents sites plus ou moins contaminés en HAP. Les variations de chacune de ces activités enzymatiques sont fortement corrélées à la quantité totale de HAP extraite des tissus de *F. antipyretica*, qui accumule davantage les HAP de quatre et cinq cycles que ceux de deux et trois (Roy *et al.*, 1996). De plus,



l'exposition de cet organisme en conditions contrôlées durant 168 heures à 0,5  $\mu\text{M}$  de BaP provoque également une induction des activités APX (25 %),  $\text{GST}_{\text{CDNB}}$  (35 %) et GR (30 %). Toutefois, ce comportement est à nuancer car si le BaP est remplacé par le BaA, les activités  $\text{GST}_{\text{CDNB}}$  et GR ne sont plus modifiées (Roy *et al.*, 1994). Néanmoins, compte tenu des différences fondamentales entre notre étude et celles de Roy *et al.* (espèce aquatique, temps d'exposition de 7 à 35 jours), la comparaison est délicate. Ainsi, les hypothèses évoquées pour expliquer l'absence d'induction des paramètres biochimiques après 3 jours d'exposition de *P. schreberi* au NAP, s'appliquent également à cette expérimentation.



**Figure III-12 : Variations des activités GST, GPX, GR, APX et CAT chez *Pleurozium schreberi* après 8 heures d'exposition à une atmosphère de travail chargée en HAP**

Les données correspondent à la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 échantillons. Site 0 = site témoin, site 1 = 380 ng BaP/m<sup>3</sup>, site 2 = 510 ng BaP/m<sup>3</sup> et site 3 = 840 ng BaP/m<sup>3</sup>. Les différences statistiquement significatives par rapport au site 0, représentées par <sup>a</sup>  $P < 0,05$ , <sup>b</sup>  $P < 0,02$ , <sup>c</sup>  $P < 0,01$  ont été déterminées par analyse de variance (ANOVA), après transformation logarithmique des données.

## IV- Récapitulatif

### ↪ *Helix aspersa*

- ❶ Augmentation des activités EROD et ECOD pour les trois organes : TCP, R, GD
- ❷ Augmentation de l'activité GST<sub>CDNB</sub> dans GD
  - => Réponse précoce : 8 heures d'exposition
  - => Réponse non dose dépendante
- ❸ Fluctuations anormales et non maîtrisées des niveaux de base de l'activité GPX

### ↪ *Pleurozium schreberi*

- ❶ Absence de modification des activités : GST, GR, GPX<sub>CuOOH</sub>, APX, CAT
- ❷ Augmentation de l'activité GPX<sub>tBuOOH</sub> uniquement pour le site où des travaux de peinture sont réalisés

### ↪ *Remarques*

Influence possible, tant chez *H. aspersa* que chez *P. schreberi*, des polluants (solvants organiques probablement) émanant d'un atelier de peinture situé au niveau du site 2



---

*~ PARTIE IV ~*

*Expérimentation en conditions non contrôlées -*

*Exposition en milieu urbain*

~ PARTIE IV ~

*Expérimentation en conditions non-contrôlées - Exposition en milieu urbain*

<b>I- Exposition d'<i>Helix aspersa</i> à une atmosphère urbaine.....</b>	<b>110</b>
I-1. Examen des niveaux de pollution sur les trois sites .....	110
I-2. Influence de la pollution urbaine sur le système enzymatique d' <i>Helix aspersa</i> .....	114
I-2.1. La glande digestive.....	114
I-2.2. Le rein.....	124
I-3. Conclusion.....	128
<b>II- Exposition de <i>Pleurozium schreberi</i> à une atmosphère urbaine .....</b>	<b>129</b>
II-1. Examen des niveaux de pollution sur les trois sites.....	129
II-2. Influence de la pollution urbaine sur le système enzymatique de <i>P. schreberi</i> .....	131
<b>III- Récapitulatif.....</b>	<b>135</b>

Les expérimentations réalisées dans des conditions contrôlées et semi-contrôlées ont permis de mettre en évidence la sensibilité des paramètres biochimiques explorés, à une pollution atmosphérique par un ou plusieurs HAP. Dans ces conditions d'étude, le ou les HAP étaient présents dans l'atmosphère à des concentrations extrêmement élevées en comparaison à celles trouvées dans une atmosphère urbaine. Ainsi, dans l'objectif d'apprécier la valeur de ces paramètres en tant que biomarqueur potentiel de la pollution atmosphérique par les HAP, *H. aspersa* et *P. schreberi* ont été exposés à une pollution urbaine.

Les organismes ont été transplantés sur trois sites nancéiens, pour lesquels nous avons accès aux niveaux de NO, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> et O<sub>3</sub>, fournis par le réseau de surveillance de la qualité de l'air (AirLor), mais également à la pluviométrie, fournie par la Communauté Urbaine du Grand Nancy (CUGN). Chacun de ces sites devait également répondre aux critères d'accessibilité, de bonne praticabilité et de limitation du vandalisme. Les trois sites retenus sont succinctement décrits dans le **tableau III-4**.

**Tableau III-4 : Description des stations d'exposition**

Nom de la station	Localisation	Caractéristiques
Brabois (AirLor)	Plateau de Brabois, 1 Allée de Longchamp, Vandœuvre-lès-Nancy	Périurbain Autoroute A31 à quelques centaines de mètres
EDF	32, rue S <sup>t</sup> Léon Nancy	Centre ville Proximité circulation automobile et gare SNCF
Laboratoire des Ponts et Chaussées (LP)	71, rue de la Grande Haie Tomblaine	Périurbain

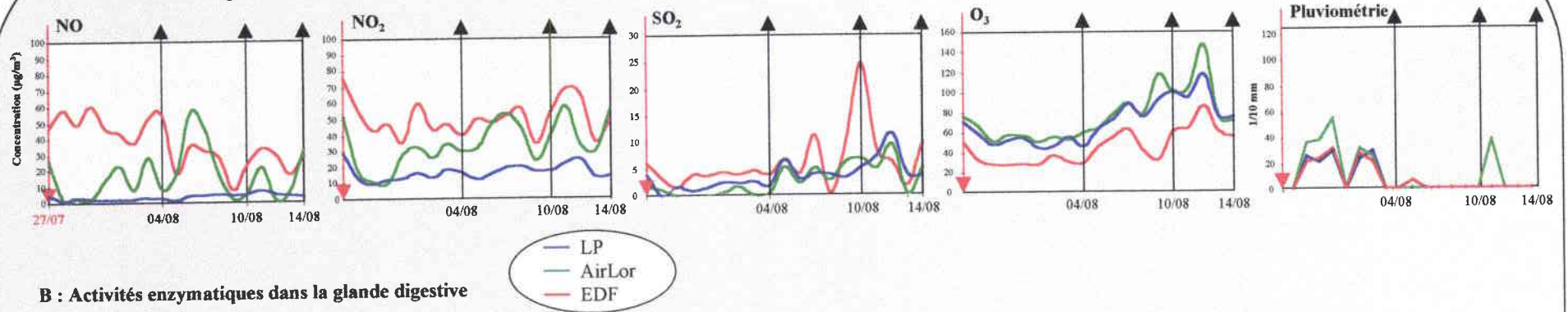
## I- Exposition d'*Helix aspersa* à une atmosphère urbaine

Les escargots ont été implantés en été (**Fig. III-13**) et en automne (**Fig. III-14**) 1998 sur les 3 sites évoqués précédemment : Laboratoire des Ponts et Chaussées (LP), AirLor et EDF. Les temps d'exposition ont varié de 1 à 3 semaines.

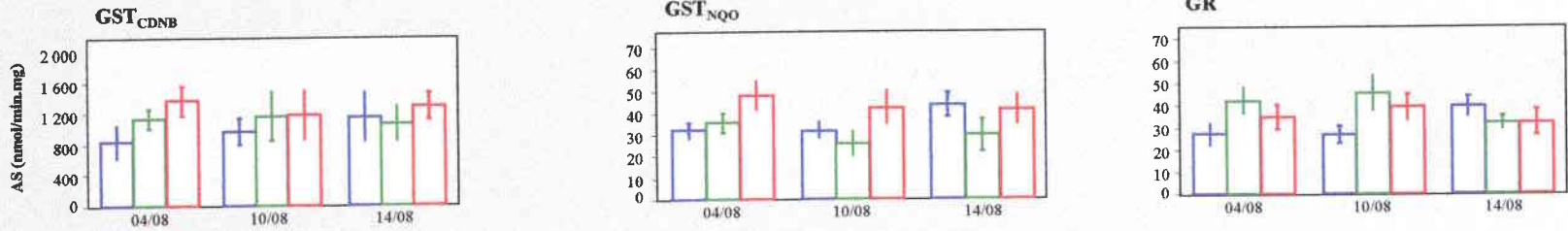
### I-1. Examen des niveaux de pollution sur les trois sites

Sur le site d'EDF les concentrations en NO et NO<sub>2</sub> sont prédominantes avec des valeurs moyennes, calculées sur les deux saisons, respectivement de 40 et 45 µg/m<sup>3</sup> (**Fig. III-13A et 14A**). Bien que ce site présente les niveaux les plus importants, ces derniers se situent toujours sous le seuil de recommandation de l'OMS (150 µg/m<sup>3</sup> pour 24 h). Le NO<sub>2</sub>, à l'inverse du NO, reste relativement stable au cours de l'expérimentation sur ce site. Cette stabilité est nettement plus marquée sur le site du LP qui présente les concentrations moyennes en NO et NO<sub>2</sub> les plus

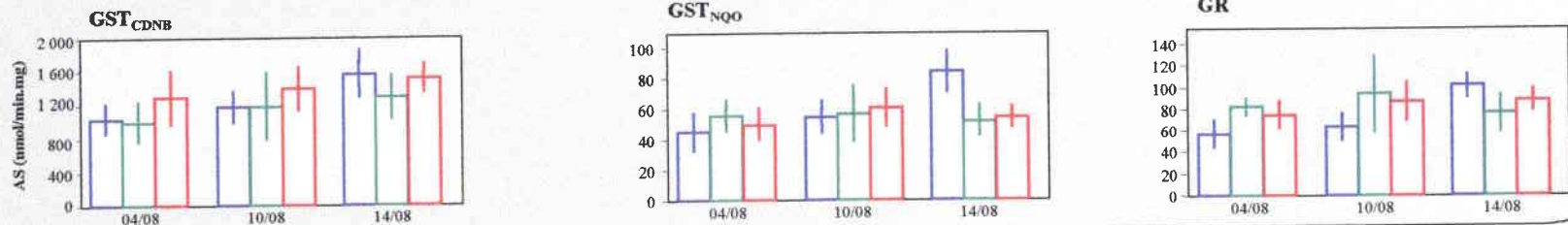
**A : Concentration des polluants durant l'été 1998**



**B : Activités enzymatiques dans la glande digestive**

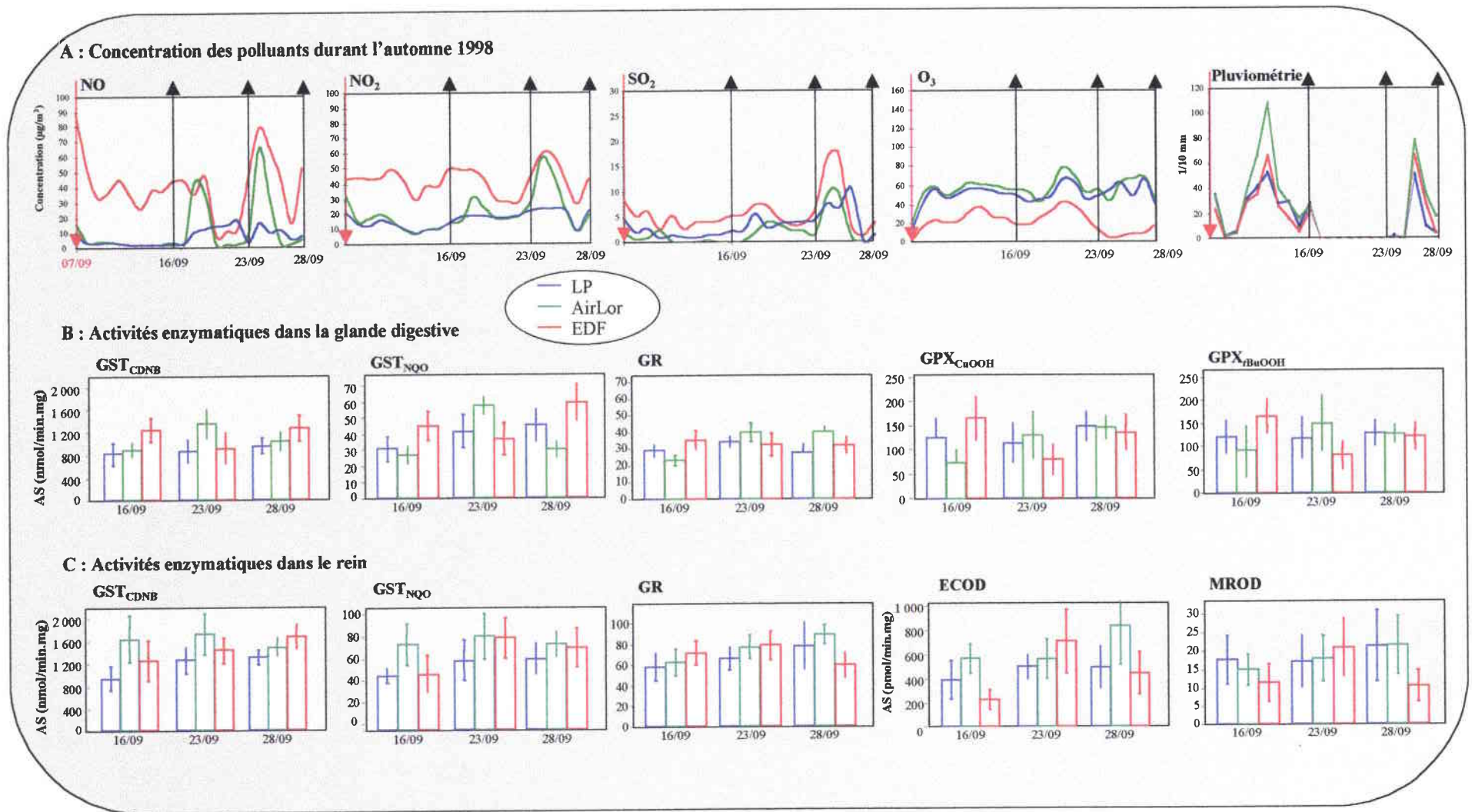


**C : Activités enzymatiques dans le rein**



**Figure III-13 : Variations des niveaux de polluants (A) et des activités enzymatiques dans la glande digestive (B) et le rein (C) d'*Helix aspersa* après différents temps d'exposition à une ambiance urbaine durant l'été 1998.**

Flèche descendante rouge = jour d'implantation, Flèche ascendante noire = jour de prélèvement. Les données correspondent à la moyenne ± l'écart type de 9 échantillons indépendants



**Figure III-I4 : Variations des niveaux de polluants (A) et des activités enzymatiques dans la glande digestive (B) et le rein (C) d'*Helix aspersa* après différents temps d'exposition à une ambiance urbaine durant l'automne 1998.**

Flèche descendante rouge = jour d'implantation, Flèche ascendante noire = jour de prélèvement. Les données correspondent à la moyenne  $\pm$  l'écart type de 9 échantillons indépendants



faibles, 4 et 16  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  respectivement. A l'inverse, ces polluants fluctuent fortement sur le site d'AirLor. Cette fluctuation est très nettement visible en automne (Fig. III-14A, Tab. III-5) où le niveau de base, qui correspond aux concentrations trouvées sur le site du LP, est perturbé par des pics atteignant les niveaux de concentrations du site d'EDF.

**Tableau III-5 : Concentrations des polluants sur les trois sites étudiés en fonction de la période d'exposition**

		NO ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )			NO <sub>2</sub> ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )			SO <sub>2</sub> ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )			O <sub>3</sub> ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )		
		mimi	moy	maxi	mimi	moy	maxi	mimi	moy	maxi	mimi	moy	maxi
LP	Eté	2	3	7	10	16	29	0	3	12	45	63	118
	Automne	2	5	18	7	5	24	1	3	11	12	49	66
AirLor	Eté	1	14	57	11	31	58	0	2	10	51	69	147
	Automne	1	8	65	7	18	56	0	1	10	20	55	78
EDF	Eté	8	42	61	35	50	76	1	5	25	27	39	86
	Automne	7	41	88	27	41	59	1	5	15	2	23	43

mini = concentration minimale, moy = concentration moyenne, maxi = concentration maximale

Des fluctuations sont également visibles pour le SO<sub>2</sub> principalement sur le site d'EDF. En effet, on observe que le niveau de ce polluant présente, à certaines périodes, des pics atteignant 15 à 25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (Tab. III-5). Ces valeurs restent toutefois acceptables au regard des recommandations de l'OMS qui préconisent une valeur seuil de 125  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  pour 24 h. Quel que soit le site considéré, la concentration en SO<sub>2</sub> est nettement inférieure à celles en NO et en NO<sub>2</sub>. Cette différence s'explique par l'origine des polluants. En effet, le NO et le NO<sub>2</sub> sont principalement émis par les véhicules alors que le SO<sub>2</sub> a pour source majeure les industries, absentes dans l'environnement de nos sites d'étude.

A l'inverse, l'ozone est prépondérant sur les sites du LP et d'AirLor, dont la concentration moyenne est d'environ 65  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  en été et de 50  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  en automne, alors que sur le site d'EDF elle n'atteint qu'environ 40 et 20  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  respectivement pour les mêmes périodes (Tab. III-5). Les réactions de production/destruction de l'ozone influencées par les hydrocarbures provenant de la circulation automobile dense peuvent expliquer ces observations. En effet, cette molécule est très instable et elle est facilement et rapidement détruite par des polluants primaires tels que le NO. Cette propriété explique sa prédominance sur les sites du LP et d'AirLor qui sont moins pollués qu'EDF. De plus, l'ozone étant le produit de la photolyse du NO<sub>2</sub>, et sa production nette dépendant, entre autres, du rapport [NO<sub>2</sub>]/[NO] et de l'intensité des rayonnements solaires, il est naturel qu'il prédomine durant les périodes ensoleillées. L'évolution de chaque polluant dépend, en partie, des fluctuations des deux autres (Sillman *et al.*, 1997). L'ozone, comme tous les polluants, subit également l'influence des paramètres climatiques (Sillman, 1999), tels que la



température et l'hygrométrie. Malheureusement, le seul paramètre météorologique disponible sur les trois sites étudiés est la pluviométrie.

Du fait de leur localisation différente sur l'agglomération nancéenne, les trois sites sélectionnés pour notre étude ont des caractéristiques de niveaux de polluants différents. Les HAP, qui font l'objet de notre attention, ne sont pas mesurés en routine. Cette lacune peut heureusement être palliée par les corrélations reportées dans la littérature. En effet, d'après Valério *et al.* (1999), les concentrations en HAP sont corrélées positivement avec celles de NO. Le résultat des corrélations dépend toutefois du ou des HAP considérés. En effet, d'après Brown *et al.* (1996), les HAP peuvent être repartis en quatre groupes :

- Groupe 1 : HAP n'ayant aucune corrélation significative avec le NO, le CO et les hydrocarbures aromatiques non-méthaniques (NMHC). Ce groupe comprend l'anthracène, le fluoranthène, le pyrène, le benzo[*a*]anthracène, le benzo[*k*]fluoranthène et l'anthanthrène.

- Groupe 2 : HAP corrélés faiblement avec les NMHC. Le phénanthrène, le cyclopenta[*cd*]pyrène et le chrysène entrent dans cette catégorie.

- Groupe 3 : HAP corrélés avec les NMHC, le CO et le NO. Ce groupe comprend le benzo[*e*]pyrène, le BaP, le dibenz[*a*]anthracène, le benz[*ghi*]pérylène, l'indéno[*cd*]pyrène, le coronène et le benzo[*c*]phénanthrène.

- Groupe 4 : HAP présentant les mêmes corrélations que ceux du groupe 3, plus une, avec le SO<sub>2</sub>. C'est le benzo[*b*]fluoranthène uniquement.

Inversement, tous les HAP sont corrélés négativement avec l'ozone (Brown *et al.*, 1996, Valério *et al.*, 1999).

Compte tenu de ces informations, mais également de la localisation des sites, nous pouvons en conclure que les concentrations de HAP sont probablement prépondérantes sur le site d'EDF, puis sur le site d'AirLor.

## **I-2. Influence de la pollution urbaine sur le système enzymatique d'*Helix aspersa***

Outre les niveaux de polluants qui diffèrent entre les sites, la durée d'exposition et la saison varient au cours de l'expérimentation. Cette étude vise donc, dans un premier temps, à mettre en évidence l'influence globale du site, de la durée d'exposition et de la saison. Cette étape achevée, nous tenterons d'établir les liens existant entre les paramètres biochimiques explorés et les polluants.

### **I-2.1. La glande digestive**

Les variations enzymatiques observées pour la glande digestive après exposition de *H. aspersa* sont représentées sur les **figures III-13B** et **-14B**. Aucune activité EROD et ECOD

n'a pu être détectée dans les échantillons, l'exposition des escargots à la pollution urbaine en est probablement responsable. En effet, l'exposition de rats, durant un mois, à un mélange d'ozone ( $400 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) et de  $\text{NO}_2$  ( $7640 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) conduit à une diminution de l'activité EROD de 140 % par rapport au contrôle (Takahashi *et al.*, 1989). Ainsi, bien que les niveaux de ces polluants soient nettement plus faibles dans l'atmosphère, ce même phénomène peut se produire dans la glande digestive de *H. aspersa*, diminuant les activités CYP à un niveau difficilement détectable.

### ☞ Influence du site, de la durée et de la saison d'exposition

La mise en évidence des effets de ces trois facteurs (site, durée d'exposition, saison) est réalisée par la technique d'analyse de variance (ANOVA). Cette technique consiste à décomposer la variance totale de la variable étudiée en plusieurs sources de variation, en séparant la variabilité due aux facteurs contrôlés (*i.e.* les facteurs dont nous voulons étudier les effets) de la variabilité résiduelle qui, elle, est imputable à tous les facteurs potentiels ignorés, délibérément ou non. C'est la comparaison de ces composantes de variance par le test de Fisher (ratio F) selon un ordre précis, dicté par le tableau ANOVA, qui permet de tester les effets éventuels des différents facteurs contrôlés ainsi que, le cas échéant, leurs interactions.

**Tableau III-6 : Analyse de variance des paramètres biochimiques mesurés dans la glande digestive d'*H. aspersa* exposé à la pollution urbaine**

Paramètres biochimiques (en log)	Site			Durée d'exposition			Saisons		
	dl	F	P	dl	F	P	dl	F	P
GST <sub>CDNB</sub>	2	12,41	<0,0001*	2	5,50	0,0051*	1	3,31	0,0713
GST <sub>NQO</sub>	2	13,78	<0,0001*	2	5,38	0,0058*	1	0,07	0,7948
GR	2	7,20	0,0011*	2	5,04	0,0079*	1	10,97	0,0012*
GPX <sub>CuOOH</sub>	2	0,64	0,5314	2	4,39	0,0167*			
GPX <sub>BuOOH</sub>	2	0,09	0,9120	2	0,56	0,5722			

dl = degré de liberté, \* pour  $P < 0,05$ .

L'analyse de variance (Tab. III-6) met en évidence l'influence significative ( $P \leq 0,0011$ ) du site sur les activités GST<sub>CDNB</sub>, GST<sub>NQO</sub> et GR. Ces résultats peuvent refléter l'influence des niveaux de polluants ou des conditions météorologiques qui diffèrent selon les sites. Par contre, le site d'implantation ne semble pas avoir d'influence sur les activités GPX.

Les activités GST et GR sont également significativement influencées par la durée d'exposition ( $P < 0,008$ ). Il en est de même pour l'activité GPX<sub>CuOOH</sub> ( $P = 0,0167$ ). L'impact de la variable "durée" est délicat à interpréter car elle peut refléter de nombreux phénomènes. Parmi ces derniers, citons d'une part la pollution, qui peut aussi bien intervenir par l'accumulation de polluants que la présence de pics de pollution, et d'autre part, un changement

physiologique de l'organisme au cours du temps. En effet, pour des raisons de viabilité des organismes aux conditions *in situ*, nous sommes obligés d'implanter sur les sites des escargots âgés de deux mois. Ces derniers étant restés une à trois semaines sur les sites, l'influence du temps d'exposition peut refléter l'impact de la maturation sexuelle sur le niveau de base de certaines activités enzymatiques, que nous avons mis en évidence précédemment.

Les saisons n'affectent de manière statistiquement significative que l'activité GR ( $P = 0,0012$ ). Cette enzyme peut être sensible aux conditions climatiques (température, pluviométrie...) ou à des polluants plus particulièrement générés durant une saison. En effet, la pluviométrie est deux fois plus importante en automne qu'en été et l'ozone prédomine en été (Fig. III-13A et 14A).

L'influence de chaque facteur (site, durée d'exposition et saison) peut en partie refléter l'impact de la pollution, soit du niveau de polluants, soit des pics de polluants ou encore de l'accumulation.

#### ✎ *Etude des liens entre les paramètres biochimiques et les polluants*

Dans une seconde étape, nous avons tenté de mettre en évidence l'influence des facteurs environnementaux (polluants, pluviométrie) sur les paramètres biochimiques. A cet effet, nous avons effectué successivement une analyse en composantes principales, afin de dégager une tendance dans les liens, suivie d'une analyse de régression faisant état d'un modèle de régression affine.

#### Analyse en composantes principales (ACP) : méthode, objectifs, résultats

Cette méthode est basée sur les concepts fondamentaux d'espace des individus et d'espace des caractères. Elle a pour objet la description des données contenues dans un tableau individus-caractères où  $p$  caractères sont mesurés sur  $n$  individus. Quand il n'y a que deux caractères, il est facile de représenter, sur un graphique plan l'ensemble des données. Par contre, dès que le nombre  $p$  de caractères devient supérieur ou égal à quatre, cela devient impossible. Le problème consiste donc à projeter les  $n$  individus dans un espace de dimension réduite *i.e.* un plan. Une représentation graphique d'une telle population après projection dans l'espace réduit présentera forcément des distorsions que l'on cherchera à minimiser. Géométriquement, la représentation est obtenue en projetant les points individus  $e_1, e_2, \dots, e_n$  sur un plan, sur lequel ils deviennent  $f_1, f_2, \dots, f_n$ . Ce plan de projection est choisi de façon à ce que les distances soient en moyenne le mieux conservées. Comme l'opération de projection raccourcit toujours les distances,  $d(f_i ; f_j) \leq$

$d(e_i ; e_j)$ , l'ACP se fixe pour critère de rendre maximale la moyenne des carrés des distances entre les projections  $f_1, f_2, \dots, f_n$ .

Pour déterminer ce plan de projection que l'on appelle le **plan principal**, il suffit de trouver deux droites **F1** et **F2**. Si F1 et F2 sont perpendiculaires, alors  $d^2(f_i, f_j) = d^2(\alpha_i ; \alpha_j) + d^2(\beta_i ; \beta_j)$ , où les  $\alpha_i$  et  $\beta_j$  sont respectivement les projections des  $e_i$  (et des  $f_j$ ) sur F1 et F2. La moyenne des carrés des distances entre les  $f_i$  est donc égale à la moyenne des carrés des distances entre les  $\alpha_i$  plus la moyenne des carrés des distances entre les  $\beta_i$ . La méthode consiste alors à chercher tout d'abord F1, rendant maximale la moyenne des  $d^2(\alpha_i ; \alpha_j)$  puis F2 perpendiculaire à F1, rendant maximale la moyenne des  $d^2(\beta_i ; \beta_j)$ . En projetant  $e_i$  qui avait pour coordonnées initiales  $(x_i^1, x_i^2, \dots, x_i^p)$  sur les axes principaux, de nouvelles coordonnées sont obtenues  $(c_i^1, c_i^2, \dots, c_i^p)$ . De nouveaux caractères  $(c^1, c^2, \dots, c^p)$  sont ainsi construits et appelés les **composantes principales**. Chaque composante  $c^k$ , qui n'est autre que la liste des coordonnées des  $n$  individus sur l'axe  $F^k$ , est une combinaison linéaire des caractères initiaux :  $c^k = u_1^k x^1 + u_2^k x^2 + \dots + u_p^k x^p$ . Les coefficients  $(u_1^k, u_2^k, \dots, u_p^k)$  forment le  $k^{\text{ième}}$  facteur principal  $u^k$ . La meilleure représentation des données au moyen de  $q$  caractères seulement ( $q < p$ ) s'obtient alors en prenant les  $q$  premières composantes principales. Tel est le principe de l'ACP qui est donc une méthode de réduction du nombre de caractères permettant des représentations géométriques des individus et des caractères. Cette réduction n'est possible que si les  $p$  caractères initiaux ne sont pas indépendants et ont des coefficients de corrélation non nuls. L'ACP est donc une méthode factorielle, car la réduction du nombre des caractères ne se fait pas par une simple sélection de certains d'entre eux, mais par la construction de nouveaux caractères synthétiques obtenus en combinant les caractères initiaux. L'ACP permet donc de dégager la structure générale des données et est à ce titre une étape préliminaire à une recherche de corrélations. Le critère global d'appréciation habituellement utilisé est celui du **pourcentage d'inertie totale** expliquée pour les nouveaux facteurs retenus." (Bouroche, Saporta, 1998).

L'examen de la représentation de l'ACP permet donc, de tenter de repérer rapidement les groupes de caractères éventuellement liés entre eux, qu'ils soient corrélés positivement ou négativement. Sa portée se limite à la description des résultats de façon préliminaire.

Ainsi, l'utilisation de l'analyse en composante principale nous permettra d'apprécier les liens éventuels entre les paramètres biochimiques et les données mesurées au cours des expositions (NO, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> et pluviométrie).



L'analyse de variance (ANOVA) ayant mis en évidence l'influence de la durée d'exposition, mais également de la saison, les ACP sont réalisées en fonction de ces deux facteurs (**Fig. III-15**).

Le problème majeur de cette étude réside dans la manière de considérer les polluants. En effet, comment savoir s'il est plus judicieux de considérer les pics de polluants, le niveau moyen des polluants au cours des  $n$  derniers jours d'exposition ou le cumul des polluants. L'option choisie a été de formuler la pollution par le cumul de polluants au cours des phases d'exposition. Ce choix permet de prendre en considération la pollution dans son ensemble au détriment de la prise en compte d'un éventuel effet spécifique des pics de pollution. Le cumul de polluant est calculé par l'aire sous la courbe.

L'examen des représentations des ACP montre que les **activités GST** présentent des liens différents en fonction de la durée d'exposition et de la saison (**Fig. III-15**).

Pour un temps d'exposition d'une semaine en été (**Fig. III-15A1**), les activités GST semblent liées fortement et positivement avec le NO et le NO<sub>2</sub> et négativement avec l'O<sub>3</sub>. Ces liaisons sont également mises en évidence pour une semaine d'exposition en automne (**Fig. III-15B1**).

Pour une durée d'exposition de deux semaines, l'activité GST<sub>CDNB</sub>, tant en été qu'en automne, ne semble corrélée avec aucun polluant (**Fig. III-15A2 et 15B2**). Il en est de même pour l'activité GST<sub>NQO</sub> en automne. Par contre, en été, cette dernière paraît très fortement corrélée avec le SO<sub>2</sub> (positivement) et avec l'O<sub>3</sub> (négativement) (**Fig. III-15A2**).

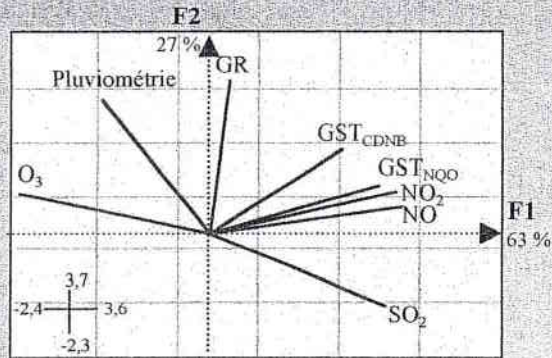
L'ACP représentant l'exposition d'*H. aspersa* durant trois semaines en été, met en évidence l'absence de liaison entre les activités GST et les polluants (**Fig. III-15A3**). Par contre, en automne ces activités semblent corrélées positivement aux NO, NO<sub>2</sub> et au SO<sub>2</sub> (**Fig. III-15B3**).

En été, quel que soit le temps d'exposition considéré, aucune corrélation n'a été mise en évidence pour l'**activité GR**. Il en est de même en automne pour les durées d'implantation de deux et trois semaines (**Fig. III-15B2 et 15B3**). Par contre, pour un temps d'exposition d'une semaine, l'activité GR semble liée positivement avec le SO<sub>2</sub>, le NO<sub>2</sub> et le NO et négativement avec l'O<sub>3</sub> et la pluviométrie (**Fig. III-15B1**).

L'analyse des ACP semble montrer également que les **activités GPX** ne soient liées qu'à l'ozone pour une durée d'exposition de 2 semaines (**Fig. III-15B2**).

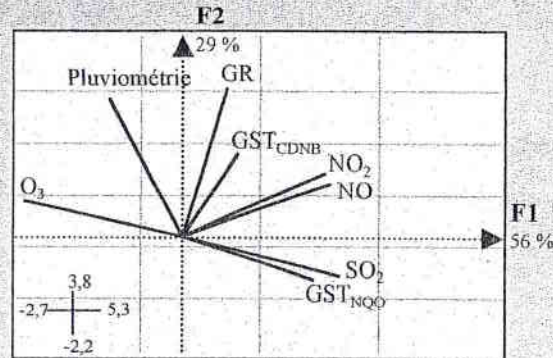
**A : ÉTÉ**

**1 : une semaine**



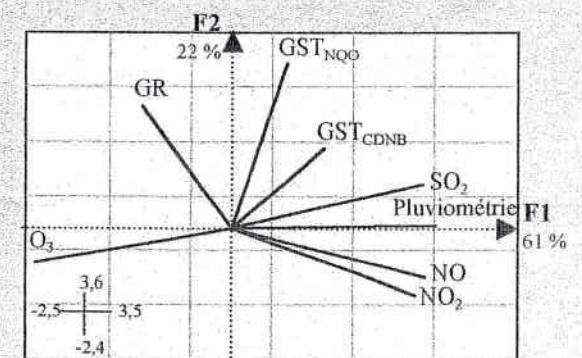
Explique 90 % de l'inertie totale

**2 : deux semaines**



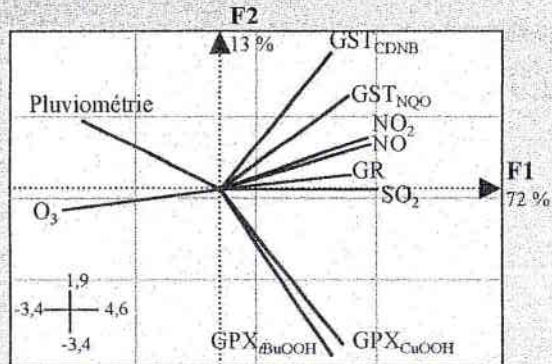
Explique 85 % de l'inertie totale

**3 : trois semaines**

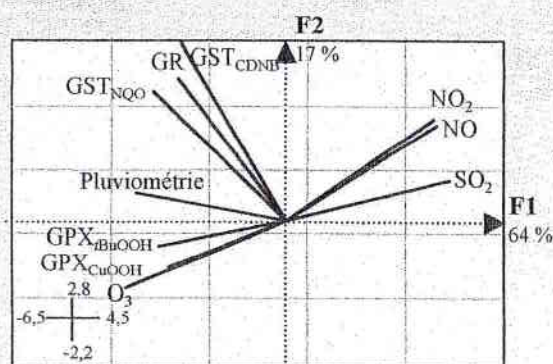


Explique 83 % de l'inertie totale

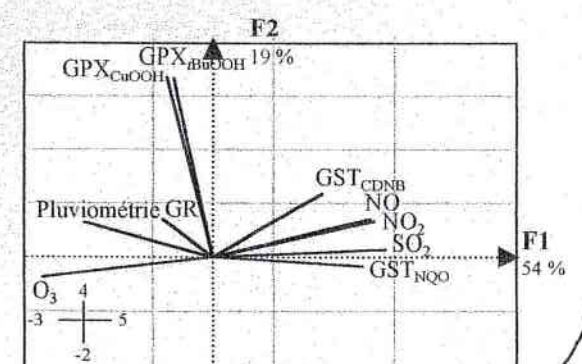
**B : AUTOMNE**



Explique 85 % de l'inertie totale



Explique 81 % de l'inertie totale



Explique 73 % de l'inertie totale

**Figure III-15 : Représentation des variables activités enzymatiques, polluants et pluviométrie dans un plan factoriel des deux 1<sup>ers</sup> axes principaux, pour différentes durées d'exposition et saisons pour la glande digestive d'*H. aspersa***



### Régressions linéaires : méthode, objectifs, résultats

L'analyse des ACP nous permet de dégager certains liens éventuels entre les paramètres biochimiques explorés et les polluants et la pluviométrie. L'objectif des régressions linéaires est nettement plus ambitieux. En effet, par cette étude nous cherchons à identifier les relations mathématiques possibles entre les paramètres biochimiques et les polluants atmosphériques. Nous avons choisi de nous limiter à des fonctions affines. La première étape de cette étude a été d'établir des régressions linéaires simples ( $Y = aX + b$ ) entre chaque paramètre biochimique (Y) et chaque polluant (X), afin de vérifier le fondement des liaisons suspectées par l'analyse des ACP. La seconde étape a été d'établir des régressions linéaires multiples nettement plus réalistes ( $Y = a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_4 + b$ ), considérant qu'il est peu probable que seul un polluant soit à l'origine des modifications des activités enzymatiques observées. Cette phase, à l'inverse de la précédente, n'a été réalisée qu'en fonction de la durée d'exposition. En effet, la durée d'exposition pouvant intégrer l'adaptation des organismes, il nous a semblé nécessaire de réaliser cette étude en fonction de ce facteur. Par contre, nous avons considéré que l'impact de la saison reflète davantage des niveaux de polluants différents que des conditions climatiques différentes, aussi les régressions linéaires multiples ont-elles été réalisées les deux saisons confondues.

La fiabilité de ces modèles, dépendra du coefficient de corrélation R, de la probabilité critique P ainsi que de l'allure générale de la représentation par rapport au nuage de points. Dans le cadre de notre étude, seuls les modèles répondant à un  $R > 50 \%$  (intensité du lien) et une  $P < 0,05$  (degré de fiabilité) seront pris en considération.

Le **tableau III-7** recense les 28 régressions linéaires simples qui sont statistiquement significatives et qui, dans la majorité des cas, tendent à confirmer les liens suspectés par l'analyse des ACP. Toutefois, seules 17 d'entre elles répondent aux critères de validité que nous nous sommes fixés. Elles sont signalées en caractères gras dans le tableau.

Deux régressions linéaires simples nous ont particulièrement interpellés après analyse du **tableau III-7**.

**Tableau III-7 : Analyse de régression linéaire simple ( $Y = aX + b$ ) des paramètres biochimiques (variables Y) mesurés dans la glande digestive d'*H. aspersa*, en fonction des polluants et de la pluviométrie (variables X)**

Variable Y Paramètres biochimiques (log)	Constante (b)	Coefficient (a) de la variable X considéré				Pluviométrie	Paramètres du modèle		
		Cumul de polluants					n	R (%)	P
		NO	NO <sub>2</sub>	SO <sub>2</sub>	O <sub>3</sub>				
① GST <sub>CDNB1-Eté</sub>	+ 2,849		+ 6,5			21	56	0,0001	
① GST <sub>CDNB1-Eté</sub>	+ 2,943	+ 4,7				21	51	0,0003	
① GST <sub>CDNB1-Automne</sub>	+ 2,908	+ 4,2				21	47	0,0005	
① GST <sub>CDNB1-Automne</sub>	+ 2,636		+ 6,1			21	46	0,0005	
GST <sub>CDNB1-Automne</sub>	+ 3,21			- 3,7		21	43	0,0013	
GST <sub>CDNB3-Automne</sub>	+ 3,007	+ 1,6				21	36	0,0050	
GST <sub>CDNB3-Automne</sub>	+ 2,952		+ 2,1			21	37	0,0045	
① GST <sub>NQO1-Eté</sub>	+ 1,497	+ 4,3				21	69	<0,0001	
① GST <sub>NQO1-Eté</sub>	+ 1,418		+ 5,7			21	69	<0,0001	
GST <sub>NQO1-Eté</sub>	+ 1,881			- 6,6		21	55	0,0001	
GST <sub>NQO1-Eté</sub>	+ 1,486			+ 46,7		21	41	0,0018	
GST <sub>NQO1-Automne</sub>	+ 1,370			+ 5,6		21	52	0,0002	
GST <sub>NQO1-Automne</sub>	+ 1,809			- 7,3		21	51	0,0003	
① GST <sub>NQO1-Automne</sub>	+ 1,425	+ 4,9				21	48	0,0005	
① GST <sub>NQO1-Automne</sub>	+ 1,343		+ 7,1			21	46	0,0007	
② GST <sub>NQO2-Eté</sub>	+ 1,368			+ 39,7		21	60	<0,0001	
GST <sub>NQO2-Eté</sub>	+ 1,952			- 4,3		21	59	<0,0001	
GST <sub>NQO2-Automne</sub>	+ 1,170				+ 276,3	21	46	0,0007	
GST <sub>NQO3-Automne</sub>	+ 2,184				- 319,3	21	59	<0,0001	
② GST <sub>NQO3-Automne</sub>	+ 1,351			+ 32,5		21	54	<0,0001	
GST <sub>NQO3-Automne</sub>	+ 1,926			- 3,2		21	54	0,0001	
GR <sub>1-Automne</sub>	+ 1,829				- 131,3	21	58	0,0001	
GR <sub>1-Automne</sub>	+ 1,350			+ 41,5		21	57	0,0001	
GR <sub>1-Automne</sub>	+ 1,665			- 5,1		21	52	0,0002	
GR <sub>1-Automne</sub>	+ 1,397	+ 3,3				21	43	0,0013	
GPX <sub>CuOOH1-Automne</sub>	+ 2,825				- 273,0	21	58	0,0001	
GPX <sub>CuOOH1-Automne</sub>	+ 1,842			+ 81,0		21	50	0,0003	
GPX <sub>BuOOH1-Automne</sub>	+ 2,680				- 220,0	21	40	0,0001	

Indice : durée et saison d'exposition. Gras : corrélations statistiquement significatives ( $P < 0,05$ ) avec une intensité du lien supérieure à 50 % ( $R > 50$ ). Coefficients de corrélations des variables explicatives à multiplier par  $10^{-4}$ .

La première régression linéaire (notée ①) est le lien apparent entre les activités GST et les NO<sub>x</sub> (NO et NO<sub>2</sub>). Cette liaison avait déjà été signalée lors de l'analyse des représentations des ACP. Elle est confirmée par l'obtention de régressions linéaires significatives ( $P < 0,0004$ ), après une

semaine d'exposition tant en automne qu'en été et aussi bien pour l'activité GST<sub>CDNB</sub> que pour l'activité GST<sub>NQO</sub>.

Il semblerait donc, que l'augmentation de la concentration des NO<sub>x</sub> soit concomitante à celle des activités GST. Cette corrélation statistiquement significative n'implique pas un mécanisme de causalité, l'augmentation des NO<sub>x</sub> n'étant pas nécessairement responsable de celle des activités GST. La littérature ayant établi des corrélations entre certains HAP et les NO<sub>x</sub>, il peut être conclu qu'il est possible que les HAP soient responsables de l'augmentation des activités GST. De même, l'augmentation de la concentration des NO<sub>x</sub> dans l'atmosphère peut accroître la génération de composés plus réactifs, tels que les nitro-HAP. Ces derniers peuvent être à l'origine de l'augmentation des activités GST. Ces hypothèses semblent d'autant plus envisageables que l'exposition de rats aux NO<sub>x</sub> occasionne non pas une augmentation, mais une diminution des activités GST dans le poumon et le foie (Pool *et al.*, 1988 ; Sagai *et al.*, 1984). Il faut toutefois noter que ces expérimentations ont été réalisées dans des conditions strictement contrôlées et avec des concentrations en NO<sub>x</sub> très importantes (> 700 µg/m<sup>3</sup>).

Une seconde régression linéaire (notée ②) présente également un intérêt particulier. Celle-ci est établie entre l'activité GST<sub>NQO</sub> et le SO<sub>2</sub> après deux semaines d'exposition en été, mais également après trois semaines d'exposition en automne (R > 50 %, P < 0,0001). Dans le premier cas, il semblerait que cette liaison puisse s'expliquer par l'augmentation brutale de la concentration de SO<sub>2</sub> sur le site EDF (Fig. III-13A). Dans le second cas, ce lien entre l'activité GST<sub>NQO</sub> et le SO<sub>2</sub> coïncide, sur chaque site, avec l'apparition de pics de SO<sub>2</sub> quelques jours avant le prélèvement (Fig. III-14A-VIII). Ces deux corrélations laissent supposer une sensibilité de l'activité GST<sub>NQO</sub> au SO<sub>2</sub> ou à un autre polluant présent en même temps que le SO<sub>2</sub>. Cette deuxième hypothèse semble être la plus probable. En effet, il est rapporté dans la littérature, qu'après pénétration dans l'organisme, le SO<sub>2</sub> se lie rapidement au glutathion pour former le S-sulfo-glutathion (GSSO<sub>3</sub>) qui est un inhibiteur compétitif des GST (Keller *et al.*, 1989). Le traitement de rats par différentes concentrations en SO<sub>2</sub> a pour conséquence une diminution des activités GST (Pool *et al.*, 1988, Langley-Evans *et al.*, 1996). Les polluants générés en même temps que le SO<sub>2</sub> sont donc, probablement, à l'origine de l'augmentation de l'activité GST<sub>NQO</sub>. Il semble donc que l'activité GST<sub>NQO</sub> de la glande digestive d'*H. aspersa* réagit extrêmement rapidement au SO<sub>2</sub> ou à un polluant concomitant.

Ces régressions linéaires, réalisées en fonction du temps et de la saison, ne permettent pas de dégager des corrélations globales. Afin de s'approcher de cet objectif, des régressions linéaires simples et multiples sont réalisées uniquement en fonction du temps d'exposition (Tab III-8).

La majorité des corrélations statistiquement significatives présentent au minimum deux variables explicatives. Cette observation n'est pas étonnante car il est effectivement peu probable qu'un seul polluant soit à l'origine des modifications enzymatiques observées. De plus, il est clairement démontré par la littérature que, non seulement ces variables (pollution, hygrométrie) sont corrélées entre elles, mais qu'en plus elles interagissent.

**Tableau III-8 : Analyse de régression linéaire simple et multiple ( $Y = a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_nX_n + b$ ) des paramètres biochimiques (variable Y) mesurés dans la glande digestive d'*H. aspersa*, en fonction des polluants et de la pluviométrie (variables X)**

Variable Y Paramètres biochimiques (log)	Constante (b)	Coefficients (a) des variables X considérées					Paramètres du modèle		
		Cumul de polluants				Pluvio- métrie	n	R (%)	P
		NO	NO <sub>2</sub>	SO <sub>2</sub>	O <sub>3</sub>				
GST <sub>CDNBI</sub>	+ 2,968	+ 7,8 0,0054		- 46,3 <0,0001			42	57	<0,0001
GST <sub>CDNBI</sub>	+2,839		+ 6,5 <0,0001				42	53	<0,0001
GST <sub>CDNBI</sub>	+ 2,925	+ 4,5 <0,0001					42	48	<0,0001
GST <sub>CDNB2</sub>	+ 3,964	-33,3 0,0607	+ 35,7 0,0157	- 92,6 0,0038	- 13,3 0,0654		42	31	0,0064
GST <sub>NOO1</sub>	- 0,507	+ 11,4 0,0001		+ 186,6 0,0092	+ 32,9 0,0066		42	60	<0,0001
GST <sub>NOO1</sub>	+1,373		+ 6,6 <0,0001				42	54	<0,0001
GST <sub>NOO1</sub>	+ 1,459	+ 4,7 <0,0001					42	52	<0,0001
GST <sub>NOO2</sub>	+ 4,182	- 72,5 <0,0001	+ 68,5 <0,0001	- 157,0 <0,0001	- 34,0 <0,0001		42	56	<0,0001
GST <sub>NOO3</sub>	+ 1,445		- 2,8 0,0008	+ 44,9 <0,0001			42	59	<0,0001
GST <sub>NOO3</sub>	+ 1,413			+ 27,2 <0,0001			42	46	<0,0001
GR <sub>1</sub>	- 1,377	+ 324,9 <0,0001	- 333,2 <0,0001		+ 144,2 <0,0001	- 305,5 <0,0001	42	68	<0,0001
GR <sub>1</sub>	- 8,766	+ 216,9 <0,0001	- 190,4 <0,0001	+ 779,1 <0,0001	+ 219,3 <0,0001		42	65	<0,0001
GR <sub>2</sub>	- 2,358	+ 4,6 <0,0001		+ 205,5 0,0186	+ 24,4 0,0031	+ 555,2 0,0052	42	57	<0,0001
GR <sub>2</sub>	+ 0,803	+ 5,7 <0,0001			+5,5 <0,0001	+ 99,1 0,0015	42	50	<0,0001
GR <sub>3</sub>	- 10,295	+ 81,7 <0,0001	- 67,3 <0,0001	+ 456,4 <0,0001	+ 72,4 <0,0001	+ 968,5 <0,0001	42	60	<0,0001

Indice : durée et saison d'exposition. Gras : corrélations statistiquement significatives ( $P < 0,05$ ) avec une intensité du lien supérieure à 50 % ( $R > 50$ ). Coefficients de corrélations des variables explicatives à multiplier par  $10^{-4}$ .

Quel que soit le temps d'exposition considéré, l'activité GR présente les relations linéaires les plus complexes. De plus, c'est la seule activité enzymatique qui soit liée à la pluviométrie. Seules les activités GST, pour des temps d'exposition d'une semaine, présentent des corrélations

linéaires simples. En effet, les activités GST<sub>CDNB</sub> et GST<sub>NQO</sub> sont positivement corrélées au NO<sub>2</sub> (R=53 %, P < 0,0001). Pour des temps d'exposition supérieurs, aucune corrélation simple et significative n'est établie.

### I-2.2. Le rein

La même démarche que celle utilisée pour la glande digestive est employée pour le rein. Aucune activité EROD n'étant détectable, nous avons décidé de mesurer les variations de l'activité MROD, cette dernière représente le CYP1A2 chez l'homme (Rendic *et al.*, 1997).

#### ⌘ Influence du site, de la durée et de la saison d'exposition

Exception faite de l'activité GST<sub>NQO</sub>, le site d'implantation affecte significativement (P < 0,05) toutes les activités enzymatiques explorées (Tab. III-9). Les principaux paramètres variant entre les sites étant le niveau de pollution et, à un degré moindre, les conditions météorologiques, ces premiers sont *a priori* responsables de l'influence du site sur les différentes activités enzymatiques.

Ces études statistiques mettent en évidence l'influence globale du site, du temps d'exposition ou de la saison, qui reflète certainement l'impact des polluants.

L'influence de la durée d'exposition se limite aux activités GST<sub>CDNB</sub> et MROD (P < 0,006), et celle de la saison aux activités GST<sub>NQO</sub> et GR (P < 0,0009).

**Tableau III-9 : Analyse de variance des paramètres biochimiques mesurés dans le rein d'*H. aspersa* exposé à la pollution urbaine**

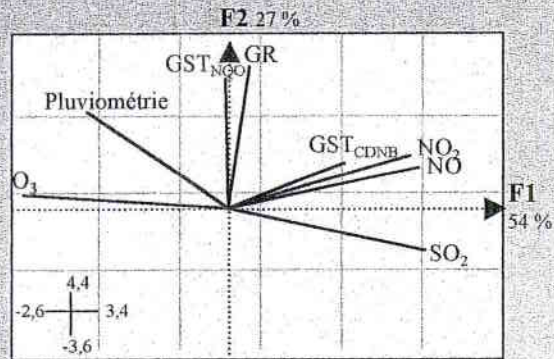
Paramètres biochimiques (en log)	Site			Durée			Saisons		
	dl	F	P	dl	F	P	dl	F	P
GST <sub>CDNB</sub>	2	4,73	0,0105*	2	7,19	0,0011*	1	0,50	0,4810
GST <sub>NQO</sub>	2	1,82	0,1671	2	1,40	0,2494	1	11,85	0,0008*
GR	2	3,32	0,0396*	2	1,25	0,2890	1	24,21	<0,0001*
ECOD	2	3,18	0,0493*	2	2,88	0,0647	nd	nd	
MROD	2	5,98	0,0044*	2	5,78	0,0052*	nd	nd	

dl = degré de liberté, \* pour P < 0,05



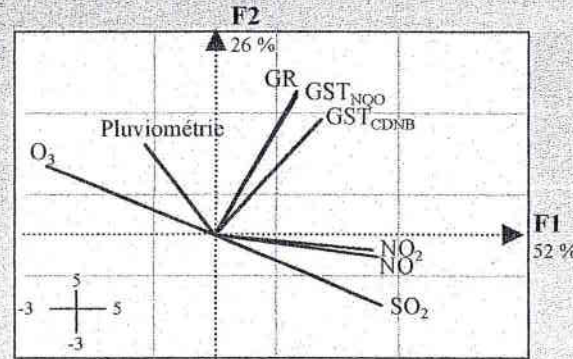
**A : ÉTÉ**

**1 : une semaine**



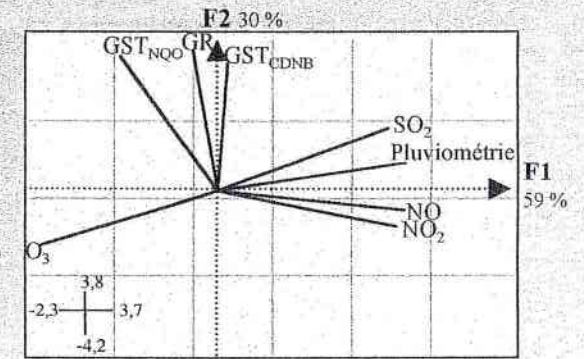
Explique 81 % de l'inertie totale

**2 : deux semaines**



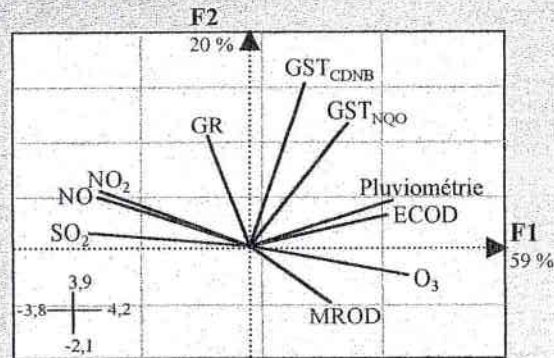
Explique 78 % de l'inertie totale

**3 : trois semaines**

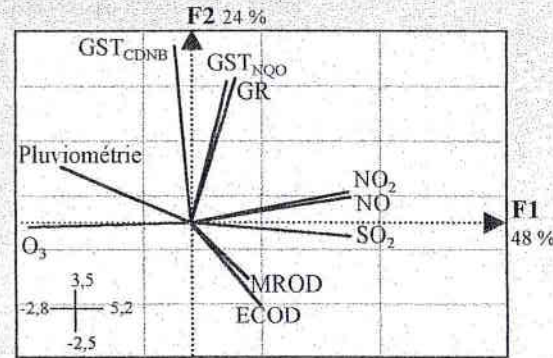


Explique 89 % de l'inertie totale

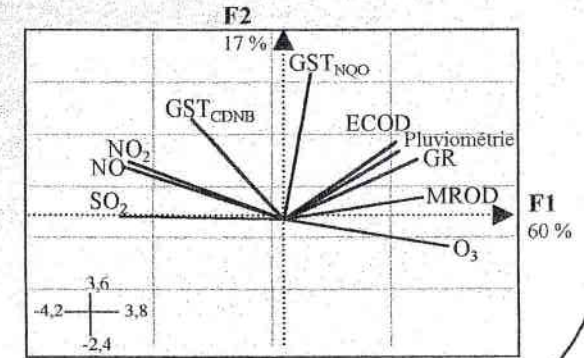
**B : AUTOMNE**



Explique 79 % de l'inertie totale



Explique 72 % de l'inertie totale



Explique 77 % de l'inertie totale

**Figure III-16 : Représentation des variables activités enzymatiques, polluants et pluviométries dans un plan factoriel des deux 1ers axes principaux, en fonction de la durée et de la saison d'exposition pour le rein d'*H. aspersa***



### *Etude des liens entre les paramètres biochimiques et les polluants*

Après avoir mis en évidence l'influence probable des polluants sur les paramètres biochimiques explorés, nous allons tenter d'établir les liens entre ces derniers et les variables (NO, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> et pluviométrie).

#### Analyse en composantes principales (ACP) : résultats

Après examen des représentations des ACP en été, la plupart des activités enzymatiques (GR, GST<sub>NOO</sub> et GST<sub>CDNB</sub>) ne semblent fortement corrélées avec aucune des variables considérées (**Fig. III-16A**). Seule, l'activité GST<sub>CDNB</sub> mesurée après une semaine d'exposition, n'entre pas dans cette catégorie. En effet, l'activité GST<sub>CDNB</sub> semble liée positivement au NO<sub>2</sub>, au NO et au SO<sub>2</sub>.

En automne, quelle que soit la durée d'exposition, les activités GST ne semblent pas présenter de liaison avec un polluant ou la pluviométrie (**Fig. III-16B**).

Par contre, pour une durée d'exposition de trois semaines, l'activité GR paraît être corrélée positivement avec la pluviométrie et l'ozone et négativement aux NO<sub>x</sub> et au SO<sub>2</sub> (**Fig. III-16B3**). Pour des durées d'exposition plus courtes, aucune liaison n'est visualisable par l'examen des ACP.

Les activités CYP sont nettement plus influencées par le temps d'exposition que les activités associées au glutathion. Cette observation corrobore les résultats obtenus par l'ANOVA (**Tab. III-9**). Pour une durée d'exposition d'une semaine, l'activité MROD semble corrélée négativement avec le NO, le NO<sub>2</sub> et le SO<sub>2</sub> et positivement avec la pluviométrie et l'O<sub>3</sub> (**Fig. III-16B1**). Pour un temps d'exposition de deux semaines, aucune liaison n'est observable (**Fig. III-16B2**). Par contre, pour trois semaines d'exposition, les mêmes corrélations que celles obtenues pour une semaine semblent effectives (**Fig. III-16B3**). L'activité ECOD semble présenter les mêmes liens que l'activité MROD.

#### Régressions linéaires : résultats

L'analyse des ACP, nous a permis de dégager quelques liaisons éventuelles qui nécessitent confirmation.

Le **tableau III-10** regroupe 13 régressions linéaires simples statistiquement significatives. Ces dernières concernent uniquement la saison automne. En effet, aucune régression linéaire simple, statistiquement significative, n'a été trouvée pour la saison été. La plupart des corrélations

signalées par l'ACP sont confirmées par les régressions ( $P < 0,05$ ), mais ont une intensité de lien inférieure aux 50 % que nous nous sommes fixés.

Seules trois régressions linéaires simples répondent aux critères de validité que nous nous sommes imposés :  $R > 50\%$  et  $P < 0,05$ . Elles concernent toutes l'activité ECOD mesurée après une semaine d'exposition en automne. En effet, pour une exposition d'une semaine, l'activité ECOD est significativement corrélée avec le NO ( $P = 0,0005$ , corrélation négative) et avec la pluviométrie et l'ozone ( $P = 0,0001$ , corrélation positive) (**Tab. III-10**). La corrélation entre l'activité ECOD et l'ozone est en accord avec les observations réalisées chez les rats, où une exposition de 7, 14 ou 30 jours à 400 ou 8 000  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  d'ozone augmente l'activité ECOD jusqu'à 253 % par rapport à celle du témoin (Takahashi *et al.*, 1985, 1989). Toutefois, les concentrations employées au cours de ces expérimentations sont largement supérieures à celles trouvées dans l'agglomération nancéienne. Ainsi, les liaisons observées dans notre étude peuvent être le reflet de polluants générés parallèlement au NO ou à l'ozone.

**Tableau III-10 : Analyse de régression linéaire simple ( $Y = b + aX$ ) des paramètres biochimiques (variables Y) mesurés dans le rein d'*H. aspersa*, en fonction des polluants et de la pluviométrie (variables X)**

Variable Y Paramètres biochimiques (log)	Constante (b)	Coefficient (a) de la variable X considéré					Paramètres du modèle		
		Cumul de polluants				Pluvio métrie	n	R (%)	P
		NO	NO <sub>2</sub>	SO <sub>2</sub>	O <sub>3</sub>				
GST <sub>NQO1</sub> -Automne	+ 1,308					+ 157,0	21	45	0,0009
GR <sub>3</sub> -Automne	+ 1,957			- 2,1			21	44	0,0010
GR <sub>3</sub> -Automne	+ 1,587				+ 2,1		21	41	0,0018
GR <sub>3</sub> -Automne	+ 1,875	- 2,0					21	33	0,0062
GR <sub>3</sub> -Automne	+ 1,937		- 2,5				21	31	0,0088
MROD <sub>3</sub> -Automne	+ 0,738				+ 4,3		21	45	0,0013
MROD <sub>3</sub> -Automne	+ 1,341	- 4,5					21	44	0,0015
MROD <sub>3</sub> -Automne	+ 1492		- 5,9				21	43	0,0017
MROD <sub>3</sub> -Automne	+ 1,458			- 38,6			21	41	0,0022
ECOD <sub>1</sub> -Automne	+ 2,052					+	21	57	0,0001
						12,12			
ECOD <sub>1</sub> -Automne	+ 1,717					+ 289,3	21	56	0,0001
ECOD <sub>1</sub> -Automne	+ 2,590	- 8,0					21	50	0,0005
ECOD <sub>1</sub> -Automne	+ 2,764		- 11,4				21	47	0,0009

Indice : durée et saison d'exposition. Gras : corrélations statistiquement significatives ( $P < 0,05$ ) avec une intensité du lien supérieure à 50 % ( $R > 50$ ). Coefficients de corrélations des variables explicatives à multiplier par  $10^{-4}$ .

Considérant qu'il est peu probable qu'un seul polluant soit à l'origine des variations des paramètres biochimiques, et considérant que de nombreux polluants sont fortement liés, il nous a semblé nécessaire de chercher des corrélations plus représentatives.

Seuls douze modèles statistiquement significatifs ont été trouvés (Tab. III-11), et deux seulement présentent une intensité de lien supérieure à 50 %. Ces deux équations intègrent la totalité des variables explicatives suivies, et montrent nettement l'influence de nombreux paramètres sur les paramètres biochimiques étudiés.

**Tableau III-11 : Analyse de régression linéaire multiple ( $Y = a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_nX_n + b$ ) des paramètres biochimiques (variable Y) mesurés dans le rein d'*H. aspersa*, en fonction des polluants et de la pluviométrie (variables X)**

Variable Y Paramètres biochimiques (log)	Constante (b)	Coefficients (a) des variables X considérées					Paramètres du modèle		
		Cumul de polluants				Pluvio- métrie	n	R (%)	P
		NO	NO <sub>2</sub>	SO <sub>2</sub>	O <sub>3</sub>				
GST <sub>CDNB1</sub>	+ 13,892	- 209,2 0,0041	+ 189,1 0,0053	- 903,4 0,0002	- 228,7 0,0008		42	37	0,0015
GST <sub>CDNB2</sub>	+ 4,226	- 26,7 0,0563	+ 26,8 0,0451	- 79,2 0,0065	- 14,2 0,0156		42	20	0,0719
GST <sub>CDNB3</sub>	- 3,276	+ 44,7 0,0013	- 37,2 0,0013	+ 256,7 0,0011	+ 38,9 0,0013	+ 516,6 0,0021	42	34	0,0071
GST <sub>NQO1</sub>	+ 5,240	- 8,6 0,0106		- 384,9 <0,0001	- 57,7 0,0002		42	40	0,0002
GST <sub>NQO2</sub>	+ 2,672			- 59,1 0,0039	- 7,6 0,0009		42	25	0,0033
GST <sub>NQO3</sub>	<b>-7,032</b>	<b>+ 66,9</b> <b>0,0002</b>	<b>- 58,5</b> <b>0,0001</b>	<b>+ 355,9</b> <b>0,0004</b>	<b>+ 54,8</b> <b>0,0004</b>	<b>+ 747,8</b> <b>0,0005</b>	<b>42</b>	<b>50</b>	<b>0,0001</b>
GR <sub>1</sub>	+ 1,835	+ 6,1 0,0001		- 56,4 0,0021			42	32	0,0005
GR <sub>1</sub>	+ 5,694	+ 186,6 0,0620	- 207,9 0,0703	- 554,5 0,0452		- 298,4 0,0637	42	38	0,0010
GR <sub>2</sub>	+ 1,489	- 11,3 0,0014	+ 14,9 0,0003				42	36	0,0002
GR <sub>2</sub>	+ 1,564	- 8,3 0,0512	+ 13,1 0,0025	- 15,8 0,2215			42	38	0,0003
GR <sub>3</sub>	<b>- 7,869</b>	<b>+ 52,7</b> <b>0,0025</b>	<b>- 44,4</b> <b>0,0023</b>	<b>+ 392,1</b> <b>0,0001</b>	<b>+ 56,8</b> <b>0,0003</b>	<b>+ 826,8</b> <b>0,0002</b>	<b>42</b>	<b>61</b>	<b>&lt;0,0001</b>
GR <sub>3</sub>	- 0,496			101,3 0,0003	+ 11,6 0,0001	+ 214,9 0,0033	42	49	<0,0001

En indice, la durée d'exposition. En gras, les corrélations statistiquement significatives ( $P < 0,05$ ) et dont l'intensité du lien est supérieure à 50 % ( $R > 50$ ). Les coefficients des variables explicatives sont à multiplier par  $10^{-4}$ .

### I-3. Conclusion

Ces expérimentations mettent en évidence l'influence de nombreux paramètres (pollution, pluviométrie) sur les activités enzymatiques explorées. En effet, aucune régression linéaire simple n'a pu être établie pour la globalité de l'étude. L'influence concomitante des nombreux polluants atmosphériques en est certainement la principale cause. Le choix de travailler avec des cumuls de polluants, qui tend à atténuer l'influence des pics et ne prend pas en considération l'adaptation possible des organismes, peut également expliquer l'absence de corrélations simples.

Néanmoins, dans des cas bien précis, des corrélations simples sont établies. Dans le cas de la glande digestive, deux sont particulièrement intéressantes à retenir :

① La première, entre les activités GST et les NO<sub>x</sub> qui montre que ces activités réagissent après une seule semaine d'exposition. Cette piste doit être approfondie, car elle semble intéressante pour la validation de biomarqueurs de la pollution atmosphérique par les HAP.

② La seconde établie entre l'activité GST<sub>NQO</sub> et le SO<sub>2</sub>, semble souligner l'importance des pics de pollution, donc la nécessité de les prendre en compte et de ne pas considérer la pollution uniquement en terme de cumul.

Il est donc nécessaire, à l'aide d'expertises complémentaires, d'identifier la principale variable affectant les activités enzymatiques, si toutefois elle existe. Il serait également fondamental de prendre en considération la diversité des voies de contamination, à savoir l'atmosphère, comme dans cette étude, mais également le sol et la végétation. De même, il reste à déterminer le temps de réponse et la sensibilité des biomarqueurs potentiels. Deux types d'étude seraient alors intéressants à mener. L'une consisterait à implanter des organismes et à les prélever à différents intervalles après un pic de pollution. L'autre consisterait simplement à exposer les organismes durant une semaine, et ceci pendant plusieurs mois, en faisant chevaucher les périodes d'exposition.

Deux activités enzymatiques semblent plus particulièrement intéressantes à prospecter au regard des résultats obtenus, l'une s'attachant à étudier principalement les activités GST dans la glande digestive et l'autre les activités CYP dans le rein.

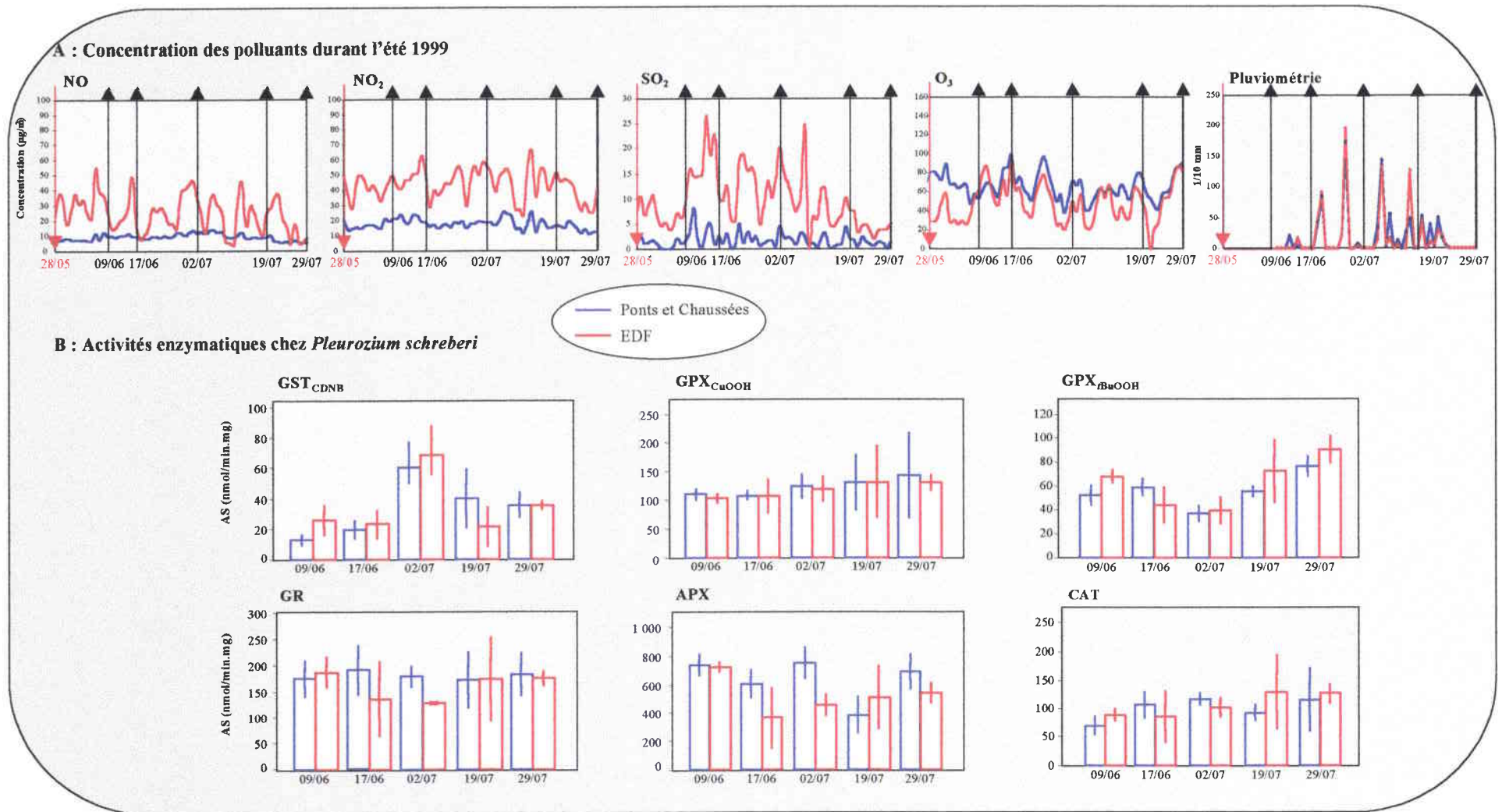
## **II- Exposition de *Pleurozium schreberi* à une atmosphère urbaine**

*P. schreberi* a été transplantée sur le site du LP et d'EDF au cours de l'été 1999. Cinq prélèvements ont été réalisés entre le 28 mai et le 29 juillet 1999 (Fig. III-17). Pour des raisons techniques, seuls deux sites ont fait l'objet de notre étude. De plus, il a malheureusement été impossible de réaliser cette expérimentation durant les mêmes périodes que celles de *H. aspersa*.

### **II-1. Examen des niveaux de pollution sur les trois sites**

Les concentrations en NO et en NO<sub>2</sub> sont très stables et faibles sur le site du LP, en moyenne 10 et 20 µg/m<sup>3</sup> respectivement. Par contre, sur le site d'EDF, elles fluctuent entre 5 et 55 µg/m<sup>3</sup> et 20 et 65 µg/m<sup>3</sup> pour le NO et le NO<sub>2</sub> respectivement (Fig. III-17A). Il en est de même pour le SO<sub>2</sub>. Ce dernier polluant oscille entre 0 et 7 µg/m<sup>3</sup> sur le site du LP et entre 0 et





**Figure III-17 : Variations des niveaux de polluants (A) et des activités enzymatiques (B) chez *P. schreberi* après différents temps d'exposition à une atmosphère urbaine durant l'été 1999**

Flèche descendante rouge = jour d'implantation, Flèche ascendante noire = jour de prélèvement.

25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  sur le site d'EDF. A l'inverse, l'ozone présente approximativement le même profil sur les deux sites. Toutefois, la concentration moyenne de ce polluant est plus importante sur le site du LP que sur le site d'EDF, respectivement de 70 et 50  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ .

Les deux sites retenus sont donc très intéressants car ils diffèrent principalement par leur niveau en  $\text{NO}_x$  et  $\text{SO}_2$ , polluants corrélés à certains HAP. La pluviométrie est approximativement identique sur les deux sites d'étude, mais fluctue au cours de l'expérimentation.

## II-2. Influence de la pollution urbaine sur le système enzymatique de *P. schreberi*

La démarche suivie pour *P. schreberi* est la même que celle adoptée pour *H. aspersa*. Les variations des activités enzymatiques explorées au cours des expositions sont représentées sur la figure III-17B.

### ☞ Influence du site et de la durée d'exposition

Pour une même durée d'exposition, les niveaux des activités enzymatiques sont identiques dans la majorité des cas pour les sites du LP et d'EDF et ceci malgré des niveaux de polluants fort différents (Fig. III-17B). L'analyse de variance met en évidence l'influence du site uniquement pour l'activité APX (Tab. III-12). Cette observation semble indiquer que seule l'APX est influencée par les niveaux de pollution ou les conditions climatiques différentes pour les deux sites étudiés.

**Tableau III-12 : Analyse de variances des paramètres biochimiques mesurés après exposition de *P. schreberi* à une pollution urbaine**

Paramètres biochimiques	Site			Durée d'exposition		
	dl	F	P	dl	F	P
GST <sub>CDNB</sub>	1	2,96	0,0983	4	12,08	<0,0001*
GR	1	1,87	0,1845	4	0,48	0,7532
GPX <sub>CuOOH</sub>	1	0,06	0,8053	4	0,57	0,6838
GPX <sub>tBuOOH</sub>	1	0,91	0,3490	4	9,87	0,0001*
CAT	1	2,95	0,0988	4	0,17	0,9509
APX	1	10,68	0,0033*	4	3,77	0,0162*

dl = degré de liberté, \* pour  $P < 0,05$

Par contre, la durée d'exposition a une influence significative sur les activités GST<sub>CDNB</sub> ( $P < 0,0001$ ), GPX<sub>tBuOOH</sub> ( $P = 0,0001$ ) et APX ( $P = 0,0162$ ). Cette influence est nettement visible sur les représentations graphiques (Fig. III-17B), et ceci particulièrement pour l'activité GST<sub>CDNB</sub>. En effet, cette activité est augmentée sur les deux sites d'un facteur 3,5 le 2 juillet. A cette même date, l'activité GPX<sub>tBuOOH</sub> est diminuée sur les sites LP et EDF d'un même



facteur. Ces variations se produisent donc simultanément et à un même degré sur les sites LP et EDF et ceci pour différentes activités enzymatiques. Ces modifications ne semblent pas correspondre à un événement particulier en terme de pollution (**Fig. III-17B**). Ainsi, l'influence de la durée d'exposition reflète probablement l'impact de conditions climatiques, telles que les cycles hydratation/réhydratation, qui peuvent être observés par le suivi de la pluviométrie (**Fig. III-17A**). En effet, des expérimentations en laboratoire rapportées dans la littérature montrent que ces cycles affectent le système du glutathion de nombreuses plantes dont les mousses. Par exemple, les activités GR, GPX et GST ainsi que le glutathion oxydé, augmentent au cours de la déshydratation lente de la mousse *Tortula ruralis*. La réhydratation de cette dernière engendre une diminution progressive des activités GR, GPX et GST et du GSSG. Par contre, si *T. ruralis* a subi une déshydratation rapide qui ne modifie pas le système du glutathion, la réhydratation conduit alors à l'augmentation des activités qui, après avoir atteint un maximum, diminuent progressivement (Dhindsa, 1987 et 1991). Ces modifications engendrées par les cycles déshydratation/réhydratation dépendent également de l'intensité lumineuse. Effectivement, la déshydratation de *T. ruralis* à l'obscurité ou sous faible luminosité ne modifie pas l'activité APX. Par contre, si elle est réalisée sous forte luminosité, alors l'activité APX est significativement diminuée. De plus, il y a une distinction à faire entre les mousses tolérant la sécheresse telles que *T. ruralis* et les autres, telles que *Dicranella palustris*, différence qui est vraisemblablement fonction de leurs capacités de défense contre les ERO. En effet, alors qu'après déshydratation l'activité peroxydase est augmentée chez *T. ruralis*, elle est diminuée chez *D. palustris* (Seel et al. 1992). Il semble donc, que les variations observées chez *P. schreberi* soient la conséquence de modifications climatiques qui couplent les phénomènes de déshydratation/réhydratation et d'intensité lumineuse.

#### ✎ **Etude des liens entre les paramètres biochimiques et les polluants**

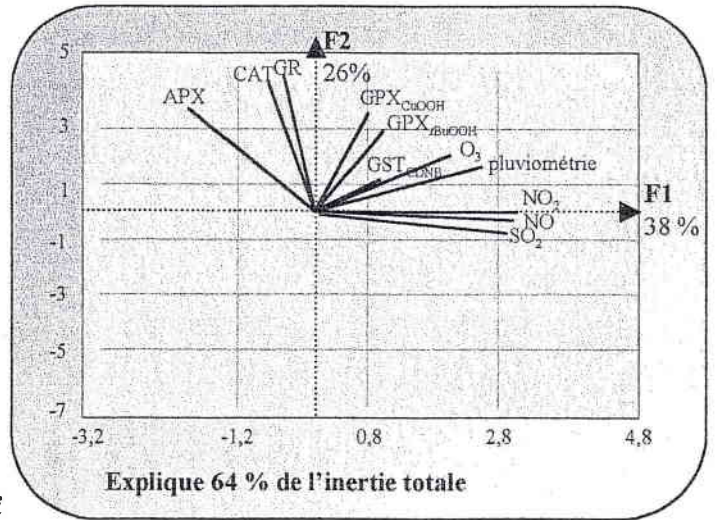
Bien que l'analyse de variance semble montrer l'influence prépondérante des conditions climatiques sur les paramètres biochimiques explorés chez *P. schreberi*, la recherche de liens peut toutefois être intéressante à réaliser.

A l'inverse des escargots, les ACP ainsi que les régressions linéaires sont réalisées immédiatement sur l'ensemble de l'étude. En effet, le nombre d'échantillons étant limité à trois par site et par durée d'exposition (pour des raisons techniques), ce nombre est logiquement insuffisant pour réaliser une étude statistique en fonction des durées d'exposition.

**Analyse en composantes principales**

L'examen de l'ACP ne permet pas de dégager des corrélations entre les activités enzymatiques explorées et les variables explicatives (NO, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> et pluviométrie).

**Figure III-18 : Représentation des variables activités, polluants et pluviométrie dans un plan factoriel des deux 1<sup>ers</sup> axes principaux, chez *P. schreberi***



**Régressions linéaires**

Quatre régressions linéaires statistiquement significatives ( $P < 0,05$ ) et d'intensité de lien supérieure à 50 % ont été obtenues (Tab. III-13). Deux de ces équations concernent l'activité GST<sub>CDNB</sub> et les deux restantes à l'activité GPX<sub>FuOOH</sub>. Ces relations comportent au minimum deux variables explicatives, et trois d'entre elles intègrent la variable pluviométrie. Cette observation tend donc à confirmer l'influence de l'hydratation de *P. schreberi* sur ces paramètres biochimiques, influence déjà soupçonnée au cours de l'analyse de variance (ANOVA).

**Tableau III-13 : Analyse de régression linéaire ( $Y = a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_nX_n + b$ ) des paramètres biochimiques (variable Y) mesurés chez *P. schreberi* en fonction de la pollution et de la pluviométrie (variables X)**

Variable Y	Coefficients (a) des variables X considérées					Paramètres du modèle			
	Paramètres biochimiques (log)	Constante (b)	Cumul de polluants				n	R (%)	P
		NO	NO <sub>2</sub>	SO <sub>2</sub>	O <sub>3</sub>	Pluviométrie			
GST <sub>CDNB</sub>	- 1,537	- 6,6	+ 16,6			+ 470,0	29	73	<0,0001
		0,0011	0,0099			<0,0001			
GST <sub>CDNB</sub>	- 1,596	- 1,7				+ 356,1	29	65	<0,0001
		0,0005				<0,0001			
GPX <sub>FuOOH</sub>	+ 1,628	+ 12,0	- 38,4	- 1,3		- 109,6	29	58	0,0002
		0,0004	0,0008	0,0692		0,0885			
GPX <sub>FuOOH</sub>	+ 1,633	+ 13,3	- 43,9	- 2,0			29	52	0,0002
		0,0001	0,0002	0,0010					

Indice : durée et saison d'exposition. Gras : corrélations statistiquement significatives ( $P < 0,05$ ) avec une intensité du lien supérieure à 50 % ( $R > 50$ ). Coefficients de corrélations des variables explicatives à multiplier par 10<sup>-4</sup>.

Il semble donc que l'influence des conditions climatiques sur les activités enzymatiques de *P. schreberi* ne soit pas négligeable. Elles peuvent représenter l'un des principaux paramètres responsables des variations enzymatiques observées.

### III- Récapitulatif

#### ↳ *Helix aspersa*

- ➊ Dans la glande digestive, après 1 semaine d'exposition :  $\log(\text{GST}) = f(\text{NO}_x)$

=> réponse rapide

=> piste à approfondir pour la validation de biomarqueurs de la pollution

atmosphérique par les HAP

- ➋ Dans la glande digestive :  $\log(\text{GST}_{\text{NQO}}) = f(\text{SO}_2)$

=> semble correspondre à l'apparition de pics de  $\text{SO}_2$  sur les sites

- ➌ Dans le rein poursuivre les investigations sur l'activité ECOD

#### ↳ *Pleurozium schreberi*

- ➊ Aucune influence de la pollution urbaine sur les paramètres biochimiques étudiés chez

*P. schreberi*.

- ➋ Influence probable des cycles déshydratation/réhydratation sur l'activité  $\text{GST}_{\text{CDNB}}$  et

$\text{GPX}_{\text{tBuOOH}}$

*~ Conclusions & Perspectives ~*

Ce travail avait pour ambition d'apprécier la valeur potentielle, en tant que biomarqueurs de la pollution atmosphérique par les HAP, de quelques systèmes de biotransformation des xénobiotiques. Les enzymes associées au cytochrome P450 et au glutathion ont été explorées chez un gastéropode terrestre, *H. aspersa*, et les enzymes associées au glutathion et antioxydantes l'ont été chez une mousse, *P. schreberi*. Dans cette optique, après avoir maîtrisé les principaux paramètres responsables d'une variabilité contrôlable chez les organismes étudiés, les expérimentations se sont attachées à déterminer l'impact d'une pollution atmosphérique de complexité croissante sur les activités enzymatiques. Le travail expérimental s'est déroulé en trois étapes :

- ① **Exposition contrôlée** à une atmosphère saturée en NAP durant trois jours,
- ② **Exposition semi-contrôlée** pendant huit heures à une atmosphère de travail à composition prédominante en plusieurs HAP,
- ③ **Exposition non-contrôlée** d'une à plusieurs semaines à une pollution urbaine.

### **Helix aspersa**

L'exploration préliminaire du métabolisme des xénobiotiques a mis en évidence des activités CYP prépondérantes, d'un facteur 3 pour EROD et 10 pour ECOD, dans le rein par rapport à la glande digestive qui est habituellement reconnue comme l'organe de détoxification par excellence. Les activités enzymatiques associées au glutathion (GST, GR et GPX) présente une distribution plus homogène entre les trois organes explorés : rein (R), glande digestive (GD) et toit de la cavité palléale (TCP). Cette répartition, principalement pour les activités CYP, laissait présager une susceptibilité aux polluants différente suivant l'organe considéré, qui s'est effectivement confirmée lors des expositions contrôlées et semi-contrôlées, dont les résultats sont synthétisés dans le **tableau IV-1**, et non-contrôlées.

Dans le TCP, seule l'activité EROD a été augmentée après 8 heures d'exposition en conditions semi-contrôlées. Cette même exposition occasionne l'augmentation des activités ECOD et EROD dans le rein et dans la glande digestive. Ces activités enzymatiques sont également augmentées dans la glande digestive après 3 jours d'exposition au naphthalène. Par contre, dans le rein, elles sont diminuées. La génération d'un stress oxydant dans cet organe après 3 jours d'exposition au NAP peut être à l'origine de cette diminution. La différence de réponse des activités CYP dans le rein entre l'exposition en conditions contrôlées et semi-contrôlées est certainement due à des temps d'exposition différents, mais également à une pollution fort différente, qui génère probablement un stress oxydant plus ou moins important.



L'activité GST<sub>CDNB</sub> est augmentée uniquement dans la glande digestive après exposition en conditions semi-contrôlées.

Les activités GPX présentent différentes variations qui s'avèrent extrêmement délicates à interpréter au regard des variations des niveaux de base de ces dernières. Il semblerait effectivement qu'elles soient particulièrement sensibles à des paramètres non-maîtrisés.

**Tableau IV-1 : Récapitulatif des variations des paramètres biochimiques mesurés dans le toit de la cavité palléale (TCP), le rein (R) et la glande digestive (GD) d'*Helix aspersa* après exposition au naphthalène ou à une ambiance de travail principalement chargée en HAP**

		Conditions expérimentales			
		Contrôlées	Semi-Contrôlées		
			NAP	Traceur de HAP = BaP (ng/m <sup>3</sup> )	
		310	510	840	
<b>ECOD</b>					
	TCP	nd	nd	nd	nd
	R	∇ (1,2)	↗ (1,4)	↗ (1,6)	↗ (1,2)
	GD	↗ (1,5)	↗ (1,4)	-	↗ (1,3)
<b>EROD</b>					
	TCP	-	↗ (1,5)	↗ (1,6)	↗ (1,3)
	R	∇ (1,4)	↗ (1,4)	↗ (1,6)	↗ (1,2)
	GD	↗ (1,3)	↗ (1,5)	-	↗ (1,3)
<b>GST<sub>CDNB</sub></b>					
	TCP	-	-	-	-
	R	-	-	↗ (1,5)	-
	GD	-	↗ (1,5)	↗ (1,6)	↗ (1,5)
<b>GST<sub>NQO</sub></b>					
	TCP	-	-	-	-
	R	-	-	-	-
	GD	-	-	-	-
<b>GPX<sub>CuOOH</sub></b>					
	TCP	-	-	-	-
	R	-	-	↗ (3,0)	-
	GD	∇ (1,5)	↗ (3,9)	↗ (3,8)	↗ (2,3)
<b>GPX<sub>tBuOOH</sub></b>					
	TCP	-	-	-	-
	R	-	-	-	-
	GD	∇ (1,5)	↗ (4,0)	↗ (3,2)	↗ (2,1)
<b>GR</b>					
	TCP	-	-	-	-
	R	-	↗ (3,6)	↗ (3,8)	↗ (3,3)
	GD	-	-	-	-

↗ ou ∇ : augmentation ou diminution statistiquement significative (P < 0,05),  
 - : absence de variation, nd : non détecté, (n) : facteur de variation

L'exposition d'*H. aspersa* à une pollution urbaine a permis de mettre en évidence différentes corrélations, dont la plupart intègrent plusieurs variables (NO, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, pluviométrie). Ces résultats sont logiques, car au regard de la complexité des mécanismes de régulation mais également de la pollution, il serait utopique de penser qu'un seul polluant soit responsable des variations des activités enzymatiques observées. Toutefois, il est envisageable que dans certaines circonstances un polluant ou une famille de polluants soit l'origine principale de ces observations. Dans la glande digestive, deux corrélations sont particulièrement intéressantes à retenir. La première relie les activités GST et les NO<sub>x</sub>, après une semaine

d'exposition d'*H. aspersa*. Celle-ci semble indiquer que l'augmentation des activités GST soit concomitante à celle des NO<sub>x</sub>. Or, d'après la littérature, ces polluants auraient davantage tendance à diminuer les activités GST. Ainsi, il est possible que des polluants présents en même temps que les NO<sub>x</sub>, tels que les HAP, soient responsables de l'augmentation des activités GST. La seconde, établie entre l'activité GST<sub>NQO</sub> et le SO<sub>2</sub>, semble être le reflet d'une augmentation brutale en SO<sub>2</sub> ou d'un polluant concomitant. La deuxième hypothèse paraît être la plus probable, considérant que le SO<sub>2</sub> est connu pour sa capacité à diminuer l'activité GST.

Le toit de la cavité palléale s'avère être un organe présentant peu d'intérêt pour l'identification de biomarqueurs de la pollution atmosphérique pour les HAP. En effet, compte tenu du faible niveau de base des activités CYP dans cet organe, les niveaux constitutifs des activités associées au glutathion paraissent être suffisants pour éliminer les métabolites produits sans nécessiter d'induction. Quel que soit l'organe considéré, l'influence de paramètres non maîtrisés sur les activités GPX étant importante, ces dernières ne pourront pas être employées en tant que biomarqueurs. A l'inverse, les activités GST de la glande digestive et les activités CYP du rein sont les activités enzymatiques les plus prometteuses pour une utilisation ultérieure en tant que biomarqueurs de la pollution atmosphérique par les HAP. De plus, *H. aspersa* est extrêmement pratique car l'élevage en laboratoire est facile à mettre en place et, les organismes et les extraits enzymatiques peuvent être conservés congelés.

### **Pleurozium schreberi**

Aucune variation statistiquement significative des activités enzymatiques explorées (GST, GPX, GR, APX et CAT) chez *P. schreberi* n'a été mise en évidence après exposition de cette dernière à une atmosphère saturée en NAP ou composée principalement de HAP (Tab. IV-2). Cette absence de variation peut s'expliquer par l'adsorption des HAP sur l'organisme ou l'accumulation de ces derniers sans biotransformation.

Par contre, une augmentation de l'activité GST<sub>CDNB</sub> et une diminution de l'activité GPX<sub>BuOOH</sub> ont été observées après exposition de *P. schreberi* à une pollution urbaine. Toutefois, ces dernières semblent être davantage imputables aux conditions climatiques et plus particulièrement aux cycles déshydratation/hydratation qu'à la pollution.

**Tableau IV-2 : Récapitulatif des variations des paramètres biochimiques chez *Pleurozium schreberi* après exposition au naphthalène ou à une ambiance de travail chargée en HAP**

	Conditions expérimentales			
	Contrôlées	Semi-Contrôlées		
	NAP	Traceur de HAP = BaP (ng/m <sup>3</sup> )		
		310	510	840
GST <sub>CDNB</sub>	-	-	-	-
GST <sub>DCNB</sub>	-	-	-	-
GPX <sub>CuOOH</sub>	-	-	-	-
GPX <sub>tBuOOH</sub>	-	-	-	↗ (2,7)
GR	-	-	-	-
APX	-	-	-	-
CAT	-	-	-	-

↗ : augmentation statistiquement significative ( $P < 0,05$ ), - : absence de variation, (n) : facteur de variation.

Il semble donc que les activités enzymatiques explorées chez *P. schreberi* ne présentent pas d'intérêt en tant que biomarqueurs de pollution atmosphérique par les HAP. De plus, l'utilisation de cet organisme est extrêmement contraignante. Non seulement il est nécessaire de prélever la mousse sur un site "témoin" puis de l'acclimater en laboratoire en vue d'expérimentations ultérieures, mais de plus, l'exposition achevée, l'extraction et les mesures d'activité doivent être réalisées dans la même journée. Ces contraintes techniques sont un frein incontestable pour des études à plus grande échelle.

### Perspectives

Les pistes dégagées par ces trois études demandent à être confirmées pour une validation future des paramètres biochimiques encourageants, en tant que biomarqueurs de la pollution atmosphérique par les HAP. Dans cet objectif de nombreuses expérimentations seraient intéressantes à réaliser, tant en milieu urbain, pour la validation, qu'en laboratoire, pour une meilleure compréhension des mécanismes réactionnels.

#### ① Expérimentations en milieu urbain :

- Implanter les escargots durant une semaine sur les trois sites déjà étudiés, ceci pendant plusieurs mois et avec des périodes d'implantations qui se juxtaposent. Une semaine d'exposition semble être un compromis adéquat pour, d'une part observer une réponse des paramètres explorés, et d'autre part faciliter l'établissement de corrélations entre les activités enzymatiques et les polluants. La juxtaposition des périodes d'exposition peut également faciliter l'interprétation des résultats et tenter d'estimer la rapidité de réponse.

- Prélever des escargots à différents temps après un pic de pollution, afin d'évaluer : la rapidité de réponse, le principal polluant engendrant les variations observées et l'adaptation des organismes.

- Transplanter parallèlement aux escargots des bioaccumulateurs de HAP (chou frisé par exemple) afin d'apprécier la concentration de ces derniers sur les différents sites. Cette information faciliterait l'établissement de corrélations entre les activités enzymatiques et les HAP.

② **Expérimentations en laboratoire** : le problème majeur des expérimentations en laboratoire est de créer, sans danger pour l'expérimentateur, une atmosphère polluée avec un ou plusieurs HAP. Si un tel système d'exposition est réalisable, de nombreuses études sont alors envisageables. L'une d'entre elles pourrait consister à exposer les organismes de quelques heures à quelques jours à l'un des HAP prédominants dans la phase gazeuse puis dans la phase particulaire d'une ambiance urbaine et finalement au mélange des deux. Les concentrations de ces derniers devront s'approcher au mieux de celles trouvées en milieu urbain. Une autre expérimentation consisterait à coupler un HAP avec un polluant tel que le NO ou l'ozone, afin de déterminer les interactions possibles.

Pour une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires mis en œuvre lors d'une telle pollution, l'exploration d'autres paramètres biochimiques semble être indispensable. Au regard des résultats obtenus, il serait entre autres enrichissant de suivre en parallèle un marqueur du stress oxydant (par exemple le malondialdéhyde) et le rapport GSH/GSSG. De même, des investigations sur un plan plus fondamental pourraient permettre une meilleure analyse des résultats par un éclaircissement des mécanismes d'induction mis en jeu. Ces dernières pourraient consister par exemple en la mise en évidence du récepteur Ah.

~ *Références Bibliographiques* ~

- Aceto A, Di Ilio C, Lo Bello M, Bucciarelli T, Angelucci S, Federici G (1990) Differential activity of human, rat, mouse and bacteria glutathione transferase isoenzymes towards 4-nitroquinoline 1-oxide. *Carcinogenesis* 11:2267-2269.
- Adang AEP, Meyer DJ, Brussee J, Van der Gen A, Ketterer B, Mulder GJ (1989) Interaction of rat glutathione S-transferases 7-7 and 8-8 with gamma-glutamyl- or glycyl-modified glutathione analogues. *Biochem J* 264:759-764.
- Ade P, Banchelli Soldaini MG, Castelli MG, Chiesara E, Clementi F, Fanelli E, Funari E, Ignesti G, Marabini A, Orunesu M, Palmero S, Pirisino R, Ramundo Orlando A, Rizzi R, Silano V, Viarengo A, Vitozzi L (1982) Comparative biochemical and morphological characterizations of microsomal preparations from rat, quail, trout, mussel and *Daphnia magna*. In Hietanen E, Laitinen M, Hanninen O (eds.), *Cytochrome P-450 biochemistry, biophysics, and environmental implications*. Elsevier Biomedical Press B.V., 387-390.
- Amiard JC, Caquet T, Lagadic L (1997) Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramdade F (eds.), *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*. Lavoisier Tec&Doc, Paris, Londres, New York, XXI-XXX.
- Angerer J, Mannschreck C, Gündel J (1997) Biological monitoring and biochemical effect monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int Arch Occup Environ Health* 70:365-377.
- Asada K (1997) The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging in plants. In: Scandalios JG (eds.), *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. CSHL Press, 715-735.
- Atkinson R, Arey J, Zielinska B, Aschmann SM (1987) Kinetics and products of the gas-phase reactions of OH radicals and N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> with naphthalene and biphenyl. *Environ Sci Technol* 21:1014-1022.
- Atzori L, Bannenberg G, Corrigan AM, Moldeus P, Ryrfeldt A (1992) Sulfur dioxide-induced bronchoconstriction in the isolated and perfused guinea pig lung. *Respiration* 56:16-21.
- Awasthi YC, Singh SV, Ahmad H, Moller PC (1987) Immunocytochemical evidence for the expression of GST1, GST2, and GST3 gene loci for glutathione S-transferase in human lung. *Lung* 165:323-332.
- Baek SO, Field RA, Goldstone ME, Kirk PW, Lester JN, Perry R (1991) A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, fates and behavior. *Water Air Soil Pollut* 60:279-300.
- Bakke J, Struble C, Gustafsson J, Gustafsson B (1985) Catabolism of premercapturic acid pathway metabolites of naphthalene to naphthols and methyl-thio containing metabolites in rat. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 82:668-671.
- Balabaskaran S, Chew S, Segaran M (1986) Studies on glutathione-S-transferase in molluscs. *Comp Biochem Physiol* 85B:183-192.
- Barrefors G (1997) Monitoring of benzene, toluene and *p*-xylene in urban air with differential optical absorption spectroscopy technique. *Sci Tot Environ* 196:99-104.
- Bartosz G (1997) Oxidative stress in plants. *Acta Physiol Plant* 19:47-64.
- Baturo W, Lagadic L (1996) Benzo[a]pyrene hydroxylase and glutathione S-transferase activities as biomarkers in *Lymnaea palustris* (Mollusca, gastropoda) exposed to atrazine and hexachlorobenzene in freshwater mesocosms. *Environ Toxicol Chem* 15:771-781.
- Baum EJ (1978) Occurrence and surveillance of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Gelboin HV et Ts'O POP (eds) *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer Vol. 1 Environment, Chemistry, and Metabolism*, Academic Press, New York, San Francisco, London, 45-70.
- Baumard P, Budzinski H, Garrigue P, Narbonne JF, Burgeot T, Michel X, Bellocq J (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus* sp.) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Mar Environ Res* 47:415-439.
- Baumard P, Budzinski H, Michon Q, Garrigue P, Burgeot T, Bellocq J (1998) Origin and bioavailability to PAHs in the mediterranean sea from mussel and sediment records. *Estuarine Coastal Shelf Sci* 47:77-90.
- Beeby A (1985) The role of *Helix aspersa* as major herbivore in the transfer of lead through a polluted ecosystem. *J Appl Ecol* 22:267-275.
- Beers RF, Sizer IW (1952) A spectrophotometric for measuring the breakdown of hydrogen peroxyde by catalase. *J Biol Chem* 195:133-140.
- Behymer TD, Hites RA (1985) Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on simulated atmospheric particulates. *Environ Sci Technol* 19:1004-1006.
- Behymer TD, Hites RA (1988) Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on Fly ash. *Environ Sci Technol* 22:1311-1319.
- Berger B, Dallinger R (1989) Accumulation of cadmium and copper by the terrestrial snail *Arianta arbustorum* L.: kinetics and budgets. *Oecologia* 79:60-65.
- Beyer J, Sandvik M, Skare JU, Egaas E, Hylland K, Waagbo R, Goksoyr A (1997) Time- and dose-dependent biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) exposed to benzo[a]pyrene, 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl (PCB-156) and cadmium. *Biomarkers* 2:35-44.
- Bielwaski W, Joy KW (1986) Reduced and oxidized glutathione and glutathione reductase activity in tissues of *Pisum sativum*. *Planta* 169:267-272.



- Biermann HW, Leod HM, Atkinson R, Winer AM, Pitts JN (1985) Kinetics of the gas-phase reactions of the hydroxyl radicals with naphthalene, phenanthrene, and anthracene. *Environ Sci Technol* 19:244-248.
- Bigger CAH, Cheh A, Latif F, Fishel R, Canella KA, Stafford GA, Yagi H, Jerina DM, Dipple A (1994) DNA strand breaks induced by configurationally isomeric hydrocarbon diol epoxides. *Drug Metab Revs* 26:287-299.
- Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Eastal S, Jermin LS, Schulte GK, Danley DE, Hoth LR, Griffor MC, Kamath AV, Rosner MH, Chrnyk BA, Perregaux DE, Gabel CA, Geoghegan KF, Pandit J (2000) Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem* 275:24798-24806.
- Bouroche JM, Saporta S (1998) L'analyse en composantes principales. *In*: Bourouche JM, Saporta S (eds), *Que sais-je ? L'analyse des données*, Presse Universitaire de France, Paris, 17-48.
- Brasitus TA, Dudeja PK, Dahiya R, Halline A (1987) Dexamethasone-induced alterations in lipid composition and fluidity of rat peroximal small-intestinal brush-border membranes. *Biochem J* 248:455-461.
- Brown DJ, Van Beneden RJ, Clark GC (1995) Identification of two binding proteins for halogenated aromatic hydrocarbons in the hard-shell clam *Mercenaria mercenaria*. *Arch Biochem Biophys* 319:217-224.
- Brown JR, Field RA, Goldstone ME, Lester JN, Perry R (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbons in central London air during 1991 and 1992. *Sci Total Environ* 177:73-84.
- Bruinsma OSL, Moulijn JA (1988) The pyrolytic formation of polycyclic aromatic hydrocarbons from benzene, toluene, ethylbenzene, styrene, phenylacetylene and *n*-decane in relation to fossil fuel combustion. *Fuel Process Technol* 18:213-236.
- Bryson PD (1989) Carbon monoxide Chap 19. *In*: Bryson PD (eds) *Comprehensive review in toxicology*, Second edition, Aspen Publication, Rockville, Maryland, Royal Tunbridge Wells, 223-239.
- Buckpitt A, Chang AM, Weir A, Van Winkle L, Duan X, Philpot R, Plopper C (1995) Relationship of cytochrome P450 activity to Clara cell cytotoxicity. IV. Metabolism of naphthalene and naphthalene oxide in microdissected airways from mice, rats, and hamsters. *Mol Pharmacol* 47:74-81.
- Bunce NJ, Liu L, Zhu J, Lane DA (1997) Reaction of naphthalene and its derivatives with hydroxyl radicals in the gas phase. *Environ Sci Technol* 31:2252-2259.
- Buonarati M, Jones AD, Buckpitt A (1990) *In vivo* metabolism of isomeric naphthalene oxide glutathione conjugates. *Drug Metab Dispos* 18:183-189.
- Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, Halpert J, Haaparanta T, Mayer RT (1985) Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem Pharmacol* 34:3337-3345.
- Butkiewick D, Grzybowska E, Phillips DH, Hemminki K, Chorazy M (2000) Polymorphisms of the GSTP1 and GSTM1 genes and PAH-DNA adducts in human mononuclear white blood cells. *Environ Mol Mutagen* 35:99-105.
- Carlberg I, Mannervik B (1975) Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 250:5475-5480.
- Carmagnol F, Sinet PM, Jerome H (1983) Selenium-dependent and non-selenium-dependent glutathione peroxidases in human tissue extracts. *Biochim Biophys Acta* 759:49-57.
- Chaloupka K, Santostefano M, Goldfarb IS, Liu G, Myers MJ, Tsyroly IB, Gelboin HV, Krishnan V, Safe S (1994) Aryl hydrocarbon (Ah) receptor-independent induction of Cyp1a2 gene expression by acenaphthylene and related compounds in B6C3F1 mice. *Carcinogenesis* 15:2835-2840.
- Chaloupka K, Steinberg M, Santostefano M, Rodriguez LV, Goldstein L, Safe S (1995) Induction of *Cyp1a-1* and *Cyp1a-2* gene expression by a reconstituted mixture of polynuclear aromatic hydrocarbons in B6C3F1 mice. *Chem Biol Interact* 96:207-221.
- Chandlee JM, Tsafaris AS, Scandalios JG (1983) Purification and partial characterization of three genetically defined catalases of maize. *Plant Sci Lett* 29:117-131.
- Chapple C (1998) Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 49:311-343.
- Chiarolini A, Donato MT, Gomez-Lechon MJ, Pala M, Valerio F, Ferro M (1997) Comparison of rat hepatocyte and differentiated hepatome cell line cultures as bio-indicators of CYP1A1 inducers in urban air. *Biomarkers* 2:279-285.
- Chen GX, Sano S, Asada K (1992) The amino acid sequence of ascorbate peroxidase from the tea has a high degree of homology to that of cytochrome c peroxidase from yeast. *Plant Cell Physiol* 33:109-116.
- Choi I (1983) Delayed neurologic sequelae in carbon monoxide intoxication. *Arch Neurol* 40:433-435.
- Cossu C, Doyotte A, Babut M, Exinger A, Vasseur P (2000) Antioxydant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotox Environ Safety* 45:106-121.
- Cossu C, Doyotte A, Jacquin MC, Babut M, Exinger A, Vasseur P (1997) Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotox Environ Safety* 38:122-131.
- Cowan DB, Weisel RD, Williams WG, Mickle DAG (1993) Identification of oxygen responsive elements in the 5'-flanking region of the human glutathione peroxidase gene. *J Biol Chem* 268:26904-26910.

- Cravedi JP, Perdu-Durand E, Poupin E (1998) Effets d'un hydrocarbure aromatique polycyclique et d'un PCB sur les activités de métabolisation des xénobiotiques de la truite arc-en-ciel (*O. mykiss*). Bull Fr Pêche Piscic 350-351:563-570.
- Criqui MC, Jamet Y, Parmentier Y, Marbach J, Durr A, Fleck J (1992) Isolation and characterization of a plant cDNA showing homology to animal glutathione peroxidases. Plant Mol Biol 18:623-627.
- Dallinger R, Jassen HH, Bauer-Hilty A, Berger B (1989) Characterization of an inducible cadmium-binding protein from hepatopancreas of metal-exposed slugs (*Arionidea, Mollusca*). Comp Biochem Physiol 92:355-360.
- Darall NM (1989) The effect of air pollution on physiological process in plants. Plant Cell Environ 12:1-30.
- D'Arcy D, Cohen G (1984) Metabolic activation of 1-naphthol by rat liver microsomes to 1,4-naphthoquinone and covalent binding species. Biochem Pharmacol 33:543-549.
- De Bias DA, Banerjee CM, Birkhead NC (1976) Effects of carbon monoxide on ventricular fibrillation. Arch Environ Health 31:42-46.
- Den Besten PJ, Lemaire P, Livingstone DR, Woodin B, Stegeman JJ, Herwig HJ, Seinen W (1993) Time-course and dose-response of the apparent induction of the cytochrome P450 monooxygenase system of pyloric caeca microsomes of the female sea star *Asterias rubens* L. by benzo[a]pyrene and polychlorinated biphenyls. Aquatic Toxicol 26:23-40.
- Denison MS, Heath-Pagliuso (1998) The Ah receptor: a regulator of the biochemical and toxicological actions of structurally diverse chemicals. Bull Environ Contam Toxicol 61:557-568.
- Dhindsa RS (1987) Glutathione status and protein synthesis during drought and subsequent rehydration in *Tortula ruralis*. Plant Physiol 83:816-819.
- Dhindsa RS (1991) Drought stress, enzymes of glutathione metabolism, oxidation injury, and protein synthesis in *Tortula ruralis*. Plant Physiol 95:648-651.
- Dierickx PJ (1984) Glutathione-S-transferase in aquatic macro-invertebrates and its interaction with different organic micropollutants. Sci Total Environ 40:93-102.
- Ding VDH, Pickett CB (1985) Transcriptional regulation of rat liver glutathione S-transferase genes by phenobarbital and 3-methylcholanthrene. Arch Biochem Biophys 240:553-559.
- Dolan M (1985) Carbon monoxide poisoning. Can Med Assoc J 133:392-399.
- Doyotte A, Cossu C, Jacquin MC, Babut M, Vasseur P (1997) Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. Aquatic Toxicol 39:93-110.
- Drotar A, Phelps P, Fall R (1985) Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. Plant Sci 42:35-40.
- Edwards EA, Enard C, Creissen GP, Mullineaux PM (1994) Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed peas. Planta 192:137-143.
- Edwards EA, Rawsthorne S, Mullineaux PM (1990) Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). Planta 180:278-284.
- Edwards R (1996) Characterisation of glutathione transferases and glutathione peroxidases in pea (*Pisum sativum*). Physiol Plant 98:594-604.
- Elstner EF, Osswald W (1994) Mechanisms of oxygen activation during plant stress. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh 102B:131-154.
- Environmental Protection Agency (1987) Summary review of health effects associated with naphthalene. EPA/600/8087/055F. Washington D.C., EPA.
- Eshdat Y, Holland D, Faltin Z, Ben-Hayyim G (1997) Plant glutathione peroxidases. Physiol Plant 100:234-240.
- European Communities, 1996. Council Directive 96/62/EC of 27 september 1996 on ambient air quality assessment and management. Official Journal of European Communities, no. L 296 of 21/11/1996.
- Fitzpatrick PJ, Krag TOB, Hojrup P, Sheehan D (1995) Characterization of glutathione S-transferase and a related glutathione-binding protein from gill of the blue mussel, *Mytilus edulis*. Biochem J 305:145-150.
- Forrest V, Cody T, Caruso J, Warshawsky D (1989) Influence of the carcinogenic pollutant benzo[a]pyrene on plant development: fern gametophytes. Chem Biol Interact 72:295-307.
- Fossi MC, Lari L, Casini S, Mattei N, Savelli C, Sanchez-Hernandez JC, Castellani S, Depledge M, Bamber S, Walker C, Savva D, Sparagano O (1996) Biochemical and genotoxic biomarkers in the Mediterranean crab *Carcinus aestuarii* experimentally exposed to polychlorobiphenyls, benzopyrene and methyl-mercury. Mar Environ Res 42:29-32.
- Fossi MC, Savelli C, Casini S, Franchi E, Mattei N, Corsi I (1997) Multi-response biomarker approach in the crab *Carcinus aestuarii* experimentally exposed to benzo[a]pyrene, polychlorobiphenyls and methyl-mercury. Biomarkers 2:311-319.
- Foyer CH, Halliwell B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta 133:21-25.
- Foyer CH, Rowell J, Walker D (1983) Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. Planta 157:239-244.
- Frear DS, Swanson HR (1970) Biosynthesis of s-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazino) glutathion: Partial purification and properties of a glutathione-S-transferase from corn. Phyto Chem 9:2123-2132.

- Frear DS, Swanson HR, Thalacker FW (1991) Induced microsomal oxidation of diclofop, triasulfuron, chlorsulfuron, and linuron in wheat. *Pest Biochem Physiol* 41:274-286.
- Frilling RS, Bensimon A, Tichauer Y, Daniel V (1990) Xenobiotic-inducible expression of murine glutathion *S*-transferase Ya subunit gene is controlled by an electrophile-responsive element. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6258-6262.
- Fromme H, Oddoy A, Piloty M, Krause M, Lahrz T (1998) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and diesel engine emission (elemental carbon) inside a car and subway train. *Sci Total Environ* 217:165-173.
- Fujisawa-Sehara A, Sogawa K, Nishi C, Fujii-Kuriyama Y (1986) Regulatory DNA elements localized remotely upstream from the drug-metabolizing cytochrome P450c gene. *Nucleic Acids Res* 14:1465-1477.
- Gallagher EP, Stapleton PL, Slone DH, Schlenk D, Eaton DL (1996) Channel catfish glutathione *S*-transferase isoenzyme activity toward ( $\pm$ )-*anti*-benzo[a]pyrene-trans-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide. *Aquat Toxicol* 34:135-150.
- Galli A, Del Chiaro D, Nieri R, Bronzetti G (1988) Studies on cytochrome P450 in *Mytilus galloprovincialis*: induction by Na-phenobarbital and ability to biotransform xenobiotics. *Mar Biol* 100:69-73.
- Gamble SC, Goldfarb PS, Porte C, Livingstone DR (1995) Glutathione peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*). *Mar Environ Res* 39:191-195.
- Garrigues P, Raoux C, Lemaire P, Mathieu A, Ribera D, Narbonne JF, Lafaurie M (1990) *In situ* correlations between polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and PAH metabolizing system activities in mussels and fish in the mediterranean sea: preliminary results. *Intern J Environ Anal Chem* 38:379-387.
- Gennity JM, Bottino NR, Zingaro RA, Wheeler AE, Irgolic KJ (1985) A selenium-induced peroxidation of glutathione in algae. *Phytochemistry* 24:2817-2821.
- Germansky M, Jamall S (1988) Organ-specific effects of naphthalene on tissue peroxidation, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase in the rat. *Arch Toxicol* 61:480-483.
- Ghiretti F, Ghiretti-Magaldi (1975) Respiration *In Fretter V, Peake J* (Eds.), *Pulmonates Volume 1 Functional anatomy and physiology*. Academic Press, London, New-York, San Francisco, 33-51.
- Gianinetti A, Cantoni M, Lorenzoni C, Salamini F, Marocco A (1993) Altered levels of antioxidant enzymes associated with two mutations in tomato. *Physiol Plant* 89:157-164.
- Going SA, Kille TJ, Sauder LR (1989) Effects of nitrogen dioxide exposure on susceptibility to influenza a virus infection in healthy adult. *Ann Rev Respir Dis* 139:1075-1081.
- Goldberg ED, Bowen VT, Farrington JW, Harvey G, Matin JH, Parker PL, Risebrough RW, Robertson W, Schneider E, Gamble E (1978) The mussel watch. *Environ Conservation* 5:101-125.
- Goldfarb PS, Spry JA, Livingstone DR, Wiseman A, Gibson GG (1989) *Mar Environ Res* 28:57-60.
- Gomot A (1997) Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Arch Environ Contam Toxicol*. 33:209-216.
- Gomot-De Vaufleury A (2000) Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, pentachlorophenol) with *Helix aspersa*. *Ecotox Environ Safety* 46:41-50.
- Gomot-De Vaufleury A, Kerhoas I (2000) Effects of cadmium on the reproduction system of the land snail *Helix aspersa*. *Bull Environ Contam Toxicol* 64:434-442.
- Gomot-De-Vaufleury A, Pihan F (2000) Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. *Chemosphere* 40:275-284.
- Gong H (1992) Health effects of air pollution. *Clin Chest Med* 13:201-214.
- Gonzalez CM, Pignata ML (1997) Chemical response of the lichen *Punctelia subrudecta* (Nyl.) krog transplanted close to a power station in an urban-industrial environment. *Environ Pollut* 97:195-203.
- Graminski GF, Zhang P, Sesay MA, Ammon HL, Armstrong RN (1989) Formation of the 1-(*S*-glutathionyl)-2,4,6-trinitrocyclohexadienate anion at the active site of glutathione *S*-transferase. *Biochemistry* 28:6252-6258.
- Griffith O, Meister A (1978) Differential inhibition of glutamine and  $\gamma$ -glutamyl-cysteine synthetases by  $\alpha$ -alkyl analogs of methionine sulfoximine that induce convulsions. *J Biol Chem* 253:2333-2338.
- Grill E, Löffler S, Winnacker EL, Zenk MH (1989) Phytochelatins, the heavy-metal binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (Phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6838-6842.
- Guidotti TL (1978) The higher oxides of nitrogen: inhalation toxicology. *Environ Res* 15:443-472.
- Gulyaeva LF, Grishanova AY, Petchkovski EV, Lyakhovich VV (1994) Regulation of the rat liver and lung CYP1A expression by different inducers. *In: Cytochrome P450. Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology* (Lechner MC, Ed) John Libbey Eurotext, Paris, 685-687.
- Güsten H (1986) Formation, transport and control of photochemical smog. *In: Hutzinger O* (eds) *The Handbook of Environmental Chemistry Vol.4A Air pollution*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, 54-105.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione-*S*-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130-7139.
- Hahn ME (1998) The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective. *Comp Biochem Physiol* 121C:23-53.



- Hahn ME, Karchner SI, Shapiro MA, Perera SA (1997) Molecular evolution of the two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and PAS family. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13743-13748.
- Hahn ME, Poland A, Glover Ed, Stegemen JJ (1992) The Ah receptor in marine animals: phylogenetic distribution and relationship to cytochrome P4501A inducibility. *Mar Environ Res* 34:87-92.
- Hahn ME, Poland A, Glover Ed, Stegemen JJ (1994) Photoaffinity labeling of the Ah receptor: phylogenetic survey of diverse vertebrate and invertebrate species. *Arch Biochem Biophys* 310:218-228.
- Halkier BA (1996) Catalytic reactivities and structure/function relationships of cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry* 43:1-21.
- Hall DE (1999) PAH emissions sources (characterisations and trends). *Fresenius Envir Bull* 8:523-530.
- Halliwell B (1987) Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chem Phys Lip* 44:327-340.
- Havir AE, McHale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 84:450-455.
- Hayes JD, Pulford DJ (1995) The glutathione *S*-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30:445-600.
- Hemminki K, Veidebaum T (1999) Environmental pollution and human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the east Baltic region. *Scand J Work Environ Health* 25:33-39.
- Higashi K, Nakashima K, Karasaki Y, Fukunaga M, Mizuguchi Y (1981) Activation of benzo[a]pyrene by microsomes of higher plant tissues and their mutagenicity. *Biochem Int* 2:373-380.
- Hippeli S, Elsnert EF (1997) Oxygen radicals and air pollution. *In* Sies H (eds), *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*, Academic Press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, 1-55.
- Holoubek I, Korinek P, Seda Z, Schneiderova E, Holoubkova I, Pacl A, Triska J, Cudlin P, Caslavsky J (2000) The use of mosses and pine needles to detect persistent organic pollutants at local and regional scales. *Environ Pollut* 109:283-292.
- Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle PM, Bergam HL (eds) (1992) *Biomarkers, biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. SETAC Special Publications Series, Lewis Publishers, Boca Raton.
- IARC (1982) *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Benzene*, Lyon.
- IARC (1983) *Polynuclear aromatic compounds, Part 1, Chemical, environmental and experimental data. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol 32 International Agency for Research on Cancer*, Lyon.
- IARC (1985) *Polynuclear aromatic compounds. Part 4. Bitumens, coal tars and derived products, shale oils and soots. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans, Vol 35 Lyon*.
- IARC (1987) *Overall evaluations of carcinogenicity: an updating. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol 1-42 Suppl 7. International Agency for Research on Cancer, Lyon march 10-18 1987, 38-55*.
- IARC (1989) *Diesel and Gasoline Engine Exhausts and some nitroarines. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol 46 International Agency for Research on Cancer, Lyon*.
- Ishikawa T (1990) Is the glutathione *S*-conjugate carrier an *mdr1* gene product? *Trends Biol Sci* 15:219-220.
- Ishikawa T (1992) The ATP-dependent glutathione *S*-conjugate export pump. *Trends Biol Sci* 17:463-468.
- Ishizuka M, Hoshi H, Minamoto N, Masuda M, Kazusaka A, Fujita S (1996) Alterations of cytochrome P450-dependent monooxygenase activities in *Eriocheir japonicus* in response to water pollution. *Environ Health Perspec* 104:774-778.
- Israel DI, Whitlock JP (1984) Regulation of cytochrome P450 gene transcription by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in wild type and variant mouse hepatoma cells. *J Biol Chem* 259:5400-5402.
- Israel DI, Whitlock JP, Jr (1983) Induction of mRNA specific for cytochrome P450 in wild type and variant mouse hepatoma cells. *J Biol Chem* 258:10390-10394.
- Iturbe-Ormaetxe I, Escuredo PR, Arrese-Igor C, Becana M (1998) Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiol* 116:171-181.
- Jakoby WB (1978) The glutathione *S*-transferases: a group of multifunctional detoxication protein. *Adv Enzymol* 46:383-414.
- Jerina DM, Daly JW, Witkop B, Zaltzman-Nirenberg P, Udenfriend S (1970) 1,2-naphthalene-oxide as an intermediate in the microsomal hydroxylation of naphthalene. *Biochemistry* 9:147-155.
- Kamens RM, Guo ZG, Fulcher JN, Bell DA (1988) Influence of humidity, sunlight, and temperature on the daytime decay of polyaromatic hydrocarbons on atmospheric soot particles. *Environ Sci Technol* 22:103-108.
- Kanekal S, Plopper C, Morin D, Buckpitt A (1991) Metabolism and cytotoxicity of naphthalene oxide in the isolated perfused mouse lung. *J Pharmacol Exp Ther* 256:391-400.
- Keller DA, Menzel DB (1989) Effects of sulfite on glutathione *S*-sulfonate and the glutathione status of lung cells. *Chem Biol Interact* 70:145-156.
- Kikuchi H, Usuda M, Sagami I, Ikawa S, Watanabe M (1994) Induction of cytochrome P4501A1 mRNA in aryl hydrocarbon hydroxylase-deficient mutants of mouse hepatoma line, Hepa-1. *In: Cytochrome P450. Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology* (Lechner MC, Ed) John Libbey Eurotext, Paris, 599-602.

- Kirchin MA, Wiseman A, Livingstone DR (1987) The partial purification of cytochrome P450 from the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Biochem Soc Trans* 15:1100-1101.
- Kirso U, Irha N (1998) Role of algae in fate of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. *Ecotox Environ Safety* 41:83-89.
- Klapheck S (1988a) Homoglutathione: isolation, quantification and occurrence in legumes. *Physiol Plant* 74:727-732.
- Klapheck S, Chrost B, Starke J, Zimmerman H (1992)  $\gamma$ -Glutamyl-cysteinylserine - a new homologue of glutathione in plants of the family *Poaceae*. *Bot Acta* 105:174-179.
- Klapheck S, Zimmer I, Cosse H (1990) Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol* 31:1005-1013.
- Klapheck S, Zopes H, Levels HG, Bergmann L (1988b) Properties and localization of the homoglutathione synthetase from *Phaseolus coccineus* leaves. *Physiol Plant* 74:733-739.
- Klingenberg M (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 75:376-386.
- Korfmacher WA, Mamantov G, Wehry EL, Natusch DFS, Mauney T (1981) Nonphotochemical decomposition of fluorene vapor-adsorbed on coal fly ash. *Environ Sci Technol* 15:1370-1375.
- Koymans L, Donne-Op Den Kelder GM, Koppele TEJM, Vermeulen NPE (1993). Cytochrome P450: their active site structure and mechanism of oxidation. *Drug Met Rev* 25:325-387.
- Kranner I, Grill D (1994) Rapid changes of the glutathione status and the enzymes involved in the reduction of glutathione disulfide during the initial stages of wetting lichens. *Crypt Bot* 4:203-206.
- Lagadic L, Caquet T, Amiard JC (1997) Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramdade F (eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux*. Masson, Paris, Milan, Barcelone, 1-7.
- Landers JP, Bunce NJ (1991) The Ah receptor and the mechanism of dioxin toxicity. *Biochem J* 276:273-287.
- Langley-Evans SC, Phillips GJ, Jackson AA (1996) Sulphur dioxide: a potent glutathione depleting agent. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 114:89-98.
- Lappartient AG, Touraine B (1996) Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and sulfate uptake in intact Canola. *Plant Physiol* 111:147-157.
- Launhardt T, Strehler A, Dumler-Gradl R, Thoma H, Vierle O (1998) PCDD/F- and PAH-emission from house heating systems. *Chemosphere* 37:2013-2020.
- Lawrence RA, Burk RF (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71:952-958.
- Lee RF, Keeran WS, Pickwell GV (1988) Marine invertebrate glutathione-S-transferases: purification, characterization and induction. *Mar Environ Res* 24:97-100.
- Lee WJ, Wang YF, Lin TC, Chen YY, Lin WC, Ku CC, Cheng JT (1995) PAH characteristics in the ambient air of traffic-source. *Sci Total Environ* 159:185-200.
- Leegood RC, Lea PJ, Adcock MD, Häusler RE (1995) The regulation and control of photorespiration. *J Exp Bot* 46:1397-1414.
- Legout C (1998) ATMO: comment associer le traceur aux mesures obligatoires d'information? *Poll Atmos* 157:51-60.
- Legraverend C, Guenther TM, Neberts DW (1984) Importance of the route of administration for genetic differences in benzo[a]pyrene-induced in utero toxicity and tetragenicity. *Teratology* 29:35-47.
- Lemaire P, Den Besten PJ, O'Hara SCM, Livingstone DR (1993) Comparative metabolism of benzo[a]pyrene by microsomes of hepatopancreas of the shore crab *Carcinus maena* L. and digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*, L. *Poly Aromat Comp* 3:1134-1138.
- Lemaire P, Livingstone DR (1994) Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. *Trends Comp Biochem Phys* 110:150-161.
- Lemaire P, Mathieu A, Giudicelli J, Lafaurie M (1992) Effect of benzo[a]pyrene on hepatic biotransformation activities: time course of induction in aquaculture european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Poly Aromat Comp* 2:263-273.
- Lenartova V, Holovska K, Pedrajas JR, Martinez-Lara E, Peinado J, Lopez-Barea J, Rosival I, Kosuth P (1997) Antioxydant and detoxifying fish enzymes as biomarkers of river pollution. *Biomarkers* 2:247-252.
- Lippmann M (1991) Morbidity associated with air pollution. In: Hutzinger O (eds) *The Handbook of Environmental Chemistry Vol 4C Air pollution*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, 31-71.
- Livingstone DR (1994) Recent developments in marine invertebrate organic xenobiotic metabolism. *Toxicol Ecotoxicol News* 1:88-94.
- Livingstone DR, Arnold R, Chipman JK, Kirchin MA, Marsh J (1990) The mixed-function oxygenase system in molluscs: metabolism, responses to xenobiotics, and toxicity. *Oceanis* 16:331-347.
- Livingstone DR, Farrar SV (1984) Tissue and subcellular distribution of enzyme activities of mixed-function-oxygenase and benzo[a]pyrene metabolism in the common mussel *Mytilus edulis*. *Sci Total Environ* 39:209-235.

- Livingstone DR, Farrar SV, Fossi C, Kirchin MA, Moore MN (1988) Responses of the digestive gland cytochrome P450 monooxygenase system of the common mussel (*Mytilus edulis*) to 3-methylcholanthrene and sodium phenobarbital. *Mar Environ Res* 24:118-119.
- Livingstone DR, Kirchin MA, Wiseman A (1989) Cytochrome P450 and oxidative metabolism in molluscs. *Xenobiotica* 19:1041-1062.
- Livingstone DR, Lemaire P, Matthews A, Peters LD, Porte C, Förlin L, Nasci C, Fossato V, Wootton AN, Goldfarb PS (1993) Application of cytochrome P4501A induction as a biomarker for impact by organic pollution in goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in Venice lagoon, Italy. International council for the exploration of the sea E:26.
- Livingstone DR, Nasci C, Solé M, Da Ros L, O'Hara SCM, Peters LD, Fossato V, Wootton AN, Goldfarb PS (1997) Apparent induction of a cytochrome P450 with immunochemical similarities to CYP1A in digestive gland of the common mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) with exposure to 2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl and arochlor 1254. *Aquatic Toxicol* 38:205-224.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Maiorino M, Chu FF, Ursini F, Davies KJA, Doroshov JH, Esworthy RS (1991) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is the 18-kDa selenoprotein expressed in human tumor cell lines. *J Biol Chem* 266:7728-7732.
- Mannervik B, Awasthi YC, Broard PG, Hayes JD, Di Ilio C (1992) Nomenclature for human glutathione-S-transferases. *Biochem J* 282:305-308.
- Marr LC, Kirchstetter TW, Harley RA, Miguel AH, Hering SV, Hammond SK (1999) Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in motor vehicle fuels and exhaust emissions. *Environ Sci Technol* 33:3091-3099.
- Marrs K (1996). The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:127-158.
- Masclat P, Mouvier G (1988) La chimie atmosphérique des hydrocarbures aromatiques polycycliques. *Poll Atmos janvier-mars*:25-31.
- Masclat P, Mouvier G, Nikolaou K (1986) Related decay index and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Atmos Environ* 20:439-446.
- Meimberg H, Schrenk C, Steinberg C, Klarenberg A, Kettrup A (1997) The suitability of gastropods as biomarkers. *Environ Sci Pollut Res* 4:183-188.
- Meister A (1983) Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 220:472-477.
- Ménard T, Vindimian E, Godet Y, Nomine M, Weidauer D, Ulbricht M, Frejafon E, Rambaldi P, Douard M, Wolf JP (1998) Calibrage et évaluation de systèmes LIDAR. *Poll Atmos* 160:105-119.
- Menichini E (1992) Urban air pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons: levels and sources of variability. *Sci Total Environ* 116:109-135.
- Menichini E, Monfredini F, Merli F (1999) The temporal variability of the profile of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air: a study in a medium traffic area in Rome, 1993-1998. *Atmos Environ* 33:3739-3750.
- Menzie CA, Potocki BP, Santodonato J (1992) Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ Sci Technol* 26:1278-1284.
- Meuwly P, Thibault p, Rauser WE (1993)  $\gamma$ -Glutamylcysteinylglutamic acid - a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. *FEBS Lett* 336:472-476.
- Mi HH, Lee WJ, Wu TL, Lin TC, Wang LC, Chao HR (1996) PAH emission from a gasoline-powered engine. *J Environ Sci Health A31*:1981-2003.
- Michel XR, Beasse C, Narbonne JF (1995) *In vivo* metabolism of benzo[a]pyrene in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch Environ Contam Toxicol* 28:215-222.
- Mills GC (1957) Hemoglobine catabolism. I- Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobine from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 229:189-197.
- Milukaité A (1998) Flux of benzo[a]pyrene to the ground surface and its distribution in the ecosystem. *Water Air Soil Pollut* 105:471-480.
- Mitchelmore CL, Birmelin C, Chipman JK, Livingstone DR (1998) Evidence for cytochrome P-450 and free radical involvement in the production of DNA strand breaks by benzo[a]pyrene and nitroaromatics in mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells. *Aquatic Toxicol* 41:193-212.
- Miyake C, Asada K (1992) Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiol* 33:541-553.
- Mofenson H, Caraccio T, Brody G (1984) Carbon monoxide poisoning. *Am J Emerg Med* 2:254-261.
- Morel Y, Barouki R (1998) Down-regulation of cytochrome P450 1A1 gene promoter by oxidative stress. *J Biol Chem* 273:26969-26976.
- Mulholland L (1998) Naphthalene. *In: Wexler P (Ed.) Encyclopedia of Toxicology*. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, 614-617.



- Mustafa MG, Tierney DF (1978) Biochemical and metabolic changes in the lung with oxygen, ozone and nitrogen dioxide toxicity. *Am Rev Respir Dis* 118:1061-1090.
- Nagata K, Martin BM, Gillette JR, Sasame HA (1990) Isozymes of cytochrome P-450 that metabolize naphthalene in liver and lung of untreated mice. *Drug Metab Dispos* 18:557-564.
- Nakajima D, Yoshida Y, Suzuki J, Suzuki S (1995) Seasonal changes in the concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in azalea leaves and relationship to atmospheric concentration. *Chemosphere* 30:409-418.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxidase is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867-880.
- Narbonne JF, Garrigues P, Ribera D, Raoux C, Mathieu A, Lemaire P, Salaun JP, Lafaurie M (1991) Mixed-function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring: field studies on the french coast of the mediterranean sea. *Comp Biochem Physiol* 100:37-42.
- Narbonne JF, Michel X (1997) Système de biotransformation chez les mollusques aquatiques. In Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F (eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux*. Masson, Paris, Milan, Barcelone, 11-31.
- National Academy Council (1987) Biological markers in environmental health research. *Environ Health Perspect* 74:3-9.
- Nebert DW, Jensen NM, Levitt RC, Felton JS (1980) Toxic chemical depression of the bone marrow and possible aplastic anemia explainable on a genetic basis. *Clin Toxicol* 16:99-122.
- Nebert DW, Nelson DR, Feyereisen R (1989) Evolution of the cytochrome P450 genes. *Xenobiotica* 19:1149-1160.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW (1996) The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6:1-42.
- Neuhold LA, Shirayoshi Y, Ozato K, Jones JE, Nebert DW (1989) Regulation of mouse CYP1A1 gene expression by dioxin: requirement of two *cis*-acting elements during induction. *Mol Cell Biol* 9:2378-2386.
- Ni WR, Turley R, Trelease (1990) Characterization of a cDNA encoding cotton seed catalase. *Biochim Biophys Acta* 1049:219-222.
- Nielsen T (1996) Traffic contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the center of a large city. *Atmos Environ* 30:3481-3490.
- Nielsen T, Feilberg A, Binderup ML (1999) The variation of street air levels of PAH and other mutagenic PAC in relation to regulations of traffic emissions and the impact of atmospheric processes. *Environ Sci Pollut Res* 6:133-137.
- Nielsen T, Jorgensen HE, Larsen JC, Poulsen M (1996) City air pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and other mutagens: occurrence, sources and health effects. *Sci Total Environ* 189-190:41-49.
- Nishihira J, Sakai M, Nishi S, Hatanaka Y (1995) Identification of the electrophilic substrate-binding site of glutathione S-transferase P by photoaffinity labelling. *Eur J Biochem* 232:106-110.
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:249-279.
- Odabasi M, Vardar N, Sofuoglu A, Tasdemir Y, Holsen TM (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Chicago air. *Sci Total Environ* 227:57-67.
- Okey AB (1990) Enzyme induction in the cytochrome P450 system. *Pharmacol Ther* 45:241-298.
- Orbea A, Marigomez I, Fernandez C, Tarazona JV, Cancio I, Cajaraville MP (1999) Structure of peroxisomes and activity of the marker enzyme catalase in digestive epithelial cells in relation to PAH content of mussels from two basque estuaries (Bay of Biscay): seasonal and site-specific variations. *Arch Environ Contam Toxicol* 36:158-166.
- Orlowski M, Meister A (1970) The  $\gamma$ -glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids. *Proc Nat Acad Sci* 67:1248-1255.
- Overbaugh JM, Fall R (1985) Characterization of a selenium-independent glutathione peroxidase from *Euglena gracilis*. *Plant Physiol* 77:437-442.
- Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70:158-169.
- Paulson KE, Darnell JE, Rushmore TH, Pickett CB (1990) Analysis of the upstream elements of the xenobiotic compound-inducible and positionally regulated glutathione S-transferase Ya gene. *Mol Cell Biol* 10:1841-1852.
- Payne S (1958) The pathological effects of the intraperitoneal injection of 3,4-benzopyrene into rats and mice. *Br J Cancer* 12:65-72.
- Peakall DB (1994) Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicol Ecotoxicol News* 1:55-60.
- Pell EJ, Eckardt NA, Glick RE (1994) Biochemical and molecular basis for impairment of photosynthetic potential. *Photosynthese Res* 39:453-462.
- Pell EJ, Schlaghaufer CD, Artega RN (1997) Ozone-induced oxidative stress: mechanisms of action and reaction. *Physiol Plant* 100:264-273.
- Pemble SE, Taylor JB (1992) An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class-theta glutathione transferase cDNA sequences. *Biochem J* 287:957-963.

- Peters LD, Nasci C, Livingstone DR (1998a) Immunochemical investigations of cytochrome P450 forms/epitopes (CYP1A, 2B, 2E, 3A and 4A) in digestive gland of *Mytilus* sp. *Comp Biochem Physiol* 121:361-369.
- Peters LD, Nasci C, Livingstone DR (1998b) Variation in levels of cytochrome P4501A, 2B, 2E, 3A and 4A-immunopositive proteins in digestive gland of indigenous and transplanted mussel *Mytilus galloprovincialis* in Venice Lagoon, Italy. *Mar Environ Res* 46:295-299.
- Pflugmacher S, Wiencke C, Sandermann H (1999) Activity of phase I and phase II detoxification enzymes in Antarctic and Arctic macroalgae. *Mar Environ Res* 48:23-36.
- Phelan DM, Brackney WR, Denison MS (1998) The Ah receptor can bind ligand in the absence of receptor-associated heat-shock protein 90. *Arch Biochem Biophys* 353:47-54.
- Pistikopoulos P, Masclet P, Mouvier G (1990) A receptor model adapted to reactive species: polycyclic aromatic hydrocarbons; evaluation of source contributions in an open urban site -I Particle compounds. *Atmos Environ* 24:1189-1197.
- Poland A, Glover E, Kende AS (1976) Stereospecific, high-affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. *J Biol Chem* 251:4936-4946.
- Polle A (1997) Defense against photooxidative damage in plants. *In: Scandalios JG (eds.), Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defences.* CSHL Press 623-666.
- Pool BL, Brendler S, Klein RG, Monarca S, Pasquini R, Schmeizer P, Zeller WJ (1988) Effects of SO<sub>2</sub> or NO<sub>x</sub> on toxic and genotoxic properties of chemical carcinogens. II. Short term *in vivo* studies. *Carcinogenesis* 9:1247-1252.
- Porte C, Lemaire P, Peters LD, Livingstone DR (1995) Partial purification and properties of cytochrome P450 from digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar Environ Res* 39:27-31.
- Porte C, Solé M, Albaigés J, Livingstone DR (1991) Responses of mixed-function oxygenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus* sp. to organic pollution. *Comp Biochem Physiol* 100:183-186.
- Rapoport R, Raikhin M, Sklan D, Hanukoglu (1994) Electron pathways in adrenal mitochondrial cytochrome P450 systems: relative rates of leakage and hydroxylation. *In: Lechner MC (eds) Cytochrome P450 Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology.* John Libbey Eurotext, Paris, 357-363.
- Raub JA, Mathieu-Nolf M, Hampson NB, Thom SR (2000) Carbon monoxide - a public health perspective. *Toxicology* 7:1-14.
- Regoli F (1998) Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch Environ Contam Toxicol* 34:48-63.
- Rendic S, Di Carlo FJ (1997) Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Dispos Rev* 29:413-580.
- Rennenberg H (1982) Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry* 21:2771-2781.
- Reymao MSF, Cury PM, Lichtenfels AJFC, Lemos M, Battlehner CN, Conceição GMS, Capelozzi VL, Montes GS, Junior MF, Martins MA, Böhm GM, Saldiva PHN (1997) Urban air pollution enhances the formation of urethane-induced lung tumors in mice. *Environ Res* 74:150-158.
- Richieri PR, Buckpitt AR (1988) Glutathione depletion by naphthalene in isolated hepatocytes and by naphthalene oxide *in vivo*. *Biochem Pharmacol* 37:2473-2478.
- Robineau T, Batard Y, Nedelkina S, Cabello-Hurtado F, LeRet M, Sorokine O, Didierjean L, Werck-Reichhart D (1998) The chemically inducible plant cytochrome P450 CYP76B1 actively metabolizes phenylureas and other xenobiotics. *Plant Physiol* 118:1049-1056.
- Rodriguez-Ariza A, Peinado J, Pueyo C, Lopez-Barea J (1983) Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Can J Fish Aquat Sci* 50:2568-2573.
- Rogge WF, Hildemann LM, Mazurek A, Cass GR, Simoneit BRT (1993) Source of fine organic aerosol. 2. Non catalyst equipped automobiles and heavy duty diesel trucks. *Environ Sci Technol* 27:636-651.
- Roy S, Pellinen J, Sen CK, Hänninen O (1994) Benzo[a]anthracene and benzo[a]pyrene exposure in the aquatic plant *Fontinalis antipyretica*: uptake, elimination and the responses of biotransformation and antioxidant enzymes. *Chemosphere* 29:1301-1311.
- Roy S, Sen CK, Hänninen O (1996) Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons using 'Moss Bags': bioaccumulation and responses of antioxidant enzymes in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* 32:2305-2315.
- Sagai M, Ichinose T, Kubota K (1984) Studies on the biochemical effects of nitrogen dioxide. IV. Relation between the change of lipid peroxidation and the antioxidative protective system in rat lungs upon life span exposure to low levels of NO<sub>2</sub>. *Carcinogenesis* 73:444-456.
- Saint-Denis M, Narbonne JF, Arnaud C, Thybaud E, Ribera D (1999) Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo[a]pyrene. *Soil Biol Biochem* 31:1837-1846.
- Sandermann H (1992) Plant metabolism of xenobiotics. *TIBS* 17:82-84.
- Sandoz C, Lesca P, Carpy A, Laguionie M, Narbonne JF (1998) Effects of carbaryl and naphthalene on rat hepatic CYP1A1/2: potential binding to Ah receptor and 4S benzo(a)pyrene-binding protein. *Inter J Mol Med* 2:615-623.

- Scandalios JG (1990) Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Adv Genet* 28:1-41.
- Scandalios JG, Guan L, Polidoros AN (1997) *In: Scandalios JG (eds.), Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses.* CSHL Press 343-406.
- Scandalios JG, Tong WF, Roupakias DG (1980) Cat3, a third gene locus coding for tissue-specific catalase maize: genetic, intracellular location, and some biochemical properties. *Mol Gen Genet* 179:33-41.
- Schlenk D, Buhler DR (1988) Cytochrome P-450 and phase II activities in the gumboot chiton *Cryptochiton stelleti*. *Aquatic Toxicol* 13:167-182.
- Schleizinger JJ, White RD, Stegeman JJ (1999) Oxidative inactivation of cytochrome P-450 1A (CYP1A) stimulated by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl: production of reactive oxygen by vertebrate CYP1As. *Mol Pharmacol* 56:588-597.
- Schrenk C, Steinberg CEW (1998) Metabolism of phenanthrene in cell suspension cultures of wheat and soybean as well as intact plants of water moss *Fontinalis antipyretica*. *Environ Sci Pollut Res* 5:83-88.
- Schuler MA (1996) Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Crit Rev Plant Sci* 15:235-284.
- Seel WE, Hendry GAF, Lee JA (1992) Effects of desiccation on some activated oxygen processing enzymes and anti-oxidants in mosses. *J Exp Bot* 43:1031-1037.
- Seidler A, Heiskel H, Bickeböllner R, Elsner G (1998) Association between diesel exposure at work and prostate cancer. *Scand J Work Environ Health* 24:486-494.
- Serrano A, Llobell A (1993) Occurrence of two isoforms of glutathione reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 190:199-205.
- Shigeoka S, Onishi T, Nakano Y, Kitaoka S (1987) Characterization and physiological function of glutathione reductase in *Euglena gracilis* Z. *Biochem J* 242:511-515.
- Sies H (1991) Oxidative stress: introduction. *In Sies H (eds.), Oxidative stress, oxidants and antioxidants.* Academic Press, San Diego, I-XV.
- Siest G, Batt AM, Fournel-Gigleux S, Galteau MM, Wellman-Bednawska M, Minn A, Amar Costesec A (1988) Induction of plasma and tissue enzymes by drugs: significance in toxicological studies. *Xenobiotica* 18:21-34.
- Sillman S (1999) The relation between ozone, NO<sub>x</sub> and hydrocarbons in urban and polluted rural environments. *Atmos Pollut* 33:1821-1845.
- Sillman S, He D, Cardelino C, Imhoff RE (1997) The use of photochemical indicators to evaluate ozone-NO<sub>x</sub>-hydrocarbon sensitivity: case studies from Atlanta, New York, and Los Angeles. *J Air and Waste Manage Assoc* 47:1030-1040.
- Sjölin AM, Livingstone DR (1997) Redox cycling of aromatic hydrocarbon quinones catalysed by digestive gland microsomes of the common mussel (*Mytilus edulis* L.). *Aquat Toxicol* 38:83-99.
- Smith DJT, Edelhauser EC, Harrison RM (1995) Polynuclear aromatic hydrocarbon concentrations in road dust and soil samples collected in the United Kingdom and Pakistan. *Environ Technol* 16:45-53.
- Smith DJT, Harrison RM (1996) Concentrations, trends and vehicle source profile of polynuclear aromatic hydrocarbons in the U.K. atmosphere. *Atmos Environ* 30:2513-2525.
- Smith J, Shrift A (1979) Phylogenetic distribution of glutathione peroxidase. *Comp Biochem Physiol* 63:39-44.
- Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y (1997) Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor. *J Biochem* 122:1075-1079.
- Solé M, Porte C, Albaigés J (1994) Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: its relation with contamination body burdens. *Aquatic Toxicol* 30:271-283.
- Solé M, Porte C, Albaigés J (1995) The use of biomarkers for assessing the effects of organic pollution in mussels. *Sci Total Environ* 159:147-153.
- Solé M, Porte C, Biosca X, Mitchelmore CL, Chipman JK, Livingstone DR, Albaigés J (1996) Effects of the 'Aegean Sea' oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.). *Comp Biochem Physiol* 113:257-265.
- Sram RJ, Binkova B, Rössner P, Rubes J, Topinka J, Dejmek J (1999) Adverse reproduction outcomes from exposure to environmental mutagens. *Mut Res* 428:203-215.
- Stanley JS, Benson AM (1988) The conjugation of 4-nitroquinoline 1-oxide, a potent carcinogen, by mammalian glutathione transferases, 4-nitroquinoline 1-oxide conjugation by human, rat and mouse liver cytosol, extrahepatic organs of mice and purified mouse glutathione transferase isoenzyme. *Biochem J* 256:303-306.
- Steinnes E, Rambaek JP, Hanssen JE (1992) Large scale multi-element survey of atmospheric deposition using naturally growing moss as biomonitor. *Chemosphere* 25:735-752.
- Stien X, Percic P, Gnassia-Barelli M, Roméo M, Lafaurie M (1998) Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean sea. *Environ Pollut* 99:339-345.
- Stratmann U, Lehman RR, Steinbech T, Wessling G (1991) Effect of sulfur dioxide inhalation on the respiratory tract of the rat. *Zbl Hyg* 192:324-335.
- Suteau P, Daubeze M, Migaud ML, Narbonne JF (1988) PAH-metabolizing enzymes in whole mussels as biochemical tests for chemical pollution monitoring. *Mar Ecol Prog Ser* 46:45-49.
- Takahashi Y, Miura T (1985) *In vivo* effects of nitrogen dioxide and ozone on xenobiotic metabolizing systems of rat lungs. *Toxicol Lett* 26:145-152.



- Takahashi Y, Miura T (1989) Effects of nitrogen dioxide and ozone in combination on xenobiotic metabolizing activities of rat lungs. *Toxicology* 56:253-262.
- Takeda T, Ishikawa T, Shigeoka S (1997) Metabolism of hydrogen peroxide by the scavenging system in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiol Plant* 99:49-55.
- Takemoto BK, Noble RD (1982) The effects of short-term SO<sub>2</sub> fumigation on photosynthesis and respiration in soybean *Glycine max*. *Environ Pollut* 28:67-74.
- Tewari A, Shukla NP (1991) Air pollution-adverse effects of sulfur dioxide. *Rev Environ Health* 9:39-45.
- Thomas W, Rühling A, Simon H (1984) Accumulation of airborne pollutants (PAH, chlorinated hydrocarbons, heavy metals) in various plant species and humus. *Environ Pollut* 36:295-310.
- Thomas W, Simon H (1985) Classification of plant species by their organic (PAH, PCB, BHC) and inorganic (Heavy metals) trace pollutant concentrations. *Sci Total Environ* 46:83-94.
- Timbrell JA, Drapper R, Waterfield C (1994) Biomarkers in toxicology: new uses for old molecules. *Toxicol Ecotoxicol News* 1:4-14.
- Tomarev SI, Zinovieva RD, Guo K, Piatigorsky J (1993) Squid glutathione-S-transferase. Relationship with other glutathione-S-transferases and S-crystallins of cephalopods. *J Biol Chem* 268:4534-4542.
- Tsai JH, Peng BH, Lee DZ (1995) PAH characteristics and genotoxicity in the ambient air of a petrochemical industry complex. *Environ Int* 21:47-56.
- Ullrich V, Weber P (1972) The O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin by liver microsomes. A direct fluorometric test. *Physiol Chem* 353:1171-1177.
- Urso P, Gengozian N (1980) Depressed humoral immunity and increased tumor incidence in mice following utero exposure to benzo[a]pyrene. *J Toxicol Environ Health*. 6:569-576.
- Valerio F, Stella A, Munizzi A (1999) Correlation between PAHs and CO, NO, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, along urban streets *In: The proceeding of 17th International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds*.
- Van Bladeren PJ, Sayer JM, Ryan DE, Thomas PE, Levin W, Jerina DM (1985) Differential stereoselectivity of cytochromes P-450b and P-450c in the formation of naphthalene and anthracene 1,2-oxides. *J Biol Chem* 260:10226-10235.
- Van Bladeren PJ, Vyas KP, Sayer JM, Ryan DE, Thomas PE, Levin W, Jerina DM (1984) Stereoselectivity of cytochrome P-450c in the formation of naphthalene and anthracene 1,2-oxides. *J Biol Chem* 259:8966-8973.
- Venier P, Canova S (1996) Formation of DNA adducts in the gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* treated with benzo[a]pyrene. *Aquat Toxicol* 34:119-133.
- Viras LG, Siskos PA, Stephanou E (1987) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Athens atmosphere. *Int J Environ Anal Chem* 28:71-85.
- Viskari EL, Rekilä R, Roy S, Lehto O, Ruuskanen J, Kärenlampi L (1997) Airborne pollutants along a road side: assessment using snow analyses and moss bags. *Environ Pollut* 97:153-160.
- Vitt D, Marsh J, Bovey R (1988) Mosses, lichens and ferns of northwest North America. Lone Pine Pub., Edmonton, Canada. 296 pp.
- Vuchetich PJ, Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Tang L, Stohs SJ (1996) Naphthalene-induced oxidative stress in rats and the protective effects of vitamin E succinate. *Free Radical Biol Med* 21:577-590.
- Vyskocil A, Fiala Z, Fialova D, Krajak V, Viau C (1997) Environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Czech Republic. *Hum Exp Toxicol* 16:589-595.
- Walters S, Ayres J (1996) The health effects of air pollution. *In Harrison RM (eds), Pollution causes, effects and control, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 241-265.*
- Warren DL, Brown D, Buckpitt AR (1982) Evidence for cytochrome P-450 mediated metabolism in the bronchiolar damage by naphthalene. *Chem Biol Inter* 40:287-303.
- Wauters E, Lenelle I (1999) PAH measurements in Belgium: experience and concentration levels. *Fresenius Environ Bull* 8:629-637.
- Wegener JWM, Van Schaik MJM, Aiking H (1992) Active biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons by means of mosses. *Environ Pollut* 76:15-18.
- Whitlock JP, Jr (1990) Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:251-277.
- Whitlock JP, Okino ST, Dong L, Ko HP, Clarke-Katzenberg R, Ma Q, Li H (1996) Induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription. *FASEB J* 10:809-818.
- WHO (1987) Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH). *In: Air Quality Guidelines for Europe, Eur Ser No 23, WHO, Copenhagen, Denmark 105-117.*
- Wilbrink M, Groot EJ, Jansen R, De Vries Y, Vermeulen NPE (1991a) Occurrence of a cytochrome P-450-containing mixed-function oxidase system in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Xenobiotica* 21:223-233.
- Wilbrink M, Van De Merbel NC, Vermeulen NPE (1991b) Glutathione S-transferase activity in the digestive gland of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Comp Biochem Physiol* 99:185-189.
- Willekens H, Van Camp W, Van Montagu M, Sandermann H, Langebartels C (1994) Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol* 106:1007-1014.

- Willett KL, Randerath K, Zhou GD, Safe SH (1998) Inhibition of CYP1A1-dependent activity by the polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) fluoranthene. *Biochem Pharmacol* 55:831-839.
- Wolf JP, Woste L (1995) La pollution urbaine surveillée par laser. *La Recherche* 275:448-450.
- Wolkers J, Jorgensen EH, Nijmeijer SM, Witkamp RF (1996) Time-dependent induction of two distinct hepatic cytochrome P450A catalytic activities at low temperatures in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) after oral exposure to benzo[a]pyrene. *Aquat Toxicol* 35:127-138.
- Wolkers J, Jorgensen EH, Nijmeijer SM, Witkamp RF (1998) *Mar. Environ Res* 46:117-125.
- Wootton AN, Herring C, Spry JA, Wiseman A, Livingstone DR, Goldfard PS (1995) Evidence for the existence of cytochrome P450 gene families (CYP1A, 3A, 4A, 11A) and modulation of gene expression (CYP1A) in the mussel *Mytilus* sp. *Mar Environ Res* 39:21-26.
- Wortham H, Mouvier G, Masclet P (1992) Etude des conditions de formation des nitro-HAP dans l'atmosphère parisienne durant une période fortement polluée. *Poll Atmos juillet-septembre*:28-34.
- Yamaguchi J, Nishimura M, Akazawa T (1986) Purification and characterization of heme-containing low-activity form of catalase from greening pumpkin cotyledons. *Eur J Biochem* 159:315-322.
- Yasuda K, Takahashi M (1998) The emission of polycyclic aromatic hydrocarbons from municipal solid waste incinerators during the combustion cycle. *Air Waste Manage Assoc* 48:441-447.
- Yawetz A, Manelis R, Fishelson L (1992) The effects of aroclor 1254 and petrochemical pollutants on cytochrome P450 from the digestive gland microsomes of four species of Mediterranean molluscs. *Comp Biochem Physiol* 103:607-614.
- Zeller W, Miele A, Suarez C (1984) Accidental carbon monoxide poisoning. *Clin Pediatr* 23:694-695.



**Résumé :** L'objectif de ce travail était d'apprécier la valeur potentielle, en tant que biomarqueurs de la pollution atmosphérique par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), des activités enzymatiques de phase I (7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase, EROD et 7-éthoxycoumarine-O-dééthylase, ECOD) et associées au glutathion (glutathion *S*-transférases, GST avec le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène et le 4-nitroquinoline-1-oxyde comme substrats, la glutathion réductase et les glutathion peroxydases) dans trois organes d'un gastéropode (*Helix aspersa*), mais également des activités associées au glutathion et antioxydantes (ascorbate peroxydase et catalase) chez une mousse (*Pleurozium schreberi*). Cette étude comportait trois étapes qui ont évoluées d'une pollution simple et contrôlée vers la pollution urbaine.

Dans un premier temps, *H. aspersa* et *P. schreberi* ont été exposés durant trois jours à une ambiance saturée en naphthalène. Alors que les paramètres biochimiques explorés chez *P. schreberi* n'ont pas variées, une réponse organo-spécifique a été observée chez *H. aspersa*. Chez ce dernier les activités EROD et ECOD n'ont pas été modifiées dans le toit de la cavité palléale (TCP) alors qu'elles ont été diminuées dans le rein (R) et augmentées dans la glande digestive (GD).

Dans une seconde phase, ces organismes ont été exposés 8 heures à une atmosphère de travail chargée principalement en HAP, le benzo[a]pyrène étant choisi comme traceur. Chez *P. schreberi*, aucune modification des activités enzymatiques n'a été mesurée. A l'inverse, une réponse non dose-dépendante a été observée chez *H. aspersa*. Si les activités EROD et ECOD ont été augmentées dans ses trois organes, les activités GST mesurées avec le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène comme substrat l'ont été uniquement dans la GD.

Enfin, pour la dernière étape, les organismes ont été implantés une à plusieurs semaines sur différents sites urbains. Dans la GD d'*H. aspersa*, les activités GST mesurées avec les deux substrats ont été corrélées positivement aux oxydes d'azote. Ces dernières, ainsi que les activités CYP dans le rein d'*H. aspersa* paraissent prometteuses pour une utilisation en tant que biomarqueurs de la pollution atmosphérique par les HAP.

**Abstract :** The aim of this work was to evaluate the potential value of xenobiotic-metabolising enzymes as biomarker of air pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Using several models of PAH air pollution, we investigated their effects on cytochrome P450 (7-ethoxyresorufin *O*-deethylase, EROD and 7-ethoxycoumarin *O*-deethylase, ECOD) and glutathione-dependent enzyme activities (glutathione *S*-transferases, GST with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and 4-nitroquinoline-1-oxide as substrates, glutathione reductase and glutathione peroxidases) in three organs of the snail *Helix aspersa* as well as on glutathione-dependent and antioxidant (ascorbate peroxidase and catalase) enzyme activities in the moss *Pleurozium schreberi*.

In the first model, *H. aspersa* and *P. schreberi* were exposed to a naphthalene-saturated atmosphere during three days. While, this treatment did not provoke any variation of the enzyme activities explored in *P. schreberi*, it modified the level of some snail enzyme activities in an organ-dependent manner. Naphthalene exposure affected none of the tested activities in the mantle cavity-forming tissues (MCFT), but significantly decreased EROD and ECOD activities in the kidney (KD) as opposed to their increase in the digestive gland (DG).

In the second model, these organisms were exposed for 8 hours to a work place where the atmosphere was essentially PAH burden. Benzo[a]pyrene was used as the PAH model compound. None of the selected enzyme activities were affected in the moss. Conversely, EROD and ECOD activities were significantly increased in the KD and DG of *H. aspersa*, whatever the PAH burden. Moreover, GST activities with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene as the acceptor substrate were enhanced in the DG.

In the third model, the organisms were transplanted in three urban places during one or several weeks. GST activities with both substrates were positively correlated with the level of nitrogen oxides in the digestive gland of *H. aspersa*.

Overall, our work shows that the GST activities in the DG and CYP activities (EROD and ECOD) in the KD of *H. aspersa* may constitute convenient biomarkers of air pollution PAH.