



## 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>

6 107/139

UNIVERSITE DE METZ

1996

**THESE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ**

Mention « Toxicologie de l'Environnement »

soutenue le 6 Décembre 1996

**MISE AU POINT DES MESURES ET DETERMINATION  
DES ACTIVITES SUPEROXYDE DISMUTASES TOTALES  
CHEZ *UNIO TUMIDUS*, BIVALVE DULÇAQUICOLE EN  
CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES ET DE STRESS  
CHIMIQUE**

**Marie-Cécile JACQUIN-PORRETAZ**

**MEMBRES DU JURY**

- Professeur **P. VASSEUR** - Université de Metz - Directeur de thèse
- Docteur **G. BOGÉ** - Université de Toulon - rapporteur
- Docteur **M. GUERBET** - Université de Rouen - rapporteur
- Docteur **S. BIAGIANTI** - Université de Reims

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv	19960725
Cote	S/M <sub>3</sub> 96/36
Loc	Magasin

## **Remerciements**

*Ce travail a été réalisé grâce aux financements des Agences de l'Eau françaises et de la Société Elf-Atochem.*

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Professeur Paule VASSEUR qui pendant ces longues années a dirigé ce travail tout en m'apportant ses conseils et en me faisant partager son expérience.*

*Mes remerciements s'adressent à Monsieur G. BOGÉ et Monsieur M. GUERBET qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail malgré le court délai qui leur était imparti pour réaliser cette tâche.*

*Je suis aussi reconnaissante à Madame S. BIAGIANTI qui a accepté de consacrer de son temps à lire ce mémoire et participer au jury de cette thèse.*

*Je désire vivement remercier Monsieur D. DIVE et Monsieur P. BECUWE qui m'ont initiée à la technique d'isoélectrofocalisation utilisée au cours de cette recherche.*

*Que Monsieur P. HANSEN et son équipe soient aussi remerciés pour l'accueil qu'ils m'ont réservé au sein de leur laboratoire. Bien que la technique d'évaluation des cassures de l'ADN sur hémolymphe de bivalve n'ait pas pu être mise en oeuvre par la suite, cette expérience a été enrichissante.*

*Je n'oublie pas Hortense, Valentin, Ulysse, Eugénie, Nestor, Germaine et Anne-Marie qui m'ont autorisée à occuper leur bureau pour la rédaction de ce mémoire.*

*Merci Carole pour tes petites préparations quotidiennes. Pas un matin, tu n'as oublié de me mûtonner un homogénat de glandes digestives ou de branchies. Le sevrage est dur. Aurélie, toi qui par ton esprit d'équipe a permis à cette collaboration de se réaliser dans une ambiance agréable, soit aussi remerciée.*

*A tous les personnels taquins et patients, aux étudiants du C.S.E. comme du laboratoire d'Ecologie, merci pour les niches, les tartes en tous genres, et les discussions constructives.*

*Merci Halima, Ali, Anke, Claudémir et Salah : grâce à votre humour venu d'ailleurs, j'ai pu m'évader de Metz en voyageant à la vitesse de vos sourires.*

*Je finirai cette page en remerciant mes parents pour leur exemple d'intégrité et de ténacité, mes frères pour leurs encouragements ainsi que tous mes proches sans l'influence desquels cette thèse n'aurait pas vu le jour.*

# Table des matières

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1ERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>3</b>
<b>I. <u>Espèces réactives de l'oxygène</u></b>	<b>3</b>
1. Toxicité de l'oxygène	3
2. Formation des espèces réactives de l'oxygène :	4
a) Processus généraux	4
b) Facteurs exogènes	5
c) Facteurs endogènes	5
3. Effets cellulaires des espèces réactives	6
4. Les moyens de protection des organismes vivants aérobies	6
a) Les enzymes	6
b) Les substances antioxydantes	7
c) Importance des métaux	8
<b>II. <u>Les superoxyde dismutases : (EC 1.15.1.1)</u></b>	<b>8</b>
1. Rôle, utilité :	9
2. Répartition, caractéristiques :	10
a) Organismes procaryotes	10
b) Organismes eucaryotes	11
3. Principaux modes de régulation de l'activité des superoxyde dismutases : niveau moléculaire	13
a) Régulation de l'activité Mn et Fe-SOD	14
- a.1. Organismes procaryotes	14
- a.2 Levures	15
- a.3 Eucaryotes supérieurs	15
b) Régulation de l'activité CuZn-SOD	16
- b.1 Procaryotes	16
- b.2 Levures	16
- b.3 Eucaryotes supérieurs	16
4. Régulation lors du développement, division cellulaire	17
5. Réponses des organismes à des stress oxydatifs	17
<b>III. <u>Réponses des activités SOD face à des stress oxydants</u></b>	<b>22</b>
1. Niveaux de base de la SOD en conditions physiologiques chez divers organismes	22
2. Organismes aquatiques	23
a) Intoxications par les métaux :	24
b) Intoxications par des molécules organiques :	26
<b>IV. <u>Méthodes de dosage de la SOD :</u></b>	<b>29</b>
1. les méthodes directes	29
2. les méthodes indirectes	29
<b>V. <u>Les Unionidaes : biologie</u></b>	<b>32</b>

## 2EME PARTIE : MISE AU POINT DU DOSAGE DE LA SOD DANS LES ORGANES DE *UNIO TUMIDUS* 34

<b>I. <u>Description des méthodes de dosage</u></b>	<b>34</b>
1. Méthode de Paoletti & al. (1986)	35
2. Méthode de Marklund et Marklund (1974)	36
3. SOD-525 (Bioxytech)	37
4. Méthode de McCord & Fridovich (1969)	38
<b>II. <u>Recherche d'une méthode de dosage sensible et rapide</u></b>	<b>39</b>
1. Méthode de Paoletti & al. 1986	39
2. Recherche d'une méthode plus rapide	40
a) Méthode de Marklund	40
b) Comparaison des sensibilités de la méthode de Paoletti et de la méthode de Marklund	41
c) Méthode SOD-525 (Bioxytech)	42
d) Méthode de McCord et Fridovich (1969)	42
3. Etude des facteurs interférents présents dans les fractions tissulaires	43
a) Méthode de Paoletti & al. (1986)	43
b) Méthode de McCord et Fridovich (1969)	44
4. Comparaison des méthodes lors de dosages simultanés par les méthodes de Paoletti & al. (1986) et de McCord et Fridovich (1969) sur glandes digestives et branchies	44
<b>III. <u>Préparation des glandes digestives ou des branchies en vue des dosages enzymatiques</u></b>	<b>46</b>
1. Protocole de fractionnement	46
2. Inhibiteurs de protéases	47
3. Purification	49
a) Gel filtration	49
b) Microconcentration	50
<b>IV. <u>Essais d'identification des deux types de SOD</u></b>	<b>51</b>
1. Inhibition par les cyanures	51
a) Inhibition de la CuZn-SOD pure	51
b) SOD <i>Unio tumidus</i>	52
2. Fractionnement subcellulaire	53
3. Isoélectrofocalisation	55
<b>V. <u>Discussion</u></b>	<b>56</b>
1. Les méthodes de dosage	56
2. Ajouts dosés	57
3. Sources de variabilité	59
4. Distinction de la CuZn et de la Mn-SOD	61

## 3EME PARTIE : ETUDES DE TERRAIN ET INTOXICATIONS 62

<b>I. <u>Protocoles expérimentaux</u></b>	<b>62</b>
1. Niveau des activités SOD basales au mois de mai (printemps) 1994	63
2. Effet de l'encagement	64
3. Comparaison des activités SOD sur moules originaires des deux sites témoins (ou considérés non contaminés)	64
4. Intoxication au laboratoire par du cuivre et du thiram	64
5. Transfert d'un site sain vers un site pollué (Figure 27)	65
a) Essai préliminaire	66
b) Essai définitif : (septembre-octobre 1995)	66

<b>II. Résultats des études de terrain et intoxication sur <i>Unio tumidus</i></b>	<b>67</b>
1. Activité basale de la SOD	67
2. Activité SOD dans deux sites de référence	69
3. Essais de mise en cage d' <i>Unio tumidus</i>	70
4. Intoxications au laboratoire des moules au cuivre et au thiram	72
5. Transfert vers un site pollué	73
a) Préliminaire	73
b) Essai définitif	74
<b>III. Discussion</b>	<b>76</b>
1. Niveaux des activités basales des superoxydes dismutases	76
2. Essais de transferts en milieux contaminés	80
a). Essais sur le terrain	80
b) Essais en laboratoire	81
3. Comparaison des activités basales avec les autres espèces	83
<b>CONCLUSION</b>	<b>86</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>88</b>

## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine 5'-diphosphate
AMP	Adénosine 5'-monophosphate
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
BaP	Benzo(a)pyrène
CuZn-SOD	Superoxyde dismutase à Cuivre et Zinc
DDC	Diéthylthiocarbamate
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DO	Densité optique
DTPA	Ethyleneglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N' tetraacetic acid
ECOD	Ethoxycoumarin <i>O</i> -Deethylase
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EROD	Ethoxyresorufin <i>O</i> -Deethylase
Fe-SOD	Superoxyde dismutase à Fer
G.D.	Glande digestive
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
Hepes	[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid
IL	Interleukine
MCLA	2-methyl-6-(p-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo [1,2-a] pyrazin-3-one
MFO	Mixed function oxygenase
Mn-SOD	Superoxyde dismutase à Manganèse
NADH	$\beta$ -nicotinamide-adénine dinucléotide (réduit)
NADPH	$\beta$ -nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate (réduit)
NBT	Nitro bleu tétrazolium
PCB	Polychlorobiphenyl
pCMB	p-Chloromercuribenzoic acid
pHi	pH isoélectrique
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
Se-GPx	Glutathion peroxydase sélénium dépendante
SOD	Superoxyde dismutase
TDB	Triéthanolamine-Diéthanolamine
TNF	Tumor Necrosis Factor
Tris	Tris-[hydroxymethyl]amino-méthane
U.E.	Unité enzymatique
XOD	Xanthine oxydase

## Liste des tableaux

- Tableau n° 1 : Principales espèces réactives de l'oxygène
- Tableau n° 2 : Métalloprotéines impliquées directement dans la transformation de l'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) ou de ses dérivés (Karlin, 1993)
- Tableau n° 3 : Modifications oxydatives des résidus d'acides aminés de protéines (Pardini, 1995)
- Tableau n° 4 : Enzymes qui sont inactivés par oxydation (Pardini, 1995)
- Tableau n° 5 : Localisation et inhibition des différents types de SOD :
- Tableau n° 6 : Toxines pro-oxydantes étudiées dans des systèmes biologiques de mammifères (Ahmad, 1995)
- Tableau n° 7 : Modifications de l'activité SOD chez des organismes aquatiques exposés à des pollutions métalliques en fonction de la dose, de la durée de l'intoxication et de l'organe étudié. Les variations de l'activité catalasique sont reportées pour comparaison
- Tableau n° 8 : Réponse de la SOD chez des organismes aquatiques exposés à des pollutions de type organique en fonction des conditions d'exposition et de l'organe étudié. Les variations de l'activité catalasique sont reportées pour comparaison
- Tableau n° 9 : Méthodes indirectes de dosage des activités SOD : modes de production des radicaux et conditions du suivi de l'utilisation de ces radicaux
- Tableau n° 10 : Quantités de SOD équivalentes à 1 U.E., calculées à partir de gammes étalon de CuZn-SOD et réalisées en présence de différentes concentrations en EDTA/MnCl<sub>2</sub>
- Tableau n° 11 : Valeurs moyennes et coefficients de variation de la pente de la droite d'auto-oxydation du pyrogallol dans du tampon Tris/HCl et du tampon Tris/Acide cacodylique à pH 8,2 et en absence de DTPA.
- Tableau n° 12 : Pourcentages d'inhibition par la SOD de l'oxydation du NADH (méthode de Paoletti) ou de l'auto-oxydation du pyrogallol (méthode de Marklund)
- Tableau n° 13 : Nombre d'unités enzymatiques de CuZn-SOD qu'il faut ajouter à la fraction tissulaire pour atteindre une unité enzymatique dans la cuve. Les dosages sont faits par la méthode de Paoletti & al. (1986) sur S12000 et C12000 de glandes digestives et de branchies
- Tableau n° 14 : Nombre d'unités mesuré sur de la SOD commerciale, dans une fraction (S12000 ou C12000) ou sur le mélange des deux. Dosages par la méthode de McCord & Fridovich sur glandes digestives et branchies, évaluation du nombre d'unités la méthode d'Asada & al. (1974)
- Tableau n° 15 : Activités spécifiques pour un S12000 préparé en présence ou en absence de PMSF ou de tampon Sérine-borate

- Tableau n° 16 : Activités spécifiques de S12000 et C12000 de branchies mesurées avant et après passage sur gel Séphadex (U/mg protéines)
- Tableau n° 17 : Activités et protéines contenues dans la fraction avant et après microconcentration
- Tableau n° 18 : Pourcentages d'inhibition de la SOD (100 ng/ml cuve) après exposition une heure au cyanure en fonction de la concentration en inhibiteur et de la température d'incubation de l'enzyme
- Tableau n° 19 : Pourcentages d'inhibition de la réaction d'oxydation du NADH en fonction des concentrations en CN- finales (= dans la cuve). L'incubation de la CuZn-SOD (6000 ng/ml) a duré deux heures à 37°C
- Tableau n° 20 : Evaluation du pourcentage de l'activité enzymatique due à la CuZn-SOD dans les S12000 de glandes digestives chez *Unio tumidus*. Cette évaluation a été faite lors des essais de transfert d'un site sain vers un site pollué. Les dosages ont été réalisés en triplicat par la méthode de McCord et Fridovich en présence ou absence de KCN 2 mM
- Tableau n° 21 : Comparaison des activités spécifiques trouvées dans le S500, le C500 et le S12000 de glande digestive d'*Unio tumidus*
- Tableau n° 22 : Comparaison des activités enzymatiques mesurées à partir d'un culot 12000 g centrifugé à 500 g, cinq minutes et centrifugé à 12000 g pendant dix minutes
- Tableau n° 23 : Activités spécifiques déterminées dans le C12000 et le CC12000
- Tableau n° 24 : Activités spécifiques et proportions des activités contenues dans les différentes fractions de glandes digestives chez *Unio tumidus* après exposition ou non dans la Fensch. Dosage par la méthode de Paoletti & al. (1986)
- Tableau n° 25 : Récapitulatif des activités SOD chez les mâles et les femelles du site témoin 2 en mai 1994
- Tableau n° 26 : Récapitulatif des activités spécifiques mesurées dans le S12000 et des activités totales (S12000 + C12000) chez des individus témoins = niveaux de base. Les dosages ont été réalisés par la méthode de Paoletti ou la méthode de McCord et Fridovich
- Tableau n° 27 : Mesures des activités spécifiques et totales de la SOD par les méthodes de Paoletti et de McCord et Fridovich. Comparaison d'individus provenant de deux sites témoins (mois de septembre 1995)
- Tableau n° 28 : Résultats des essais d'intoxication au cuivre (30 µg/l) et au thiram (100 µg/l) sur *Unio tumidus* pendant trois jours.
- Tableau n° 29 : Variations des paramètres entre J0 et J8 chez des moules transférées ou non dans la Fensch.
- Tableau n° 30 : Variations des paramètres à J15 et J30 chez *Unio tumidus* transférés ou non dans la Fensch pendant 15 et 30 jours.

Tableau n° 31 : Résultats condensés des analyses de micropolluants effectuées sur la fraction inférieure à 1 mm de sédiments des sites étudiés lors des transferts d'*Unio tumidus* pendant un mois en amont et en aval de la cokerie

Tableau n° 32 : Protocoles de préparation des fractions et méthodes de dosage utilisées par différents auteurs pour évaluer l'activité SOD

## Liste des figures

- Figure n° 1 : Configurations électroniques pour différents états d'excitation et de réduction de l'oxygène. (Halliwell & Gutteridge, 1990)
- Figure n° 2 : Principales réactions de création, consommation, et interconversion des espèces réactives de l'oxygène. (Khan & Wilson, 1995)
- Figure n° 3 : Réactions d'Haber-Weiss et de Fenton
- Figure n° 4 : Systèmes biologiques de défenses antioxydantes (d'après Kehrer, 1993)
- Figure n° 5 : Mécanisme de dismutation des radicaux superoxyde au niveau du site actif de la CuZn-SOD (Kaim & Rall, 1996)
- Figure n° 6 : Régulation de gènes lors de stress oxydatifs chez *E.coli*
- Figure n° 7 : Principales étapes pour passer de l'ADN aux protéines
- Figure n° 8 : Formules de dithiocarbamates
- Figure n° 9 : Voies de transformation des xénobiotiques en métabolites et radicaux oxygénés toxiques catalysées par les enzymes du système des MFO (Lemaire & Livingstone, 1993)
- Figure n° 10 : Principes des méthodes indirectes de dosage de la SOD
- Figure n° 11 : Répartition d'Unionidaes en Europe (Nagel, 1988)
- Figure n° 13 : Méthode de Paoletti & al. (1986)
- Figure n° 14 : Schéma pour le dosage par la méthode de Marklund & Marklund (1974)
- Figure n° 15 : Schéma pour le dosage selon la méthode de Bioxytech
- Figure n° 16 : Dosage par la méthode de McCord et Fridovich (1969): méthode au cytochrome c
- Figure n° 17 : Représentation selon Asada & al. (1974)
- Figure n° 18 : Représentation des activités mesurées par la méthode de McCord & Fridovich (1969) dans le S12000 et le C12000 de glandes digestives. Le nombre d'unités enzymatiques est déduit après transformation d'Asada & al. (1974)
- Figure n° 19 : Activités totales contenues dans les glandes digestives et les branchies de six moules *Unio tumidus*. Ces activités totales représentent la somme des activités mesurées dans le S12000 et le C12000 par la méthode de McCord et Fridovich (1969) ou par la méthode de Paoletti & al. (1986)
- Figure n° 20 : Comparaison de la méthode de McCord & Fridovich et de la méthode de Paoletti. Représentation du nombre d'unités dans 100  $\mu$ l mesurées par les deux méthodes dans les glandes digestives et dans les branchies au niveau du S12000 et du C12000

- Figure n° 21 : Activités spécifiques mesurées selon la méthode de Paoletti et la méthode de McCord & Fridovich, sur glandes digestives dans le S12000
- Figure n° 22 : Dissection d'un *Unio* adulte (d'après Maaß, 1987)
- Figure n° 23 : Préparation de l'homogénat avant dosages
- Figure n° 24 : Préparation de l'échantillon pour le dosage SOD et le dosage des protéines
- Figure n° 25 : Schéma du microconcentrateur MICROSEP (Filtron)
- Figure n° 26 : Visualisation de l'activité superoxyde dismutase de *Unio tumidus* après isoélectrofocalisation sur gel de polyacrylamide (pH 3-10)
- Figure n° 27 : Schéma des transferts en amont et en aval d'une cokerie
- Figure n° 28 : Activités spécifiques mesurées par la méthode de Paoletti & al. (1986) dans les glandes digestives et les branchies d'*Unio tumidus* originaires des sites témoins 1 et 2
- Figure n° 29 : Activités spécifiques mesurées au mois de mai dans les glandes digestives et les branchies de femelles et de mâles d'*Unio tumidus* du site témoin 2
- Figure n° 30 : Activités spécifiques contenues dans les S12000 et C12000 de glandes digestives d'*Unio tumidus*. Ces moules originaires du site témoin 2 ont été laissées libres sur place, encagées dans le site témoin 2 ou encagées et transférées dans le site témoin 1 pendant quinze jours
- Figure n° 31 : Activités totales (S12000 + C12000) contenues dans les glandes digestives d'*Unio tumidus*. Ces moules originaires du site témoin 2 ont été laissées libres sur place, encagées dans le site témoin 2 ou encagées et transférées dans le témoin 1 pendant quinze jours
- Figure n° 32 : Activités spécifiques sur glandes digestives, branchies, et activités totales chez *Unio tumidus* exposés en laboratoire au cuivre, au thiram et à un mélange des deux
- Figure n° 33 : Activités spécifiques et activités totales mesurées dans les glandes digestives et les branchies d'*Unio tumidus* (trois individus par condition). Les moules ont été encagées et soit laissées sur place au site témoin 1, soit transférées au site aval 1 ou aval 2 pendant une semaine au mois de juillet
- Figure n° 34 : Activités spécifiques et activités totales SOD mesurées chez *U. tumidus* après exposition dans un cours d'eau contaminé par des métaux, HAP et PCB

## Liste des annexes

- Annexe n° 1 : Dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976)
- Annexe n° 2 : Compositions des solutions nécessaires à la coloration du gel
- Annexe n° 3 : Représentation de trois espèces d'*Unio* (Maaß, 1987)
- Annexe n° 4 : Analyses réalisées sur la fraction inférieure à 1 mm des sédiments des deux sites témoins
- Annexe n° 5 : Composition du milieu LC (Lefevre-Czarda) d'après la norme AFNOR T 90304, (1980)
- Annexe n° 6 : Activités spécifiques et totales de moules originaires du site témoin 2 restées libres, encagées sur place ou encagées et transférées pendant quinze jours dans le site témoin 1
- Annexe n° 7 : Valeurs des activités spécifiques et totales obtenues sur *Unio tumidus* après intoxication au laboratoire pendant trois jours avec du cuivre (30 µg/l), du thiram (100 µg/l) ou un mélange des deux produits. Les mesures ont été effectuées sur les glandes digestives et sur les branchies.
- Annexe n° 8 : Activités spécifiques et activités totales mesurées sur glandes digestives et branchies d'*Unio tumidus*. Les moules ont été encagées et transférées en amont et en aval d'une cokerie. Trois individus qui provenaient du site été laissés sur place. La moyenne (m) et l'écart type (s) de trois dosages d'activité sont données pour chaque animal.
- Annexe n° 9 : Activités spécifiques de la SOD mesurées dans les glandes digestives et branchies d'*Unio tumidus* exposés dans un cours d'eau pendant quinze jours ou un mois à des métaux, HAP et PCB .
- Annexe n° 10 : Analyses réalisées sur la fraction inférieure à 1 mm des sédiments des cinq sites étudiés. Pour tous les sédiments, les pesticides organochlorés et les chlorophénols sont présents en quantités inférieures aux limites de détection

# **INTRODUCTION**

## Introduction

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une recherche de biomarqueurs pouvant être utilisés pour détecter des effets à long terme de polluants sur des écosystèmes dulçaquicoles. Un biomarqueur consiste en une réponse biologique précoce qui témoigne de l'exposition à des polluants et parfois aussi de leur effet toxique. La recherche de biomarqueurs s'est développée en vue de prévenir et éviter des modifications des peuplements hydriques soumis à des pollutions.

Un biomarqueur doit être sensible et facilement mesurable. Le système des MFO est fréquemment utilisé comme biomarqueur, il répond par exemple à la présence de HAP et de molécules organochlorées dans l'environnement. Les systèmes antioxydants cellulaires sont indispensables à l'équilibre physiologique des organismes aérobies et leur altération peut conduire à des désordres au sein des cellules. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés à ces systèmes, partant de l'hypothèse qu'ils pourraient traduire une exposition voire une adaptation des individus à des polluants, une inhibition pouvant être à l'origine d'effets toxiques.

Les stress oxydants peuvent avoir un impact sur la survie des organismes. Les lésions causées par des espèces réactives de l'oxygène peuvent conduire à la mort cellulaire si elles ne sont pas réparées. Des enzymes qui neutralisent les espèces réactives comme les radicaux superoxyde ou peroxyde et des substances réductrices comme le glutathion réduit permettent le maintien de l'intégrité des cellules.

Nous avons personnellement étudié l'activité des superoxyde dismutases. D'autres chercheurs au laboratoire ont parallèlement évalué les niveaux de la catalase, glutathion peroxydase et réductase, des formes oxydées et réduites du glutathion ainsi que du malonaldéhyde représentatif de la lipoperoxydation .

L'étude a été faite sur des Unionidaes, mollusques d'eau douce qui sont bien représentés en France. La moule qui s'enfonce dans le sédiment filtre à l'interface eau-sédiment, ce qui est

aussi un point intéressant pour l'étude de l'effet de sédiments contaminés. De plus, ces animaux se déplacent très peu, ce qui facilite les essais de transfert avec encagement.

Cette recherche a consisté d'abord à choisir une méthode de dosage de la SOD, puis nous avons cherché à connaître les niveaux d'activité et les variations individuelles en fonction de facteurs physiologiques (sexe, période de reproduction) et saisonniers. L'effet de polluants a été étudié ensuite.

Avant d'entreprendre des études sur sites, nous avons vérifié que l'encagement n'avait pas d'influence sur les activités mesurées. Nous avons ensuite entrepris des essais de transfert de sites sains vers des sites contaminés par des HAP, PCB et métaux. Des expositions au cuivre et au thiram ont par ailleurs été menées au laboratoire.

# **I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

Tableau n° 1 : Principales espèces réactives de l'oxygène

Dénomination	Formule	Remarques	demi-vie
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$	Bon réducteur, faible oxydant	$10^{-6}$ s
Radical Hydroxyl	$\cdot OH$	Extrêmement réactif (addition, élimination, transfert d'électrons), très faible distance de diffusion	$10^{-9}$ s
Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$	Bon oxydant, petite molécule, stable	
Radical Alkoxyl	$RO\cdot$	Réactivité avec lipides entre celle de $ROO\cdot$ et celle de $HO\cdot$	$10^{-6}$ s
Radical Peroxyl	$ROO\cdot$	Faibles capacités oxydantes par rapport à $OH\cdot$ mais forte diffusibilité	$10^{-2}$ s
Radical Hydroperoxyl	$HOO\cdot$	Meilleur oxydant que $O_2^{\cdot-}$ mais quand même moyennement réactif (peut attaquer directement les acides gras)	
Dioxyde d'azote	$NO_2\cdot$		
Oxyde nitrique	$\cdot NO$	A partir de L-arginine oxydée par la nitrique oxyde synthétase constitutive ou inductible	
Peroxyde d'azote	$ONOO^-$	Formé à partir de superoxyde avec l'oxyde nitrique. Assez longue demi-vie, rayon de diffusion important. Fort oxydant des lipides et autres molécules biologiques. Liaison O-O assez faible, sa rupture donne $\cdot NO_2$ et des intermédiaires très réactifs.	
Radical sulfonyl	$RSO\cdot$		
Rdl.thiyl peroxy	$RSOO\cdot$		
Acide hypochlorique	$HOCl$	$OCl^-$ : formé par la myéloperoxydase. C'est un oxydant fort. Peut être à la source de $^1O_2$ .	
Ozone	$O_3$		
Oxygène singulet	$^1O_2$	$H_2O$ et $O_2^{\cdot-}$ sont des quencher de $^1O_2$ qui attaque des composés insaturés pour former des peroxydes et des hydroperoxydes.	$10^{-6}$ s

## 1ère partie : étude bibliographique

### I. Espèces réactives de l'oxygène

#### 1. Toxicité de l'oxygène

L'oxygène, par sa capacité à oxyder d'autres molécules, peut aussi bien se révéler utile que néfaste à la vie, empêchant le développement des organismes anaérobies strictes. Il peut aussi se montrer toxique pour les organismes aérobies lorsqu'il est sous forme activée.

Des bactéries aux eucaryotes supérieurs, tous les êtres, vivant en présence d'O<sub>2</sub> possèdent un système de détoxification des espèces réactives de l'oxygène. Ces espèces réactives toxiques sont formées en petite quantité dans des conditions physiologiques, mais peuvent aussi être formées lors de la métabolisation de certains composés chimiques, ou lors de modifications environnementales.

Les principales espèces réactives de l'oxygène, formées au cours de réductions successives de l'oxygène moléculaire, sont les suivantes (Tableau 1) :

- l'oxygène singulet <sup>1</sup>O<sub>2</sub>
- le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,
- l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>·-</sup>,
- le radical hydroxyle ·OH

(Wdzieczak & al., 1982, Byczkowski & Gessner, 1988)

Figure n° 1 : Configurations électroniques pour différents états d'excitation et de réduction de l'oxygène. (Halliwell & Gutteridge, 1990)

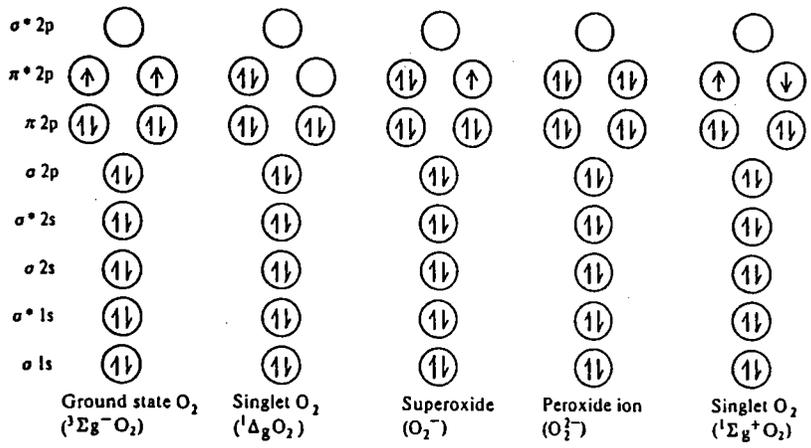
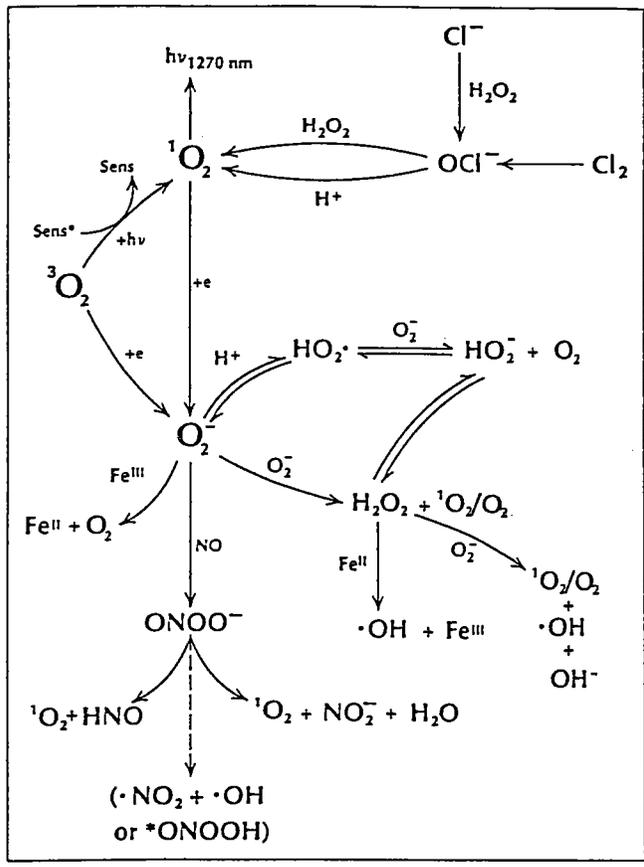


Figure n° 2 : Principales réactions de création, consommation, et interconversion des espèces réactives de l'oxygène. (Khan & Wilson, 1995)  
Sens\* = sensibilisateur



## 2. Formation des espèces réactives de l'oxygène :

### a) Processus généraux

L'oxygène moléculaire est une molécule paramagnétique (peut migrer dans un champ magnétique). Il possède sur sa couche électronique externe deux électrons non appariés de spins parallèles, ce qui lui confère une réactivité limitée, il est à l'état triplet. Dans cet état, il ne peut pas réagir avec des molécules diamagnétiques, mais il peut être réduit par un électron à la fois pour donner successivement  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  et  $H_2O$ .

L'excitation de  $O_2$  (par de l'énergie lumineuse par exemple) peut permettre son passage de l'état triplet à l'état singulet : l'un des électrons change de spin, la molécule obtenue, de demi-vie très brève est l'oxygène singulet de forme sigma ( $^1\Sigma_g^+O_2$ ). Cette molécule est rapidement transformée en oxygène singulet de forme delta ( $^1\Delta O_2$ ) : les deux électrons sont de spins antiparallèles et gravitent sur la même orbitale électronique (Figure 1). Bien que n'étant pas une espèce radicalaire, l'oxygène singulet peut réagir avec de nombreuses molécules organiques. La formation de l'oxygène singulet peut se faire lors de la dismutation de  $O_2^{\cdot-}$ , lors de la réaction de l'ion hypochloreux ou de l'anion peroxy-nitrique avec  $H_2O_2$  ou  $H^+$ .

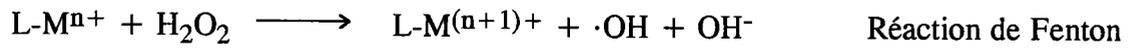
L'oxygène moléculaire peut accepter un électron pour donner  $O_2^{\cdot-}$  qui est une base faible et pourra être protoné en  $HO_2^{\cdot}$ ,  $HO_2^{\cdot}$  et  $O_2^{\cdot-}$  peuvent donner la forme basique du peroxyde d'hydrogène :  $HO_2^-$ . En milieu neutre ou acide, il sera sous forme  $H_2O_2$ . La formation de peroxyde d'hydrogène résulte cependant majoritairement de la dismutation spontanée ou enzymatique des anions superoxyde (Figure 2).

*In vivo*, en présence de peroxyde d'hydrogène et de radicaux superoxydes, on peut observer la production de radicaux hydroxyles plus réactifs que les radicaux superoxydes ; il s'agit de la réaction d'Haber-Weiss (Figure 3). Le réducteur peut être une molécule radicalaire ( $O_2^{\cdot-}$ , semiquinone, paraquat), ou une molécule réductrice de type thiol ou ascorbate.

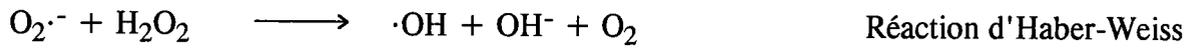
$H_2O_2$  est un oxydant qui peut traverser les membranes et peut participer à la réaction de Fenton pour générer le radical hydroxyl  $\cdot OH$ .  $\cdot OH$  est une molécule très réactive et provoque des dommages dans l'environnement immédiat de son lieu de création.

Souvent, le radical hydroxyl est considéré comme le principal responsable des effets délétères des produits de la réaction d'Haber-Weiss. Mais pour Halliwell et Gutteridge (1989), la toxicité des produits de cette réaction serait due à la formation d'oxygène singulet lors de la

Figure n° 3 : Réactions d'Haber-Weiss et de Fenton



Bilan si le réducteur R est  $\text{O}_2^{\cdot-}$  :



La réaction de Fenton est la source majeure de radicaux hydroxyle in vitro, par oxydation d'un métal (M) en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La réduction subséquente du métal (qui agit donc comme un catalyseur) par  $\text{O}_2^{\cdot-}$  donne pour bilan la réaction d'Haber-Weiss.

dismutation des radicaux superoxyde ou lors de la réaction d'Haber-Weiss. Cette hypothèse est confirmée par Khan & Kasha (1994) qui ont mis en évidence au cours de cette même réaction la génération d'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) en quantité importante. Cette molécule à demi vie relativement longue pourrait diffuser dans la cellule et oxyder des molécules éloignées.

En effet, l'oxygène singulet peut réagir directement avec des molécules insaturées (lipides membranaires, bases d'ADN,...) permettant l'initiation de réactions en chaîne (Parke, 1987) et la formation de peroxydes organiques.

Les espèces réactives de l'oxygène pourraient être considérées comme des seconds messagers permettant la réponse systémique acquise chez les plantes ou l'activation du facteur de transcription NF-kB dans les cellules animales (Khan et Wilson, 1995).

*In vivo*, la composition du milieu est très complexe et hétérogène ; il est très difficile voire quasi impossible de déterminer les intermédiaires formés lors des réactions de type Fenton (Goldstein & *al.*, 1993).

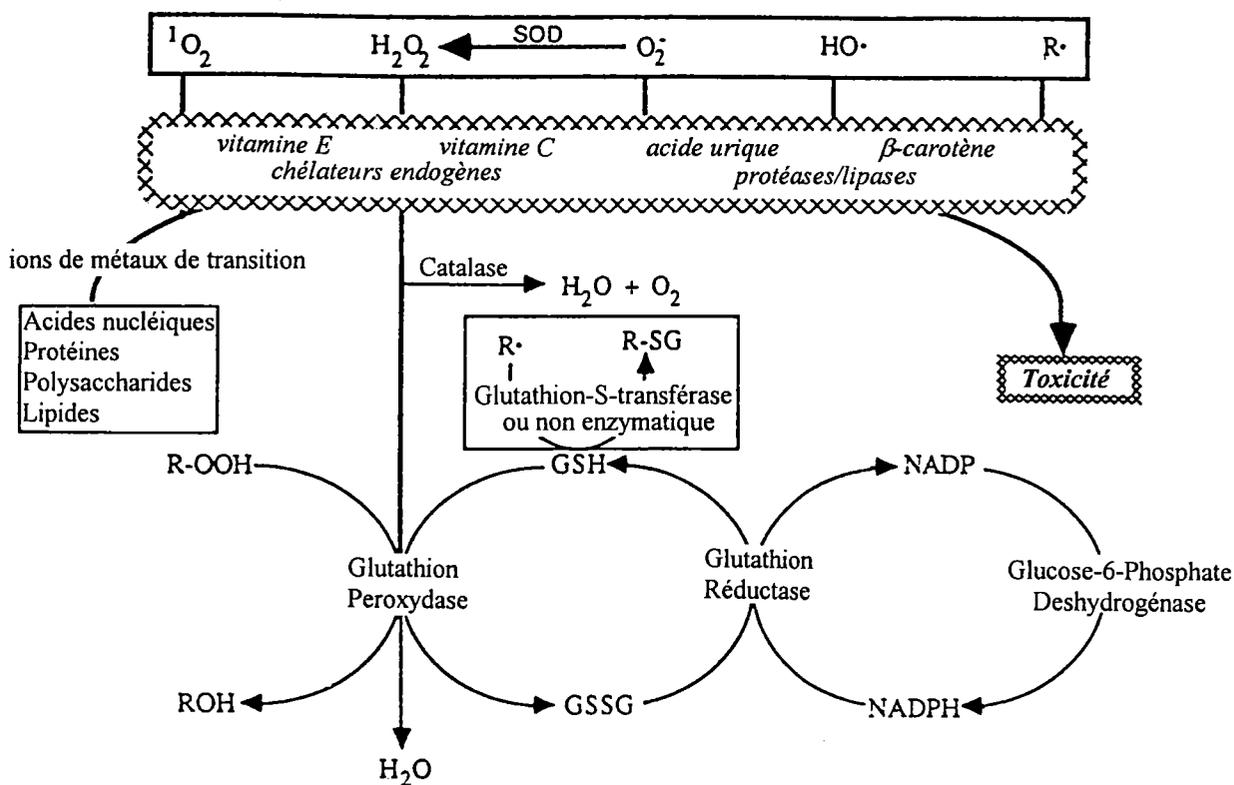
### ***b) Facteurs exogènes***

Un stress oxydatif peut être la conséquence de facteurs exogènes ou endogènes : parmi les facteurs exogènes, Rice-Evans (1994) cite les radiations ionisantes, la disponibilité trop importante des métaux de transition, les effets de composés à cycle rédox ainsi qu'un excès ou une augmentation de la pression en oxygène.

### ***c) Facteurs endogènes***

Les causes endogènes regroupent : une activation excessive des phagocytes, une rupture au niveau du transport mitochondrial des électrons avec fuite de ceux-ci, une activation du métabolisme de l'acide arachidonique, la délocalisation des métaux de transition ionisés et fuite des protéines héminiques ainsi que la réduction des enzymes de protection ou la diminution des capacités antioxydantes de la cellule. Le mécanisme générateur de dommages oxydatifs le plus souvent évoqué fait intervenir le radical hydroxyl  $\cdot\text{OH}$ , très réactif, qui initierait les réactions d'oxydation des lipides, protéines et ADN (Miller & *al.*, 1990).

Figure n° 4 : Systèmes biologiques de défenses antioxydantes (D'après Kehrer, 1993)



### 3. Effets cellulaires des espèces réactives

Les espèces réactives de l'oxygène sont des molécules instables très réactives provoquant, au niveau cellulaire, des dommages graves et souvent irréversibles tels que :

- attaque de protéines, particulièrement au niveau de leurs groupements thiol ou de leur site catalytique lorsqu'il contient un métal (perte de leur fonctionnalité),
- peroxydation des lipides insaturés entraînant une perte de la fluidité, une perte de la perméabilité selective des membranes avec fragilisation de celles ci,
- oxydation des acides nucléiques, conduisant à des cassures de l'ADN, ARNm et ARNt ou à des modifications du message génétique.

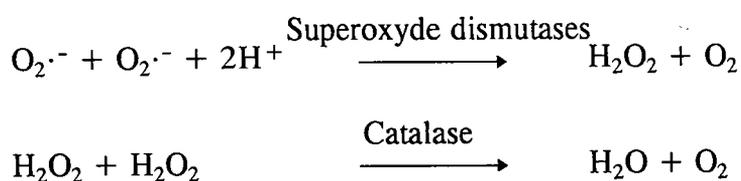
Cependant, ces espèces réactives contribuent à la défense de l'organisme contre des facteurs exogènes, lors du processus de phagocytose par exemple.

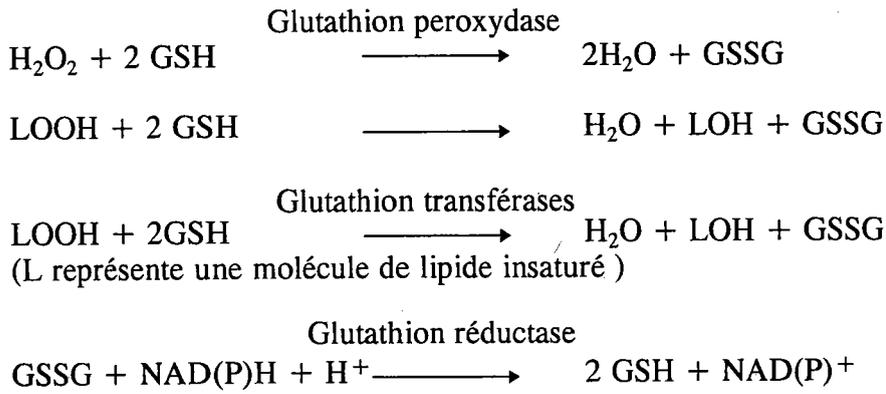
### 4. Les moyens de protection des organismes vivants aérobies

Face au stress oxydant, les organismes aérobies ont développé des systèmes de protection représentés par les enzymes d'une part, des substances antioxydantes d'autre part. (Figure 4)

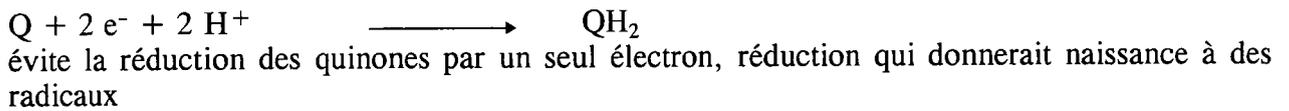
#### a) Les enzymes

Les enzymes connues impliquées dans la lutte contre le stress oxydant catalysent les réactions suivantes :





DT diaphorase (=quinone réductase)



la glucose-6-phosphate deshydrogénase : régénère le NAD(P)H

les protéases antioxydantes

l'hème oxygénase : dégrade les hémoprotéines en pigments biliaires qui se comporteront comme des antioxydants. (Ichikawa, 1994)

### ***b) Les substances antioxydantes***

Les substances antioxydantes participant à la protection des organismes aérobies sont :

les protéines qui permettent le transport ou le stockage des métaux de transition (albumin, céruloplasmine, métallothionéines, ferritines,...),

le glutathion,

les vitamines A, E et C,

des chélateurs comme la deferrodoxamine par exemple,

des molécules telles que l'urée, le mannitol, les flavonoïdes,

(Halliwell & Gutteridge, 1990 ; Pardini, 1995).

Tableau n° 2 : Métalloprotéines impliquées directement dans la transformation de l'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) ou de ses dérivés. (Karlin, 1993)

	Heme Fe	Non-heme Fe	Cu	Mn and V
Dioxygen transport $DM^{n+}O_2 \rightleftharpoons M^{(n+1)}(O_2^{D-})$	Hemoglobin* Myoglobin*	Hemerythrin* Myohemerythrin	Hemocyanin*	
Monooxygenases $X + O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow XO + H_2O$	Cytochrome P-450 monooxygenase* Secondary amine monooxygenase NO synthase	Soluble MMO Pteridine-dependent hydroxylases (Phe, Tyr, and Trp)	Tyrosinase Dopamine β-hydroxylase Phenylalanine hydroxylase Peptidylglycine α-amidating monooxygenase Particulate MMO	
Dioxygenases $X + O_2 \rightarrow XO_2$	Indoleamine 2,3-dioxygenase Tryptophan 2,3-dioxygenase Prostaglandin H synthetase	Lipoxygenase* Catechol dioxygenases*† α-Ketoglutarate-dependent dioxygenases Arene dioxygenases‡	Quercetinase	
Oxidases $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$	Cytochrome c oxidase	Ribonucleotide reductase* Clavaminatase synthase Isopenicillin N synthase	Cytochrome c oxidase Laccase Ascorbate oxidase* Phenoxazinone synthase Galactose oxidase* Amine oxidase	Ribonucleotide reductase (Mn) Photosystem II§ 2H <sub>2</sub> O → O <sub>2</sub> ; Mn cluster
$XH_2 + O_2 \rightarrow X + H_2O_2$				
Peroxidases and catalases $H_2O_2 + XH_2 \rightarrow X + 2H_2O$	Catalase* Horseradish peroxidase Cytochrome c peroxidase*			Mn catalase* V bromoperoxidase
$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$	Chloroperoxidase (XH + Cl <sup>-</sup> → XCl) Lignin peroxidase* Prostaglandin H synthetase			Mn peroxidase
Superoxide dismutases $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$		Fe SOD*	Cu-Zn SOD*	Mn SOD*

\*Structural data from x-ray crystallographic studies are available. †Such as protocatechuate-3,4-dioxygenase. ‡Substrates such as benzene or phthalate. §Water oxidation involves a tetramanganese cluster, also requiring Ca<sup>2+</sup> and Cl<sup>-</sup>.

### ***c) Importance des métaux***

Parmi les métaux, seuls les métaux de transition sont actifs sur le plan rédox et sont de potentielles sources de radicaux. L'ion métallique en quantité la plus importante dans la cellule est le cuivre. L'implication du cuivre comme celle du fer dans les processus cellulaires est très importante. Il intervient par exemple dans la structure de protéines ayant un rôle d'oxygénase ou oxydase (Tableau 2).

En milieu biologique, le fer ferreux n'existe pas à l'état libre hydraté. Le phosphate inorganique ainsi que certains acides aminés se complexent aussi aux ions ferriques et ferreux. Le fer chélaté par de l'ATP, ADP ou AMP pourra participer à des réaction de Fenton avec formation de radicaux libres alors que lorsqu'il est lié à la transferrine, le fer est bien protégé et n'est pas impliqué dans la formation de  $\cdot\text{OH}$ . Le potentiel rédox d'un métal donné est contrôlé par le type de ligand impliqué, son orientation, la délocalisation des électrons à travers ce ligand. L'EDTA chélate le fer mais pas assez fort pour empêcher ses électrons de participer à la réaction de Fenton alors que le DTPA est beaucoup plus efficace.

Certaines molécules biologiques peuvent s'auto-oxyder en présence d'oxygène moléculaire pour donner naissance à  $\text{O}_2\cdot^-$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou les deux. Ces molécules peuvent être l'ascorbate, la cystéine, la dopamine, l'épinéphrine, les flavines le glutathion ou l'acide homogénéisique. En réalité, il ne s'agit pas d'une réelle autooxydation mais d'un processus catalysé par des métaux (Miller & *al.*, 1990).

### **II. Les superoxyde dismutases : (EC 1.15.1.1)**

Leur activité catalytique a été découverte en 1969 par McCord et Fridovich qui avaient isolé la CuZn-SOD à partir d'érythrocytes bovins ; auparavant, la CuZn-SOD avait été identifiée en tant que érythrocupréine, hépatocupréine, en fonction de sa provenance.

Tableau n° 3 : Modifications oxydatives des résidus d'acides aminés de protéines  
(Pardini, 1995)

Amino acid residues	Modified residues
Lys, Arg, Pro	Carbonyl
Histidyl	Asparaginyll
Arginyl, Prolyl	Glutamylsemialdehyde
Prolyl	Glutamyl, pyroglutamyl
Lysyl	2-amino adipylsemialdehyde
Methionyl	Methionine sulfoxamide
Cysteinyll	Disulfide derivative
	Mixed disulfides
	Protein to protein crosslinks

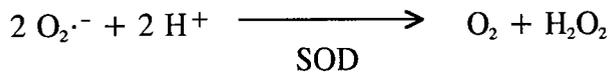
Tableau n° 4 : Enzymes qui sont inactivés par oxydation (Pardini, 1995)

Acetyl CoA hydrolase	Hexokinase
Acetylcholine esterase	Lactic hydrogenase
Albumin	Lactoperoxidase
Alkaline phosphatase	Leucyl-t-RNA synthetase
Alcohol dehydrogenase	Lysozyme
Carbamoly-P synthetase	Ornithine decarboxylase
Catalase	6-phosphogluconate dehydrogenase
Creatine kinase	Phosphoglucomutase
Enolase	$\alpha$ -1-Proteinase inhibitor
Fructose diphosphatase	Phosphogluclomutase
Glucose-6-P dehydrogenase	Pyruvate dehydrogenase
Glutamine dehydrogenase	Ribnuclease A and B
Glutamine synthetase	Superoxide dismutase
Glyceraldehyde dehydrogenase	Tyrosyl-t-RNA-synthetase

\*Data from Floyd and Carney (1993).

## 1. Rôle, utilité :

Les SOD constituent une famille d'enzymes qui catalysent la dismutation des radicaux superoxydes selon la réaction :



En l'absence de catalyseur cette réaction se fait avec une constante de vitesse de  $4,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  (Cadenas, 1989). En présence de superoxyde dismutase, cette constante de vitesse passe à  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  pour la CuZn-SOD et à environ dix fois moins ( $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ) pour la Mn-SOD (Riley & Weiss, 1994).

Le radical superoxyde n'est pas réactif vis-à-vis de la plupart des molécules organiques et n'est pas un oxydant à pH neutre. Il est très soluble dans l'eau et ne peut pas être transporté à travers les membranes ou pénétrer dans les régions hydrophobes pour peroxyder les lipides (Khan et Wilson, 1995). Il est tout de même réactif vis-à-vis de certaines protéines :  $\text{O}_2^{\cdot-}$  réagira par la réaction d'Haber-Weiss avec des protéines contenant un métal de transition au niveau de leur groupe prosthétique (groupement héminique ou centre sulfure-fer). La réaction médiée par le métal de transition résulte en le dommage de l'acide aminé le plus proche du métal, avec perte de la fonction de la protéine. Des modifications oxydatives d'acides aminés sont données tableau 3. Les protéines susceptibles d'être inactivées par oxydation sont assez nombreuses (Tableau 4).

L'utilité des superoxyde dismutases serait d'interrompre la chaîne de synthèse d'espèces encore plus réactives et donc plus néfastes pour l'organisme (Khan et Wilson, 1995).

Les radicaux superoxyde peuvent être utiles pour lutter contre des agents pathogènes, utiles pour favoriser la division cellulaire au niveau de sites d'inflammation, utiles pour interrompre les réactions de lipoperoxydation. Mais un léger dérèglement dans le contrôle d'un stress oxydatif modéré pourra conduire à la destruction de tissus (inflammation), à la prolifération cellulaire (avec transformation en cellules malignes), à une lipoperoxydation accrue, ou à l'apoptose (mort cellulaire programmée).

Il a été observé que d'autres molécules que les superoxyde dismutases étaient capables de catalyser la dismutation des radicaux superoxydes. La dismutation est réalisée grâce à un métal qui est le plus souvent le cuivre ou le fer. Le manganèse peut aussi être utilisé pour mimer la SOD.

\* la carnosine ou l'homocarnosine, en présence de cuivre (Kohen & *al.*, 1991),

\* le fer chélaté par du TPEN (tétrakis-N,N,N',N'(2-pyridylméthyl) éthylènediamine) ou du TPAA (tris(N-(2-pyridylméthyl)-2-aminoéthyl) amine) (Nagano & *al.*, 1989).

\*  $\text{CuPu(Py)}_2$  : ( $\{[\text{N,N}'\text{-bis(2-pyridylméthylène)-1,4-butanediamine}](\text{N,N}',\text{N}'',\text{N}''')\}\text{-Cu}^{2+}$ ) (Miesel & Haas, 1993 ; Nagele & *al.*, 1994)

Ainsi, les métaux et le fer en particulier, peuvent agir dans la cellule en permettant la production de radicaux ou leur élimination selon leur état d'ionisation et leur ligand.

Le fer chélaté par l'EDTA ou l'EGTA participera à la réaction de Fenton, alors que s'il est chélaté par du desféral ou du DTPA, il restera inerte (Graf & *al.*, 1984).

## 2. Répartition, caractéristiques :

Les superoxyde dismutases sont des métalloenzymes, que l'on peut classer en trois familles selon le métal situé au niveau du site actif : CuZn-SOD

Mn-SOD

Fe-SOD

L'abondance des différents types de SOD n'est pas la même selon les organismes considérés (Tableau 5).

### a) Organismes procaryotes

Bien que les trois types de SOD aient été identifiés chez les bactéries, ce sont la Mn et la Fe-SOD qui sont généralement isolés à partir de ces organismes. Chez les anaérobies stricts, on trouve une SOD à Fer, dimérique (1Fe/s.u) de 41 KD environ. Chez les organismes aérobies facultatifs, ou stricts, on remarque l'apparition de Mn-SOD dimérique, trimérique ou

Tableau n° 5 : Localisation et inhibition des différents types de SOD :

Organismes procaryotes	Localisation	Sensibilité (inhibition)
Mn-SOD	proche de l'ADN	solvants organiques, SDS, $N_3^-$
Fe-SOD	proche de la membrane interne	$H_2O_2$ , $N_3^-$
CuZn-SOD	périplasmique	Cyanure
<b>Organismes eucaryotes</b>		
Mn-SOD	Mitochondries	Solvants organiques, SDS, $N_3^-$
	Membrane peroxysomes	
	Glyoxysomes	
Fe-SOD	Chloroplastes	$H_2O_2$ , $N_3^-$
CuZn-SOD	Cytosole	Cyanure  DDC (ou chélateurs du Cu)  $N_3^-$
	Matrice peroxysomes	
	Lysosomes	
	Espace intermembranaire mitochondriale	
	Chloroplastes	
	Glyoxysomes	
EC.CuZn-SOD	Extracellulaire (Plasma)	Cyanure

tétramérique de PM allant de 37 KD (*Rhodopseudomonas spheroides*) à 82 KD (*Thermus thermophilus HB8*) (Steinman, 1985).

Chez *E.coli*, les trois types enzymatiques ont été isolés, leur rôle seraient complémentaires :

- La CuZn-SOD de *E.coli* est toujours très minoritaire par rapport aux deux autres SOD et est inductible par l'oxygène. La forme isolée par Battistoni et Rotilio (1995) est monomérique et stable à la chaleur. La CuZn-SOD est périplasmique (Benov et al., 1995 ; Kroll & al., 1995) et pourrait protéger la bactérie contre les flambées respiratoires ou réactions phagocytaires de leur organisme hôte. Selon une étude phylogénétique réalisée par Kroll & al. (1995), la présence de CuZn-SOD chez des organismes procaryotes ne serait pas due à un transfert de gène : la divergence entre les deux CuZn-SOD à partir d'un gène ancestral serait beaucoup plus ancienne.

La Mn-SOD et la Fe-SOD sont de structures très voisines : chez *E.coli*, leur site actif comporte 3 histidines et 1 résidu aspartate capables de se lier au métal (Fe ou Mn) (Stallings & al., 1985 et Carlioz & al., 1988 : cités par Beyer & al., 1991).

- La Mn-SOD serait plus efficace que la Fe-SOD pour protéger l'ADN contre les radicaux libres (Hopkin & al., 1992) : sa localisation est similaire à celle de l'ADN et Steinman & al., 1994 montrent la capacité de l'enzyme à se lier à cet ADN. La Fe-SOD resterait concentrée près de la membrane interne et intercepterait les radicaux formés à ce niveau (Kroll & al., 1995 ; Steinman & al., 1994).

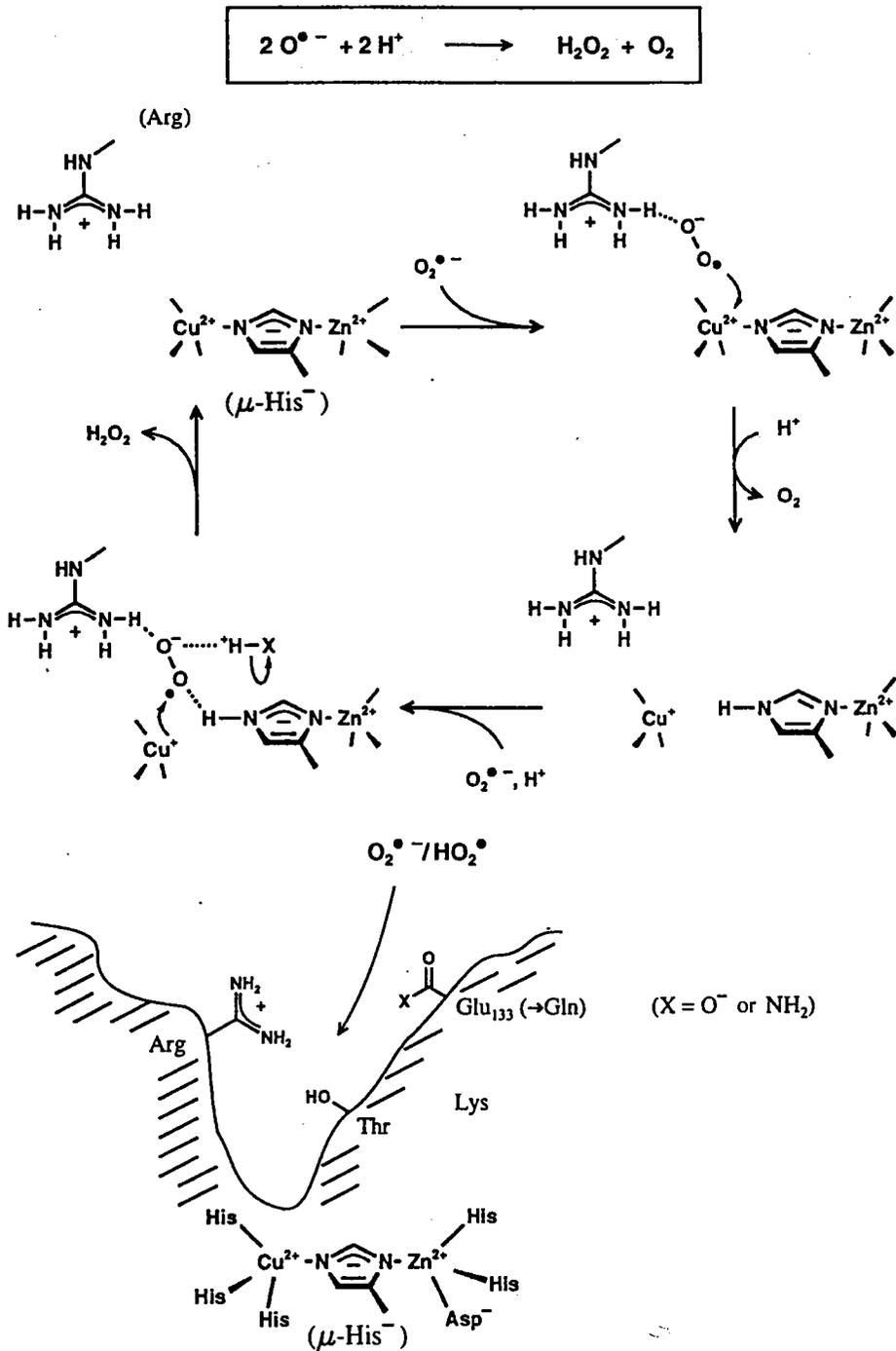
#### **b) Organismes eucaryotes**

Chez les eucaryotes, deux types majeurs d'enzymes ont été identifiés :

La SOD la plus abondante dans le cytosol des cellules eucaryotes est la CuZn-SOD. Cette protéine dimérique contient un atome de cuivre et un atome de zinc par sous-unité. Son poids moléculaire est de l'ordre de 31 à 33 KD (Steinman, 1985).

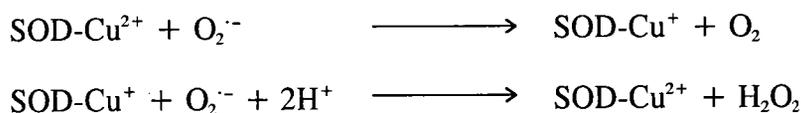
- La CuZn-SOD est présente dans le cytosol, au niveau de la matrice des peroxysomes (Dhaunsi & al., 1993, Elstner & Osswald, 1994), dans les lysosomes (Geller & Winge, 1984), ainsi que dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Weisiger & Fridovich 1973). Chez les plantes on la trouve aussi au niveau des chloroplastes, liée aux thylakoides ou libre dans le

Figure n° 5 : Mécanisme de dismutation des radicaux superoxyde au niveau du site actif de la CuZn-SOD (Kaim & Rall, 1996)



stroma (Halliwell & Gutteridge, 1989). Selon Elstner & Osswald (1994) les glyoxysomes en contiennent aussi.

La dismutation des  $O_2^{\cdot-}$  par la CuZn-SOD se décompose en deux étapes (mécanisme ping-pong) (Goldstein et Czapski, 1991)



(Götz & *al.*, 1980)

La diminution des  $O_2^{\cdot-}$  se fait selon une cinétique de second ordre.

Le mécanisme de dismutation est décrit plus précisément figure 5 par Kaim & Rall (1996)

Le cuivre est successivement réduit et oxydé en présence de  $O_2^{\cdot-}$ .

Le site catalytique de la CuZn-SOD comporte un atome de cuivre, stabilisé par quatre résidus histidine dont l'un sert de lien entre les deux métaux. Le site est stabilisé par deux autres histidines et par un résidu aspartate (Banci & *al.*, 1994). Les radicaux  $O_2^{\cdot-}$  sont dirigés vers le cuivre grâce à une région électrostatique dont certains acides aminés sont très conservés (Djinovic & *al.*, 1992). L'activité enzymatique dépendant de l'accessibilité du cuivre aux radicaux, elle peut être diminuée en présence de fortes forces ioniques (DeFreitas & Valentine, 1984).

La CuZn-SOD est inhibée de manière réversible par le cyanure (Yim & *al.*, 1990) et inactivée par  $H_2O_2$  (Bray & *al.*, 1974) qui attaque irréversiblement le site actif avec modification d'une histidine ; le phenylglyoxal peut être utilisé pour modifier l'arginine du site actif de la CuZn-SOD (Borders & Fridovich, 1985). Les azides et le diéthylthiocarbamate qui chélate le cuivre du site actif (Marklund, 1990) sont aussi des inhibiteurs de la CuZn-SOD.

La sensibilité des CuZn-SOD aux divers inhibiteurs dépend du pH du milieu ainsi que du pKa des acides aminés du site actif ; cette sensibilité va donc dépendre de l'espèce étudiée (Borders & Fridovich, 1985).

La CuZn-SOD extracellulaire (EC.CuZn-SOD) a été isolée par Marklund & *al.* en 1982 dans le sérum de mammifères. Cette enzyme possède une structure proche de la CuZn-SOD mais elle est tétramérique.

- Chez les eucaryotes, la Mn-SOD est présente principalement dans les mitochondries. Mais on la trouve aussi au niveau membranaire dans les peroxysomes (Dhaunsi & *al.*, 1993), au niveau des glyoxysomes chez les plantes mais elle serait absente des chloroplastes (Elstner & Osswald, 1994).

La Mn-SOD insensible aux cyanures est inhibée (dénaturée) par les solvants organiques ainsi que par le SDS (Geller & Winge, 1984). Elle est aussi sensible à  $N_3^-$  (30mM) (Beyer & *al.*, 1991).

Fester & Schuster (1995) observent que la Mn-SOD de *Solanum tuberosum* se lie à l'ARNm de la cellule. Le rôle de cette liaison n'est pas déterminé, elle ne modifie en tous cas pas l'activité enzymatique de la SOD.

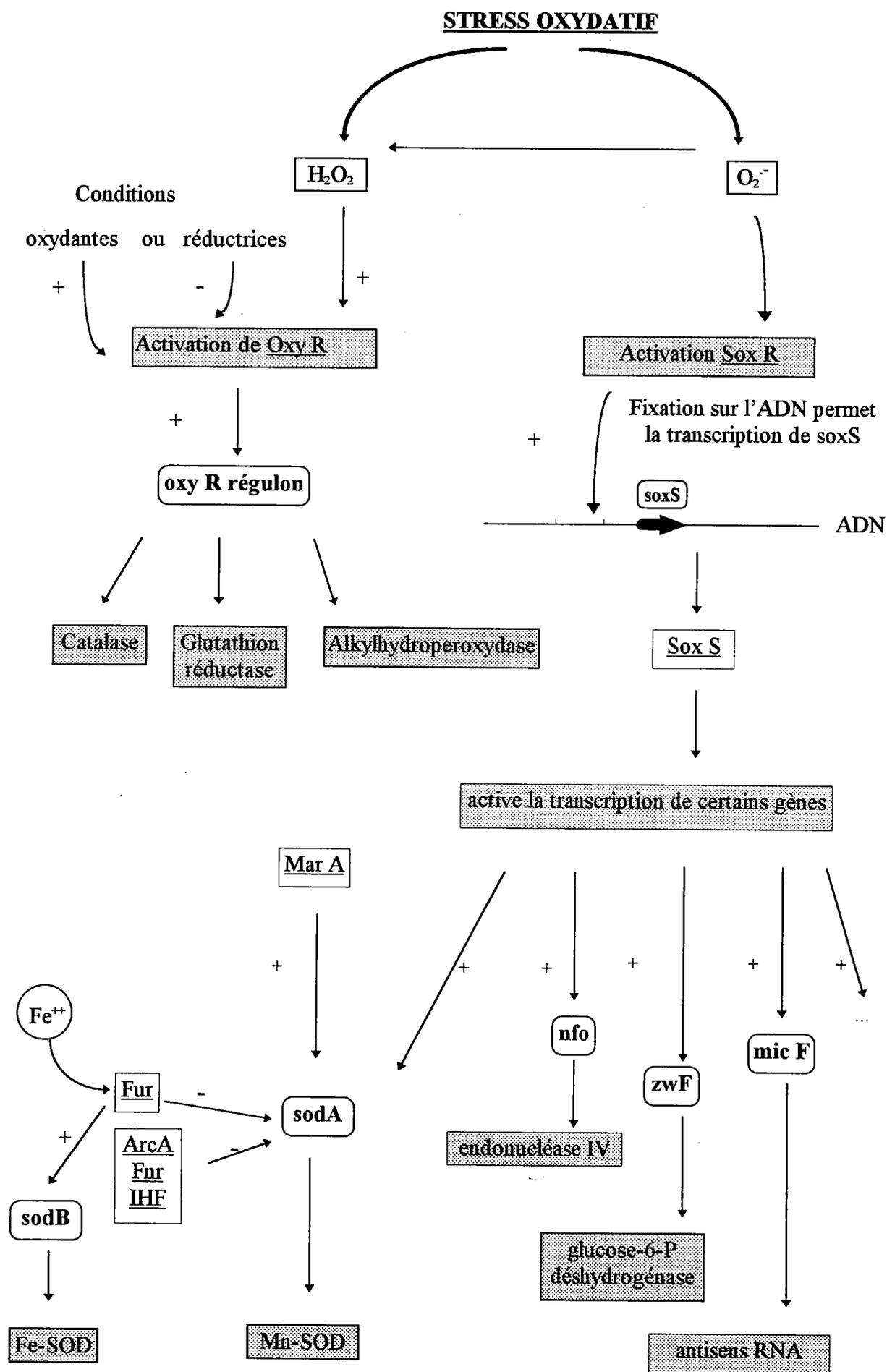
- La Fe-SOD possède une structure très proche de celle de la Mn-SOD mais sa distribution est plus restreinte. Surtout présente chez les procaryotes, on peut aussi la trouver chez les eucaryotes, en particulier dans certaines plantes. Cette enzyme serait associée aux chloroplastes et absente des mitochondries (Salin, 1987). Elle est inactivée par le peroxyde d'hydrogène, et comme la Mn-SOD, elle est inhibée par  $N_3^-$ .

### **3. Principaux modes de régulation de l'activité des superoxyde dismutases : niveau moléculaire**

Si l'on désire évaluer la capacité de la SOD à être utilisée comme un biomarqueur de stress oxydant, il est important de connaître le mieux possible les processus d'induction ou d'inhibition de l'enzyme.

Les mécanismes de réponse aux stress oxydants étant étroitement liés aux mécanismes de régulation physiologiques, les études récentes sont surtout axées sur la recherche des facteurs de transcription (facteurs se liant à l'ADN pour permettre ou empêcher sa transcription) impliqués dans ces processus de régulation. Le séquençage de l'ADN codant pour les divers enzymes antioxydantes a permis de repérer de potentiels sites promoteurs pour la transcription de ces gènes. La présence de ces sites de fixation n'est pas une preuve de leur rôle dans la régulation mais permet de l'envisager avec une forte probabilité.

Figure n° 6 : Régulation de gènes lors de stress oxydatifs chez *E.coli*



### a) Régulation de l'activité Mn et Fe-SOD

C'est chez les organismes procaryotes que les processus de régulation sont le mieux connus.

#### - a.1. Organismes procaryotes

Chez les bactéries, la majeure partie de la régulation se fait au niveau de la transcription.

Un stress oxydant selon sa nature peut activer plusieurs cibles.  $H_2O_2$  activera le régulon oxyR par l'intermédiaire de la protéine OxyR. Cette protéine à l'état oxydé permettra la transcription de gènes dont celui de la catalase et celui de la glutathion réductase (Harris 1992).  $H_2O_2$  n'a pas d'effet direct sur la synthèse de la Mn-SOD bactérienne. (Figure 6)

La synthèse de Mn-SOD est sous la dépendance du régulon soxRS (superoxide responsive).

$O_2^{\cdot-}$  en activant la protéine SoxR permettra la transcription du gène de soxS (Hidalgo & al., 1994). La protéine SoxR est un homodimère, chaque sous-unité contient un centre [2Fe-2S], le Fe est indispensable à son activité (Hidalgo & al., 1995). Cette protéine est homologue à la protéine Mer (qui permet la transcription de certains gènes en réponse au mercure) (Hidalgo, & al., 1994).

SoxS se comporte comme un facteur de transcription et permettra l'expression d'au moins dix gènes dont sodA pour la Mn-SOD et zwF pour la Glucose 6-P deshydrogénase (qui sert à régénérer le NADPH, utile entre autre pour le fonctionnement de la glutathion réductase).

Un autre activateur de la transcription de sodA est MarA. La structure de SoxS est très proche de celle de MarA (résistance multiple aux antibiotiques). Ces deux protéines activent indépendamment plusieurs promoteurs dont celui de sodA (Li & Demple, 1994).

Plusieurs facteurs de répression existent : Fur, arcA (aerobic regulation control), fnr (fumarate nitrate reductase), IHF (integration host factor) (Compan & Touati, 1993).

Chez *E.coli*, la Fe-SOD est constitutive, codée par sodB, gène sous contrôle positif du locus fur (ferric uptake regulation). La liaison de fer à la protéine Fur permettra la transcription du gène sodB.

La synthèse de Mn-SOD est induite en aérobiose à partir du gène sodA (Eickhoff & al., 1995).

## - a.2 Levures

Chez les levures, la Mn-SOD codée par *sod2* (gène nucléaire) est localisée dans la matrice mitochondriale. Chez *S. cerevisiae*, la présence d'oxygène permet le changement de conformation du facteur de transcription HAP1 qui laisse l'ADN accessible pour la transcription de la MnSOD ainsi que de la catalase cytosolique ou catalase T (Pahl & Bauerle, 1994). Un choc thermique ou l'éthanol peuvent aussi induire la synthèse de ces deux enzymes (Moradas-Ferreira & *al.*, 1996) alors que le glucose ainsi qu'une déficience en hème diminuent le niveau de MnSOD ARNm (Galiazzo & *al.*, 1991).

Un autre facteur de transcription, yAP1 (homologue de AP1 humaine) jouerait un rôle dans la réponse aux stress oxydatifs : une surexpression de ce facteur permettrait l'augmentation de la transcription de la Mn-SOD, de la glutathion réductase ainsi que de la glucose 6-P deshydrogénase.

## - a.3 Eucaryotes supérieurs

La régulation de la synthèse ou de l'expression de la Mn-SOD a surtout été étudiée chez les mammifères et les plantes, elle pourrait se faire à différents stades.

Promotion de la transcription de l'ADN en ARN :

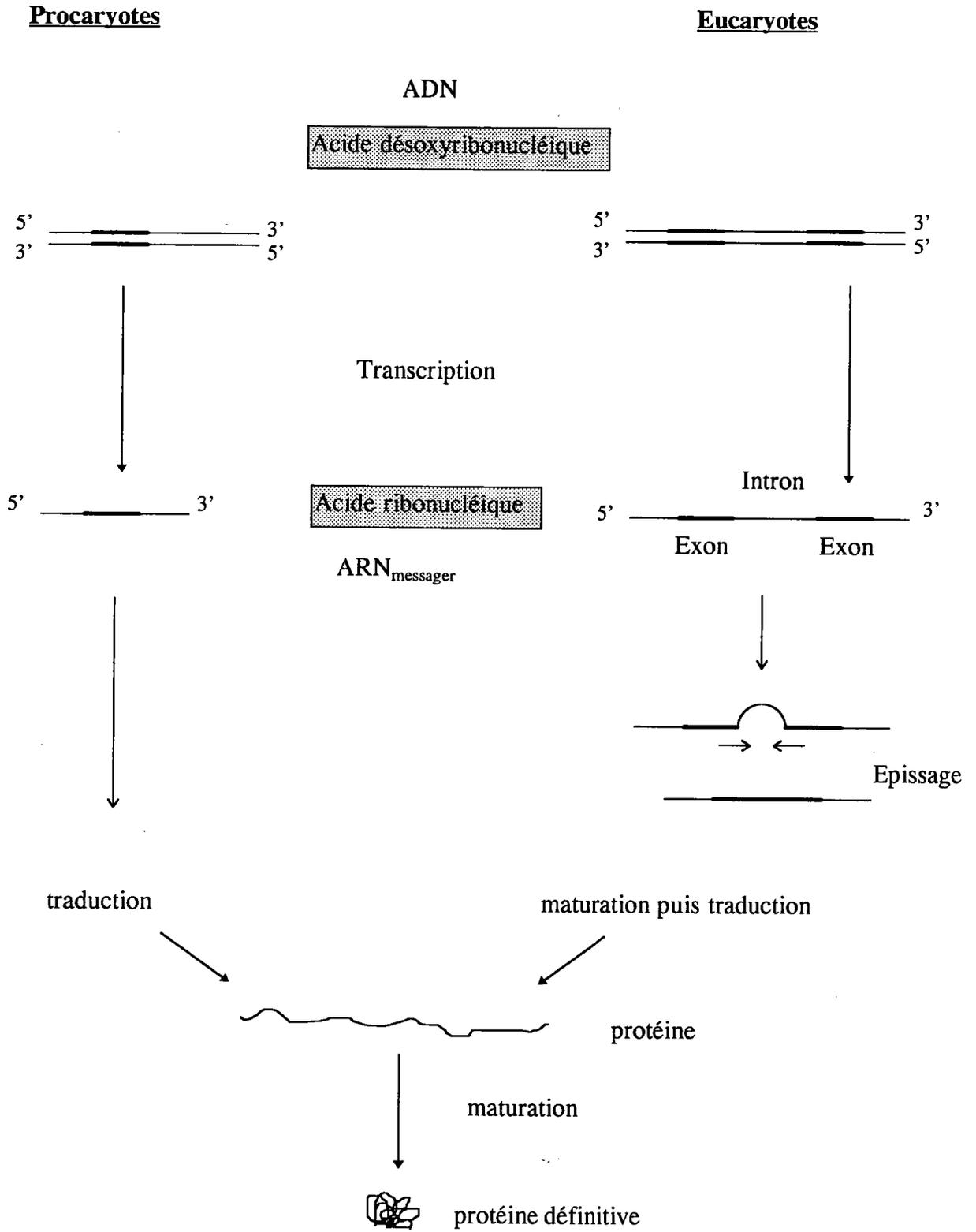
Le gène de la Mn-SOD possède un promoteur activable par le facteur de transcription NF-kB : dans certains types de cellules, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> agirait comme second messager entre TNF $\alpha$ , IL-1 ou IL-6 et NF-kB, pour l'activation du gène de la Mn-SOD (Ichikawa & *al.*, 1994 ; Wan & *al.*, 1994 ; Yoshioka, 1994).

Que ce soit chez l'homme ou chez le rat, des séquences promotrices qui permettrait l'activation du gène par les esters de phorbol ont été mises en évidence (Wan & *al.*, 1994, Ho & *al.*, 1991), et selon Wan & *al.* (1994), l'un de ces sites peut être activé par la voie des protéines kinases C et protéines kinases A.

Stabilité de l'ARNm :

Fazzone & *al.* en 1993 ont isolé une protéine de liaison à l'ARN messager de la Mn-SOD, sensible aux agents oxydants. Cette protéine ne se lie que lorsqu'elle est sous forme réduite. Elle pourrait avoir une action négative sur la stabilité du ARNm.

Figure n° 7 : Principales étapes pour passer de l'ADN aux protéines



### **b). Régulation de l'activité CuZn-SOD**

(Les principales étapes nécessaires pour passer de l'ADN aux protéines sont données figure 7)

#### **- b.1 Procaryotes**

La CuZn-SOD bactérienne est codée par le gène *sodC*. Sa synthèse est augmentée en milieu bien oxygéné mais l'enzyme reste minoritaire par rapport à la Fe-SOD.

#### **- b.2 Levures**

Chez les levures, l'activation de la transcription du gène de la CuZn-SOD se fait en présence de cuivre grâce au complexe ACE1-Cu. Ce facteur de transcription est sensible au niveau de cuivre dans la cellule et contrôle le niveau de CuZn-SOD et de métallothionéines (Moradas-Ferreira, 1994). La synthèse de l'apo SOD peut être suivie de l'incorporation du cuivre pour rendre l'enzyme active (Harris, 1992).

#### **- b.3 Eucaryotes supérieurs**

Chez le rat, Kim & *al.* (1993) isolent le gène de la CuZn-SOD, formé de 5 exons et 4 introns. En amont du gène, on trouve des sites de liaison pour les facteurs de transcriptions AP2 (activable par les esters de phorbol), CREB (activable par la voie des protéines kinases A), HSF (Heat Shock Factor). Ces sites pourraient permettre un contrôle de l'expression du gène grâce à des signaux externes tels choc de température, hormones,...

Le gène de la CuZn-SOD est très conservé chez les mammifères mais on peut parfois observer plusieurs transcrits différents : il y aurait plusieurs sites promoteurs de la transcription (Gu & *al.*, 1995). Kilk & *al.* (1995) montrent que la régulation de la synthèse de CuZn-SOD chez l'homme peut se faire au niveau du RNA messenger qui existe sous plusieurs formes de longueurs et stabilités différentes. L'efficacité de traduction des messagers n'est pas la même.

#### 4. Régulation lors du développement, division cellulaire

Différentes études *in vivo* sur mammifères permettent de compléter cette approche de la régulation des activités superoxyde dismutasiques. (Les études sur organismes aquatiques seront abordées chapitre III.2).

La régulation de l'activité SOD chez les mammifères semble dépendre du stade de développement de l'organisme, du tissu ainsi que du type de cellules étudié.

Par exemple, Ichikawa & *al.* (1994) montrent une induction de la synthèse de la SOD au niveau du rein à la naissance, mais pas au niveau du cerveau ni du coeur chez le rat. En revanche, Nishida & *al.* (1994) observent une augmentation de l'activité CuZn-SOD dans le cerveau entre le fœtus et l'adulte. Une ischémie du cerveau de rat provoque une diminution de l'activité CuZn et Mn-SOD, mais cette diminution dépend de la région du cerveau étudiée (Chan & *al.*, 1988).

Selon leur degré de différenciation, les cellules ne synthétiseraient pas la même quantité de SOD. Sun & *al.* (1993), remarquent que le niveau d'activité de la CuZn-SOD et de la Mn-SOD est diminué après immortalisation de cellules embryonnaires de foie de souris. Après transformation, l'activité et le taux de ARNm de la Mn-SOD sont encore diminués.

Le passage de cellules de l'état non différencié à l'état différencié se ferait parallèlement à une augmentation de l'activité Mn-SOD. Celle-ci permettrait une protection contre des dommages oxydatifs de cellules qui pour se différencier doivent utiliser plus d'énergie (avec pour conséquence une production accrue de radicaux libres formés au niveau de la chaîne respiratoire. Pour St.Clair & *al.* (1994), une surexpression de Mn-SOD au niveau des mitochondries engendrerait un environnement favorable à la différenciation cellulaire.

#### 5. Réponses des organismes à des stress oxydatifs

Les sources de stress oxydants peuvent être de diverses natures : irradiation, apport direct d'espèces réactives de l'oxygène ou métabolisation de composés pouvant entrer dans un cycle rédox.

L'exposition de peau de souris à des UVB de manière aiguë ou chronique a pour conséquence une diminution immédiate (sans doute dénaturation des enzymes) des activités antioxydantes (SOD et GPx) suivie d'une augmentation de l'activité SOD et glutathion peroxydase (Iizawa & *al.*, 1994).

Une culture de cellules mésangiales glomérulaires traitée par  $H_2O_2$  10 à 100  $\mu M$  pendant 24 heures montre une augmentation du Mn-SOD ARNm (de 2 à 9 fois) ainsi que de l'activité Mn-SOD. La CuZn-SOD n'est pas touchée. (Yoshioka, 1994).

L'injection de 6-hydroxydopamine dans un ventricule cérébrale de souris provoque une augmentation de l'activité CuZn-SOD alors que le ARNm a plutôt tendance à diminuer. Il s'agirait ici d'une activation de protéines préformées (Ogawa & al., 1994).

Le plus souvent cependant, des inductions de SOD sont mises en évidence pour la Mn-SOD. L'activité de la SOD pourrait être modulée par la nature des acides gras insaturés ingérés au cours de l'alimentation. Le niveau d'activité de la Mn-SOD cardiaque dépendrait de la nature des acides gras insaturés composant les phospholipides membranaires, et plus particulièrement du rapport [acide arachidonique]/[acide linoléique]. La CuZn-SOD ne serait pas touchée par la nature des acides gras membranaires (Phylactos & al., 1994).

L'induction de la synthèse de l'enzyme ne se répercute pas toujours sur l'activité mesurée car parfois, le stress imposé a aussi pour conséquence une oxydation et dénaturation des protéines dont la SOD.

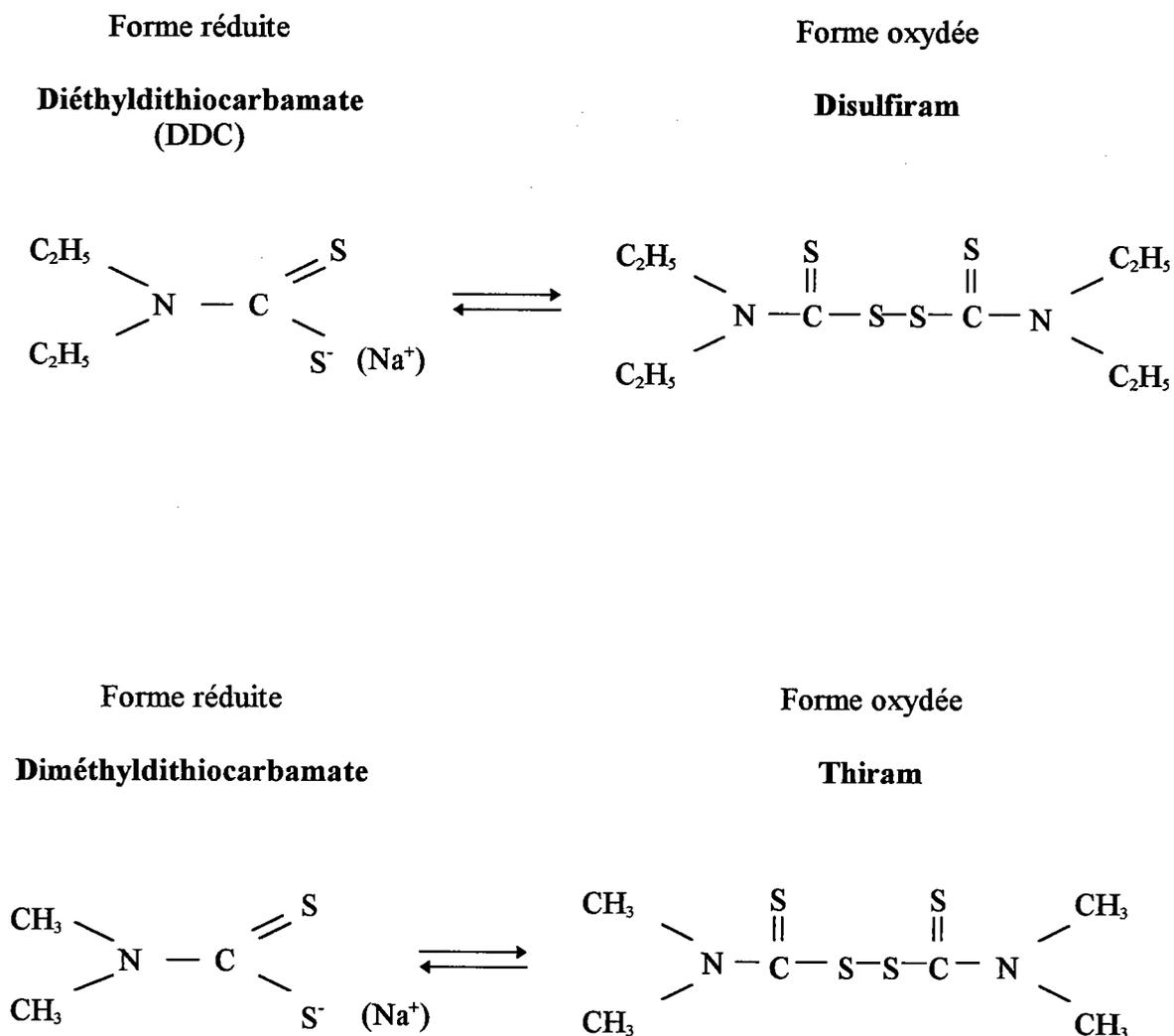
Les métaux en tant que catalyseurs de la production de radicaux sont souvent étudiés. Zaman & al. (1994) ont intoxiqué des mouches (*Musca domestica* et *Trichoplusia ni*) pendant respectivement 5 et 2 jours avec  $HgCl_2$  ou  $Hg_2Cl_2$  à raison de 0,05 à 1,25 % dans leur eau de boisson. Cette intoxication a entraîné une augmentation de deux ou trois fois de l'activité de la SOD.

La CuZn-SOD semblerait plus difficilement inductible que la Mn-SOD. Les modifications d'activité de cette enzyme qui est majoritaire dans la cellule consistent le plus souvent en une inhibition. Celle ci résulte d'une dénaturation de l'enzyme par le stress oxydant ou de la chélation du cuivre qui est indispensable à son activité.

Les métaux tels le cuivre et le fer sont aussi impliqués dans la lutte contre les stress oxydatifs chez le rat.

La plupart des auteurs qui travaillent sur l'implication du cuivre dans le stress oxydatif s'intéressent au métal en tant que catalyseur de la formation de radicaux libres (via la réaction de Fenton) ou que cofacteur de la CuZn-SOD.

Figure n° 8 : Formules de dithiocarbamates



Chen & al. (1994), étudient une carence en cuivre sur différents tissus de rat. Elle aurait entre autres pour conséquence une diminution de la CuZn-SOD, catalase et GPx. La disponibilité du cuivre dans l'organisme va agir sur la répartition du zinc et du fer, (répartition organe spécifique). Le cuivre est aussi étroitement lié à la cytochrome c oxydase alors que le fer module l'activité de la catalase. Ainsi les rôles joués par les métaux dans la cellule sont dépendants les uns des autres

Une manière de carencer l'organisme en un métal donné est de chélater ce métal.

Le diéthylthiocarbamate (DDC) (Figure 8) est souvent utilisé *in vivo* en tant que chélateur du cuivre afin d'inhiber la CuZn-SOD.

Le DDC existe sous plusieurs formes : la forme réduite (DDC) peut être oxydée au niveau des microsomes du foie et en présence d'oxygène et de NAD(P)H. La forme oxydée (le disulfiram) peut être réduite *in vitro* ou *in vivo* par le glutathion ou autres thiols protéiques. Ce couple DDC/disulfiram constitue un couple rédox actif en milieu biologique (Mankhetkorn & al., 1994).

Goldstein & al. (1979), remarquent que l'injection intrapéritonéale de DDC (1,2 g/kg) à des souris potentialise l'effet de l'ozone (O<sub>3</sub>) ou du paraquat. L'activité de la SOD dans le foie et les poumons est réduite d'environ 40 %, 22 heures après injection de DDC seul.

Le DDC (0,1 mM) administré à des cellules HL-60 provoque une baisse de la survie cellulaire et une baisse du GSH. Il faut augmenter la dose à 10 mM pour observer une diminution de 10% de l'activité SOD. Selon Kelner & al. (1989), les dommages cellulaires provoqués par le DDC seraient indépendants de son action sur la SOD. Dans le sang, le DDC pourrait réagir avec l'oxyhémoglobine pour générer des espèces réactives telles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, la méthémoglobine, ainsi que des produits de la lipoperoxydation. Le peroxyde d'hydrogène et le DDC oxydé réagissent spontanément avec les thiols, et le glutathion réduit intracellulaire est diminué.

Mais Pahl & Baeuerle (1994) font remarquer que l'utilisation d'antioxydants tels que des dérivés de la cystéine et des dithiocarbamates diminue la concentration en espèces réactives de l'oxygène, aussi bien en neutralisant directement les radicaux qu'en chélatant les ions métalliques, empêchant la conversion de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ·OH. En effet, des études *in vitro* ont montré que le DDC pouvait agir comme éliminateur d'espèces réactives de l'oxygène, particulièrement

pour  $O_2^{\cdot-}$  et  $H_2O_2$ , en étant oxydé en disulfiram. L'oxydation de DDC par  $H_2O_2$  pourrait conduire à une augmentation de l'hémolyse des érythrocytes.

Le DDC exerce donc des effets opposés :

- il peut jouer le rôle d'autres thiols en réagissant avec des radicaux libres et stopper la propagation radicalaire,
- d'autre part, la réduction du disulfiram par les thiols cellulaires implique la formation d'intermédiaires réactifs. (Mankhetkorn & al., 1994)

Une autre conséquence d'un traitement par le DDC pourrait être une augmentation du taux de cuivre dans certains organes avec induction d'une lipoperoxydation élevée (Delmaestro & al., 1994).

*En résumé pour la régulation des SOD :*

*On remarquera l'importance des métaux, très sensibles au potentiel rédox de la cellule. Ils sont aussi bien impliqués dans la formation de radicaux libres que dans leur détoxification (Fe et Cu principalement).*

Chez les bactéries (*E.coli*), la réponse est adaptée selon que la bactérie lutte contre  $O_2^{\cdot-}$  ou contre  $H_2O_2$  :

$$O_2^{\cdot-} \rightarrow SOD \nearrow \rightarrow H_2O_2 \nearrow \rightarrow Catalase \nearrow$$

*Les métaux sont impliqués soit directement, soit à travers la régulations de la transcription des SOD.*

Chez les levures, il existe un système qui répond à une tension croissante en  $O_2$  intracellulaire. Les mécanismes de réponse à une augmentation en espèces réactives de l'oxygène sont mal connus (intervention d'un facteur de transcription  $\gamma$ API ?). Le cuivre joue un rôle important pour la synthèse de la CuZn-SOD.

*Que ce soit chez les procaryotes ou eucaryotes inférieurs, on remarquera qu'il existe des voies de régulation très proches pour la Mn-SOD, la glutathion réductase et la glucose-6-P-déshydrogénase.*

Chez les eucaryotes supérieurs :

*le gène de la CuZn-SOD pourrait être transcrit sans activation préalable,*

*$H_2O_2$  jouerait un rôle de second messenger dans certaines cellules, pour la transcription de la Mn-SOD,*

*la régulation de l'expression de la CuZn et de la Mn-SOD pourrait faire intervenir les protéines kinases A et C,*

*le niveau d'activité SOD dépendrait du stade de différenciation cellulaire, du tissu ou de l'organe concerné, du stade de division cellulaire,*

*la qualité de la nourriture, en particulier la nature des acides gras ingérés aurait une influence,*

*des signaux hormonaux ainsi que des changements de température interviendraient dans la régulation de l'activité SOD.*

*Ces données sont plus ou moins généralisables aux mammifères (à partir desquels elles ont été obtenues), mais doivent être vérifiées si l'on veut extrapoler aux poissons ou aux mollusques. En effets, chez ces animaux, les systèmes de métabolisation, de transport de l'oxygène dans l'organisme ou de réponse immunitaire sont particuliers.*

*Des paramètres tels la nourriture, l'oxygénation de l'eau, la température ou l'état immunitaire des organismes étudiés seront autant de facteurs susceptibles de moduler l'expression des SOD.*

### III. Réponses des activités SOD face à des stress oxydants

#### 1. Niveaux de base de la SOD en conditions physiologiques chez divers organismes

Des comparaisons entre organismes ont été réalisées afin d'essayer de comprendre le processus de régulation des enzymes antioxydantes en fonction des caractéristiques des différentes espèces ainsi que les conséquences (bénéfiques ou non) de l'induction de paramètres antioxydants tels que la SOD.

En général, un niveau élevé de SOD chez une espèce est lié soit à une exposition à de fortes concentrations en oxygène, soit à une importante consommation en oxygène. Cela ne signifie pas qu'une induction de la SOD soit forcément bénéfique pour l'individu. En effet, les H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formés lors de la dismutation des radicaux superoxide doivent être pris en charge par la catalase ou la glutathion peroxydase afin d'éviter les dommages cellulaires. Par exemple, selon Sohal & al. (1995) une surexpression de CuZn-SOD chez *Drosophila melanogaster* doit être accompagnée d'une surexpression de la catalase pour être bénéfique. De même, Cerutti & al. (1994) montrent l'importance du maintien du ratio SOD/catalase et GPx/SOD pour permettre à des cellules épidermiques de souris de résister à des stress oxydants.

Barja de Quiroga & al. (1984) ont mesuré lors de la comparaison de *Rana ridibunda* et de *Discoglossus pictus* une activité SOD plus importante chez *D. pictus* (plutôt terrestre, forte pression en O<sub>2</sub>) que chez *R. ridibunda*. (plutôt aquatique) au niveau du foie et du cerveau.

Godin & Garnett (1992) ont essayé de corréler le niveau antioxydant des érythrocytes au niveau métabolique chez l'homme, le lapin, le cochon, le rat, la caille. Ils ont pu montrer une corrélation positive entre l'activité SOD et le niveau métabolique spécifique (cal./degré/j.) de l'animal, mais n'ont pas trouvé de lien entre les activités SOD et catalasique. Lopez-Torrez & al. (1993) ont montré que la quantité de SOD présente chez un organisme n'était pas corrélée à la durée de vie de l'espèce étudiée (poisson, amphibien, oiseau, mammifère), contrairement à la catalase et aux glutathion peroxydases hépatiques.

Des différences importantes d'activité SOD entre des espèces de poissons ont été observées par Aksnes & Njaa (1981). Wilhelm-Filho & Boveris (1993) mesurent des quantités de SOD cinq fois plus élevées dans le foie que dans les branchies chez des poissons cartilagineux. Dans une même espèce, l'activité SOD peut varier selon la saison : chez la carpe, Wdzieczak, & al. (1982), montrent une augmentation d'activité au printemps par rapport à l'automne chez

Tableau n° 6 : Toxines pro-oxydantes étudiées dans des systèmes biologiques de mammifères (Ahmad, 1995)

Main chemical class (subclasses)	Examples
Halogenated compounds (Alkanes and alkenes) (Biphenyls)  (Cyclic compounds)	Chloroform and methylene dibromide Dioxins, parachlorobiphenyls, and parabromobiphenyls Alachlor, chlordane, DDT, endrin, and lindane Paraquat and Diquat
Pyridinyl compounds Quinones (Benzoquinones) (Heterocyclic quinones) (Naphthoquinones) (Anthracyclins)	Chloranil Mitomycins Menadione, dichlone, and shikonin Adriamycin and daunorubicin
Furanocoumarins	8-Methoxypsoralen
Metalloids (Arsenic)	As(III and V)
Metals (Cadmium) (Copper) (Chromium) (Iron) (Lead) (Mercury)  (Nickel) (Vanadate complexes)	Cd (II) Cu (I and II) Cr (I-VI) Fe (II) Pb (V and VI) Elemental (Hg <sup>0</sup> ), inorganic (I and II) and organic (e.g., CH <sub>3</sub> -Hg <sup>+</sup> ) Ni (II) V (II to V)

\*Highly condensed and modified from Stohs, 1995.

Figure n° 9 : Voies de transformation des xénobiotiques en métabolites et radicaux oxygénés toxiques catalysée par les enzymes du système des MFO (Lemaire & Livingstone, 1993)

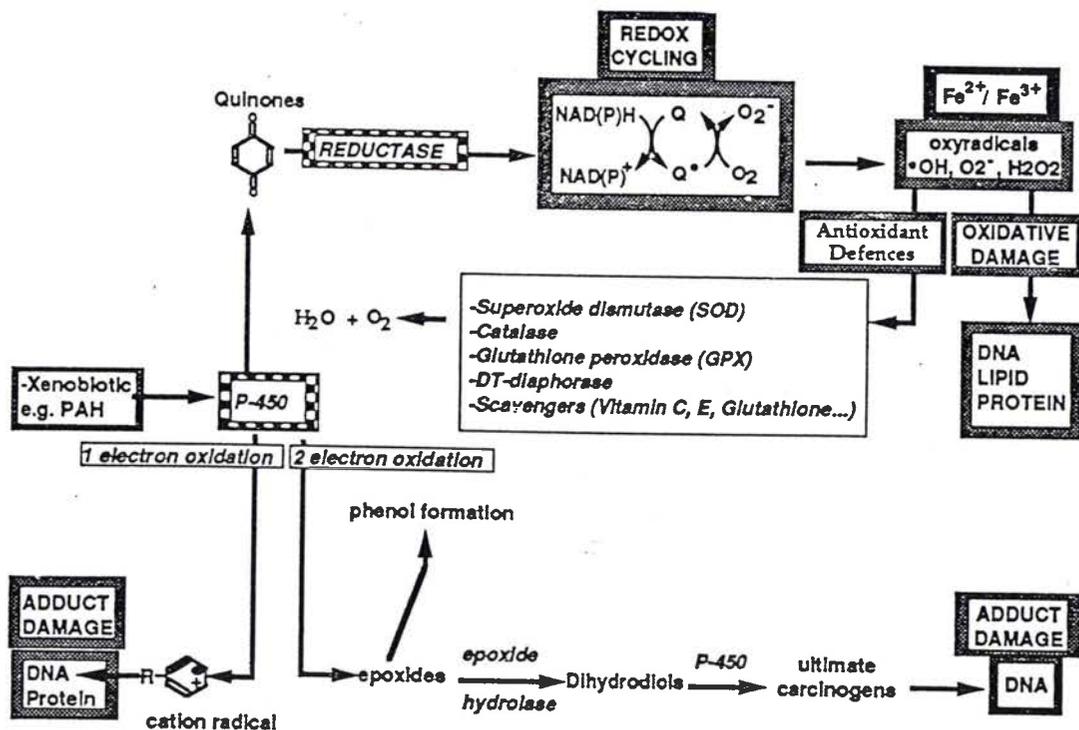


Figure 1: Metabolite and oxyradical pathways of organic xenobiotic toxicity catalysed by enzyme components of the mixed-function oxygenase (MFO) system. PAH, polynuclear aromatic hydrocarbon; Q, quinone; Q<sup>•</sup>, semiquinone radical; •OH, hydroxyl radical; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, superoxide anion radical; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide. Antioxidant defences are also shown.

*Cyprinus carpio*. Cette augmentation d'activité pourrait être liée à une augmentation de l'oxygène dissout dans le milieu. L'activité SOD chez *Mytilus galloprovincialis* présente une augmentation à partir de février avec un pic en juin et retour à l'état basal en août (Viarengo & al., 1991a). Pérès & Roche (1989) observent une augmentation de la SOD dans les hématies suite à un choc osmotique (diminution de la salinité) chez *Dicentrarchus labrax* (Loup), poisson capable de s'adapter à une gamme de salinité très large.

Le vieillissement qui est accompagné d'une peroxydation lipidique croissante ne semble pas dû à une diminution de la SOD : Sohal et Orr (1993) ont montré une légère augmentation du niveau de SOD avec l'âge chez *Drosophila melanogaster* alors qu'il restent constants chez *Mytilus edulis* (Viarengo & al., 1991b). Sohal (1988) a donné H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 à 100 mM) dans l'eau de boisson de *Musca domestica*. à 100 mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la durée de vie n'est plus que de 73 %, la SOD et la catalase ne sont pas touchées.

## 2. Organismes aquatiques

Le stress oxydant ou les systèmes antioxydants ont été étudiés dans différents systèmes afin de déterminer entre autre les processus d'adaptation mis en oeuvre lors de pollutions par des molécules susceptibles d'induire des stress oxydants c'est à dire principalement

- les métaux
- des molécules organiques halogénées, cycliques ou quinoniques (après métabolisation)

Les principaux composés pro-oxidants trouvés dans l'environnement sont donnés tableau 6.

La capacité des composés organiques à générer des espèces réactives de l'oxygène dépend de leur métabolisation par les organismes qui les ont ingérés. La figure 9 représente les principales voies de formation de radicaux à partir de xénobiotiques. Ces xénobiotiques peuvent être pris en charge au niveau du système des MFO (mixed function oxygenase) lié au cytochrome P450. Ils pourront être réduits par un électron et donner naissance à des radicaux ou à des molécules plus réactives (Lemaire & Livingstone, 1993). Le système des MFO peut être induit par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), par des biphényles polychlorés (PCBs), des dibenzofuranes et des dibenzodioxines (Solé & al., 1995a). Les composés de type quinonique catalyseront la formation de radicaux libres par réductions et oxydations univalentes successives.

Tableau n° 7 : Modifications de l'activité SOD chez des organismes aquatiques exposés à des pollutions métalliques en fonction de la dose, de la durée de l'intoxication et de l'organe étudié. Les variations de l'activité catalasique sont reportées pour comparaison.

Composés étudiés	Organisme	Dose	Durée	Accumulation dans l'organe	Organe	Réponse SOD	Réponse catalase	Auteurs
CuSO <sub>4</sub>	<i>Ditylum brightwellii</i>	3 à 126 nM				légère augmentation →		Rijstenbil & al., 1994
	<i>Lemna minor</i>	3,5 µM	7 jours			diminution Mn-SOD ↘		Buckley, 1994
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1 µM	3 semaines laboratoire	10 à 350 µg/g p.f. 20 à 150 µg/g p.f.	Branchies Gl. digestive	légère augmentation → constante →	constante x 0,25	Regoli & Principato, 1995
As, Se, Cu, Mn, Fe, Zn, Pb, Cr, Ni	<i>Mytilus galloprovincialis</i>		Originaires de site sain et transférées 6 semaines vers site contaminé	As, Se, Mn, Fe, Zn, Pb.	Branchies  Glande digestive	légère augmentation (x 1,5) →  constante →	x 2  x 0,25	Regoli & Principato, 1995
CuSO <sub>4</sub>	<i>Cyprinus carpio</i>	31 à 312 µM	24 heures		Foie	x 0,25 pour 312 µM ↘	x 0,5	Radi & Matkovic, 1988
					Branchies	jusqu'à 62 µM : ↘ x 0,14 pour 312 µM ↘	constante  x 0,3	
Zinc + Plomb  ZnSO <sub>4</sub> Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<i>Cyprinus carpio</i>	Zn/Pb 23 µM/23nM 46 µM/46nM 77 µM/69 nM 230 µM/0,23 µM 310 µM/0,37 µM	5 jours 5 jours 5 jours 24 heures 24 heures		Foie	x 0,2 normale ↘ normale ↘ normale ↘ x 3 normale ↘	x 0,6 ↘ x 0,8 ↘ x 0,4 ↘ x 2 ↘ x 3 ↘	Dimitrova & al., 1994
<b>Cadmium</b>								
CdCl <sub>2</sub>	<i>Scorpaena guttata</i>	90 µM  180 µM	4 semaines		Intestin  Branchies Rein Foie	x 0,17 ↘  Impact comme distribution du Cd		Bay & al., 1990
CuSO <sub>4</sub>	<i>Unio tumidus</i>	0,47 µM	3 jours		Glandes digestives Branchies	normale → normale →	↘	Cette étude
Thiram		0,41 µM	3 jours		Glandes digestives Branchies	normale →	↘	
CuSO <sub>4</sub> + Thiram		0,47 µM + 0,41 µM	3 jours		G.D. et Branchies	normale →	↘	

Pds = poids ; j = jour ; séd. = sédiment ; réf. = référence ; G.D. = glandes digestives

Les études de biomarqueurs d'exposition au stress oxydant en milieu liquide peuvent être réparties en trois classes :

- la nature et la quantité de toxique imposé aux organismes sont connues, les essais ont lieu au laboratoire, le seul paramètre non contrôlé est la susceptibilité de l'individu au stress imposé ;

- les organismes sont exposés sur le terrain à des polluants de nature mal définie et dont les concentrations changent au cours du temps. Les paramètres variables sont multiples et la réponse des organismes intégrera aussi les modifications physicochimiques du milieu et les variations climatiques. Les individus utilisés comme témoins et les individus exposés peuvent être originaires d'un même groupe, ou être autochtones des sites étudiés.

Cette approche est la plus représentative des conditions naturelles mais les résultats sont en général difficiles à interpréter.

- les organismes sont exposés à des sédiments ou eaux polluées prélevés dans l'environnement, l'exposition se déroule au laboratoire.

Cette dernière alternative permet de s'affranchir des variations de températures, oxygénation, ou paramètres non directement liée à la présence des polluants étudiés tout en permettant l'étude de mélanges complexes ou mal définis.

#### **a) Intoxications par les métaux :**

En milieu aquatique, la réponse des enzymes antioxydantes a été étudiée sur divers types d'organismes, végétaux ou animaux (Tableau 7).

La culture de diatomées (*Ditylum brightwelli*) en présence de cuivre à concentration croissante au cours du temps de 3 à 126 nM entraîne une augmentation de leur reproduction (réponse non spécifique) mais aussi une légère augmentation de la SOD (coefficient de corrélation de 0,6). Rijstenbil & al. (1994).

Des effluents domestiques enrichis en Cu à une dose finale plus importante de 3,5  $\mu$ M inhibent une partie de la SOD (Mn-SOD) de *Lemna minor* (lentille d'eau douce) après 7 jours d'exposition (Buckley, 1994).

Selon les doses imposées et la durée d'exposition, des réponses différentes peuvent être observées. Dimitrova & al. (1994) exposent des poissons (*Cyprinus carpio*) à Zn et Pb simultanément pendant 24 heures ou 5 jours et à deux niveaux de doses (concentration en Zinc

Tableau n° 8 : Réponse de la SOD chez des organismes aquatiques exposés à des pollutions de type organique en fonction des conditions d'exposition et de l'organe étudié. Les variations de l'activité catalasique sont reportées pour comparaison.

Molécules testées	Organisme	Dose	Conditions d'exposition	Accumulation dans les organes	Organe	Réponse SOD	Réponse catalase	Auteurs
HAPs sédiment	<i>Limanda limanda</i>	309 µg/g pds sec contre 79 dans le sédiment du site de référence. Témoin sans sédiment Cadmium = 0,413 µg/g pds sec dans le sédiment pollué contre 0,167 dans le site de référence.	20, 80, 144 jours		Foie	x3 à 25j (séd). Retour normal plus rapide pour séd.site réf.	x 0,5	Livingstone & al., 1993
HAPs, PCBs, DDT, Cu, Fe,	<i>Mugil.sp</i>	HAPs = 44ng/g pds sec (=1,4 x réf.), PCBs = 2,3 ng/g pds sec (=2,6 x réf.), DDT = 7 ng/g pds sec sédiment (= 6,5 x réf.)	originaires d'une eau contaminée ou d'une eau de référence	Cu x 3,7 et Fe x 1,5	Foie	x 1,4	x 1,5	Rodriguez-Ariza & al., 1993
HAPs, molécules aromatiques, métaux	<i>Leiostamus xanthurus</i>		Suivi de juin à octobre sur site d'origine			augmentation dans temps (âge, temps d'exposition, saison ?)		Roberts & al., 1987
HAPs, PCBs	<i>Mytilus galloprovincialis</i>		Site d'origine janvier, mars, juin comparé à site référence	HAPs = 1,5 à 4,5 µg/g pds frais PCBs = 0 à 16ng/g pds frais		x 1,6 janvier		Solé & al., 1995(a)
Augmentation en même temps que le pic de NADPH-cyt.c réductase								
HAPset PCBs	<i>Mytilus galloprovincialis</i>		Ferme marine. Suivi de février à juin	Mars à avril : augmentation DDT, PCBs, et HAPs (/g lipides)	Glande digestive	A.S. x 1,3 uniquement au mois de mars	A.T. x 1,4 (mars)	Solé & al., 1995(b)
Augmentation en même temps que le pic de NADPH-cyt.c réductase								
						A.S. x 0,7 juin	A.T. x 0,8 (juin)	
PCBs, DDT, HAPs	<i>Mytilus galloprovincialis</i>		originaires de sites plus ou moins pollués	HAPs : 132 à 443 ng/g pds.s, PCBs : 185 à 1461 ng/g pds.s.	Glande digestive	constante	constante	Livingstone & al., 1995

Molécules testées	Organisme	Dose	Conditions d'exposition	Accumulation dans les organes	Organe	Réponse SOD	Réponse catalase	Auteurs
PCBs, DDT, HAPs	<i>Zosterisessor ophiocephalus</i> (P.M.)		originaires de sites plus ou moins pollués	HAPs : 137 à 161 ng/g p.s., PCBs : 1900 à 11400 ng/g p.s., DDT : 122 à 430 ng/g p.s.	Foie	non corrélée au niveau de contamination	niveau pas corrélé à niveau de SOD	Livingstone & al., 1995
HAPs	<i>Mullus barbatus</i>	Plusieurs sites de contaminations variables. 47 à 37507 ng/g sédiment.	individus originaires du site même		Foie	Mullus : activité stable ; pas de corrélation avec [HAPs]	constante	Burgeot & al., 1996
HAPs, PCBs	<i>Ictalurus punctatus</i>	sédiments rapportés au laboratoire (HAPs = 86780 ng/g poids sec ; PCBs = 7170 ng/g pds sec contre 1280 et 40 ppb dans le témoin)	2,7,14,28 jours		Foie	augmentation très légère à 2 et 28 jours	augmente entre j 7 et j 28	DiGiulio & al., 1993
PCBs, pesticides	<i>Oreochromis niloticus</i>		originaires de deux sites dont un site témoin	PCBs : 105 ng/g p.f., hexachlorohexane : 59 ng/g p.f., lindane 7 ng/g p.f.	Foie, branchies, sang	x 4 constante x 2	x 0,75 constante constante	Bainy & al., 1996
Foie : augmentations parallèles des activités pro-oxydantes de cytochrome P450 et de la NADH cyt.c réductase								
Paraquat	<i>Cyprinus carpio</i> , <i>Carassius carassius</i> , <i>Tinca tinca</i>	54 µM	4,12,48, et 96 heures		Sang	constante sauf légère diminution chez <i>Cyp.c.</i> à 4h, puis normale	pas corrélée à la SOD	Gabryelak & Klekot, 1985
Paraquat	<i>Geukensia demissa</i>	500 µM (baisse à 450 µM à 12 h. et 375 µM à 24 heures)	12 heures		Glande digestive	x 3 puis normale à 24 heures	x 1,7 puis normale à 24h.	Wenning & al., 1988
		2mM (baisse à 1,8 mM à 12 h. et 1,5 mM à 24 heures)	12 heures		Glande digestive	x 1,7 puis normale à 24 heures	constante	
Menadione	<i>Mytilus edulis</i>	6 µM			Glande digestive	Mort à 6 jours		Livingstone & al., 1990
Paraquat		0,2 µM	19 jours		Glande digestive	SOD constante		Livingstone & al., 1990

= 1000 x concentration en Plomb). Une intoxication d'un jour (Zn/Pb = 230  $\mu\text{M}$ /0,23  $\mu\text{M}$ ) entraîne une augmentation de la SOD (x 3) et de la catalase. Une intoxication plus longue (cinq jours) à des doses plus faibles provoque une diminution (x 1/5) de l'activité SOD pour la dose la plus faible (Zn/Pb = 23  $\mu\text{M}$  / 23 nM) ainsi que de la catalase. Lors de ces essais, des activités SOD constantes peuvent être liées à des activités de la catalase induites (x 3) ou inhibées (x 0,4).

Bay & al. (1990), intoxiquent *Scorpaena guttata* pendant quatre semaines au cadmium 90 à 180  $\mu\text{M}$ . Des enzymes considérées comme cibles privilégiées de la toxicité de ce métal telles la succinate deshydrogénase et la glycéraldéhyde phosphate deshydrogénase (contiennent des groupements sulfhydryl) ne sont pas touchées par ce traitement alors que la concentration en Cd est multipliée de 6 à 23 fois selon les tissus. A la dose de 180  $\mu\text{M}$ , l'activité SOD est diminuée 6 fois dans l'intestin. L'impact du Cd sur cette enzyme antioxydante correspond à la distribution du métal dans les différents organes. Il s'agirait d'un bon indicateur de la toxicité du cadmium, l'effet de ce dernier n'étant probablement pas direct mais le produit d'une rupture de l'homéostasie du cuivre et du zinc.

Chez *Cyprinus carpio*, une exposition au cuivre (62  $\mu\text{M}$ ) pendant vingt-quatre heures entraîne une diminution des mesures de la SOD dans les organes étudiés. L'activité totale dans le foie est plus élevée que dans les branchies et que dans les muscles. Dans le foie, elles diminuent progressivement lorsque la concentration en  $\text{CuSO}_4$  passe de 31 à 310  $\mu\text{M}$  jusqu'à un niveau de 25 % du témoin. En revanche dans les branchies, l'activité reste constante ou est légèrement augmentée jusqu'à 62  $\mu\text{M}$  puis diminue jusqu'à de 14 % du témoin pour la concentration de 312  $\mu\text{M}$  (Radi & Matkovic, 1988).

Des moules marines (*Mytilus galloprovincialis*) ont été transférées pendant une à six semaines d'un site sain vers un site pollué par des métaux. La SOD augmente (x 1,5) après une et six semaines dans les branchies. Les métaux accumulés durant cette période dans les branchies sont principalement le fer (passe de 250 à 550  $\mu\text{g/g}$  pds frais), le plomb et le manganèse (de 10 à 50  $\mu\text{g/g}$  pds frais), le sélénium et l'arsenic (5 et 9 à 15  $\mu\text{g/g}$  pds frais). Dans la glande digestive, le profil d'accumulation des métaux est le même. Seul le fer qui est déjà présent en quantité plus importante au début continue d'augmenter plus vite dans la glande digestive que dans les branchies. En revanche, la SOD n'est pas induite dans ces conditions (Regoli & Principato, 1995).

Molécules testées	Organisme	Dose	Conditions d'exposition	Accumulation dans les organes	Organe	Réponse SOD	Réponse catalase	Auteurs
Hydroquinone	<i>Dicentrarchus labrax</i>	0,58 mg/kg	1 injection 3		Erythrocytes	diminue constante		Roche & al., 1992
Resorcinol		0,58 mg/kg	1 3			constante diminue		
Pyrocatecol		0,058 mg/kg	1 3			constante constante		
DEF	<i>Ictalurus punctatus</i>	560ng à 2,2 mg/l	2,7,21 jours		Foie, Branchies	constante	constante	Mather-Mihaich & DiGiulio, 1986
Choc osmotique	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Salinité de 5g/l au lieu de 37 g/l	12 heures, 1 semaine, 8 semaines		Sang	x 1,7 puis normale		Pérès & Roche, 1989
Sulfate d'ammonium	<i>Lamellidens marginalis</i>	76 µM = [] environnementale	7 jours		Branchies	x 0,5	constante	Chetty & Indira, 1995
					Glande digestive	constante		
		1,3 mM = [] subléthale			Branchies	x 0,25	x 1,5	
					Glande digestive	x 1,2	x 1,2	
Ozone (O <sub>3</sub> )	<i>Onchorynchus mykiss</i>	20 ppb	5heures / jour pendant 7 jours		Branchies	traités = contrôles ; diminution dans le temps		Morita & al., 1995
HAP, PCB +As, Cr, Cu, Pb, Ni	<i>Unio tumidus</i>	30000 ng /g sédiment et 1500 ng / g sédiment	15 et 30 jours		Glandes digestives Branchies	constante constante	en un site puis normale	Cette étude 1996
					de toutes activités après 15 jours dans le site le plus contaminé par les PAH			

Pds = poids ; j = jour ; séd. = sédiment ; réf. = référence

Lors de l'intoxication de *M.galloprovincialis* par du cuivre 1  $\mu\text{M}$  dans l'eau de mer, Regoli & Principato (1995) observent une induction légère de la SOD après une semaine au niveau des branchies. Rien n'est visible au niveau de la glande digestive. Ils obtiennent le même profil de réponse après transplantation des moules d'un site sain vers un site contaminé par des métaux. Selon Sutherland & Major (1981), l'accumulation de cuivre lors d'intoxication de *Mytilus edulis* ( $\text{Cu} = 47\mu\text{M}$ ) est accompagnée d'une redistribution des autres éléments à travers les organes.

### **b) Intoxications par des molécules organiques :**

L'effet des HAPs contenus dans le sédiment a été étudié sur poissons et mollusques. Les principaux polluants mesurés sont les métaux ainsi que les HAPs, PCBs et pesticides. Lorsque leur concentration dans le milieu n'est pas connue ou trop faible, elle est en général mesurée dans les tissus des organismes exposés (accumulation).

Certaines molécules aromatiques lorsqu'elles sont métabolisées peuvent donner lieu à la formation de radicaux libres.

Chez le poisson, plusieurs augmentations de l'activité SOD ont été observées dans le foie en présence de HAPs (Tableau 8).

La mise en contact de *Limanda limanda* avec des sédiments témoins ou contaminés par des HAPs (309  $\mu\text{g/g}$  poids sec) de 25 à 144 jours a montré une augmentation de l'activité EROD (enzyme liée au métabolisme des xénobiotiques) à 80 jours ainsi que de la catalase et de la SOD par rapport aux organismes témoins pour lesquels le sédiment de référence contenait 79  $\mu\text{g/g}$  poids sec de HAPs (Livingstone & al., 1993). Il est difficile de tirer des conclusions de cette expérience car à J25, les activités SOD pour le site référence et le site pollué étaient multipliées par trois par rapport à l'essai sans sédiment. Cette induction de l'activité SOD peut être due à la présence de polluants dans les deux sédiments. Puis les activités enzymatiques ont diminué jusqu'à un niveau normal à J144 chez les témoins et chez les intoxiqués.

Le même type d'essai a été réalisé par Di Giulio & al. (1993), sur *Ictalurus punctatus* (poisson chat). Le fond de l'aquarium était recouvert de sédiments contaminés par des HAPs (86,8  $\mu\text{g/g}$  poids sec), PCBs (7,2  $\mu\text{g/g}$  poids sec), ou de sédiment témoin (environ 100 fois moins de contamination) et l'exposition durait de 2 à 18 jours. Une augmentation des métabolites de HAPs dans la bile est observée chez les individus exposés au sédiment contaminé. EROD et ECOD sont activées à J.7 mais reviennent à leur niveau normal à J.28. Ces enzymes de

métabolisation varient de la même manière que les dommages à l'ADN. La SOD est restée stable ou légèrement augmentée.

*Mugil sp.* provenant de sites contaminé par HAPs, PCBs, pesticides et par des métaux ont aussi des activités plus élevées (1,4) dans le foie que des individus d'un site témoin (Rodriguez-Ariza & al., 1993).

Lors des essais sur le terrain, les facteurs de variation pouvant modifier le niveau de la SOD sont mal maîtrisés.

Roberts & al. (1987) remarquent chez *Leiostamus xanthurus* une augmentation de l'activité SOD au cours du temps qui pourrait être due à l'âge par exemple. L'un des sites étudiés présente une activité supérieure, ce site serait le plus contaminé.

La régulation de la SOD pourrait aussi être liée au sexe. (Induction chez *Zosterisessor ophiocephalus* mâle uniquement) (Livingstone & al., 1995).

Solé & al., (1995b) ont suivi les activités enzymatiques de moules marines *M. galloprovincialis* prélevées dans un site contaminé (HAPs) et dans un site témoin. Le suivi s'est fait durant plusieurs mois par dosages sur les glandes digestives. Ils ont observé une augmentation de SOD (x 1,3), au niveau du site pollué par rapport au témoin uniquement au mois de mars. Les variations de niveau du cytochrome P450 et de la cytochrome P450 réductase sont similaires à celles de la SOD.

Chez les mollusques l'activité SOD dans la glande digestive semble assez stable même après accumulation de HAPs ou PCBs. Livingstone & al. (1995) ne mettent pas en évidence de différence entre les activités d'individus ayant accumulé des HAPs et PCBs et celles des témoins qui en contenaient respectivement quatre et huit fois moins.

L'intoxication de *Mytilus edulis* à la ménadione 1 ppm ou au BaP 50 ppb pendant 2 à 19 jours est suivie pour la ménadione à 6 jours d'une ponte suivie de la mort des individus. L'exposition au BaP entraîne une faible augmentation de la catalase. L'activités SOD n'est pas touchée par ces traitements (Livingstone & al., 1990).

La plupart des produits testés sont dilués dans le milieu. Pour mieux maîtriser la quantité de toxique ingéré, Roche & Bogé (1992) ont injecté de l'hydroquinone, du résorcinol ou du pyrocatechol (0,58, 0,58, ou 0,058 mg/100 g respectivement) à *Dicentrarchus labrax*. Soit en une injection (essai aiguë) soit en trois injections sur 15 jours (chronique). Les dosages sur les érythrocytes sont réalisés 3 jours après la dernière injection. La GPx reste stable pour toutes les conditions, la catalase diminue légèrement en intoxication aiguë. L'activité SOD totale diminue en intoxication aiguë à l'hydroquinone et en intoxication chronique au résorcinol. Elle n'est pas touchée par le pyrocatechol.

Le paraquat se comporte comme un générateur de radicaux superoxyde. Après avoir été réduit par un électron, il peut s'oxyder et céder son électron à de l'oxygène moléculaire pour donner  $O_2^{\cdot-}$ .

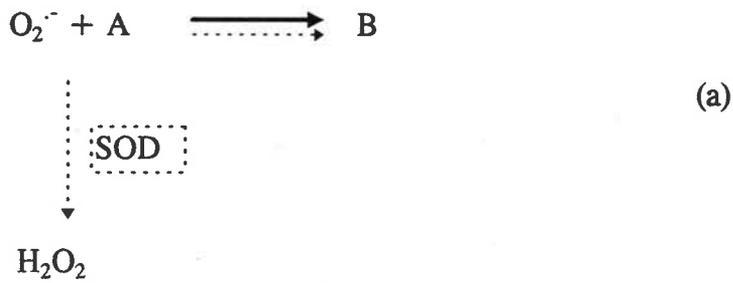
Des essais sur *Geukensia demissa*, bivalve marin, montrent une augmentation transitoire des activités superoxyde dismutase et catalase ainsi que du taux de glutathion, six heures après une exposition à des concentrations de paraquat comprises entre 0,5 et 2 mM (Wenning & al., 1988). Cette induction de la SOD est plus forte à faible dose (0,5 mM).

La comparaison des niveaux d'enzymes antioxydantes trouvés chez *Mullus barbatus* (foie) provenant de sites pollués par des HAPs montre que le niveau de SOD est identique sauf dans un site où l'enzyme est légèrement induite. Les niveaux de catalase et GST sont les plus élevés dans les sites les plus contaminés (Burgeot & al., 1996).

Le tableau 8 résume les conditions de dosage de la SOD sur organismes aquatiques.

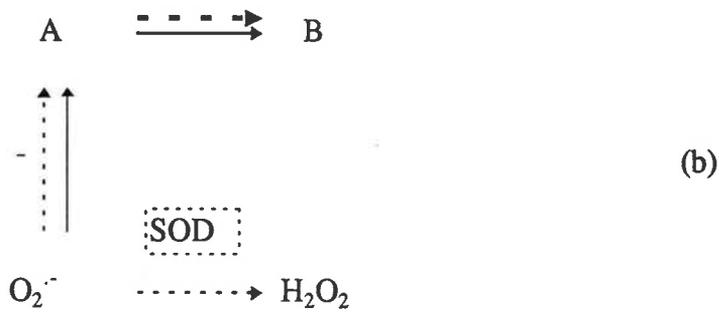
*En conclusion, on ne peut pas tirer de règle générale quand aux propriétés d'un toxique à induire ou inhiber la SOD. Il semblerait cependant que l'induction ait lieu plutôt aux faibles doses ou expositions courtes pour les métaux ; les plus fortes doses ayant pour conséquence une diminution d'activité de l'enzyme peut-être par une inactivation par les radicaux. L'activité de la catalase semble varier de manière proche de celle de la SOD. On n'observe pas d'étude d'intoxication par les métaux ou les activités des deux enzymes varieraient en sens inverse l'une de l'autre. Les deux enzymes ne sont cependant pas sensibles aux mêmes doses de toxique car une activité SOD constante par exemple peut être accompagnée d'une activité catalasique accrue ou inhibée. En ce qui concerne les molécules organiques, on peut penser à une probable induction de la SOD, mais d'après les publications étudiées, il n'est pas possible de conclure avec certitude. Les concentrations en HAPs, PCBs ne sont pas toujours précisées et les polluants souvent complexes sont en général riches en métaux. Lorsque la bioaccumulation dans les organes est donnée, les unités varient (ng/g poids frais, ng/g poids sec, ou/g lipides). Les variations d'activité de la catalase semblent moins corrélées à celles de la SOD que pour les intoxications par les métaux. Il est probable que la complexité des milieux auxquels sont exposés les organismes engendre une multitude de réponses simultanées et interdépendantes les unes des autres.*

Figure n° 10 : Principes des méthodes indirectes de dosage de la SOD



En absence de SOD  $\text{A} \xrightarrow{\hspace{1cm}} \text{B}$

En présence de SOD, les  $\text{O}_2^{\cdot-}$  sont consommés,  
la réaction est inhibée :  $\text{A} \cdots \cdots \cdots \rightarrow \text{B}$



En absence de SOD :  $\text{O}_2^{\cdot-}$  inhibe la réaction  $\text{A} \text{---} \text{---} \text{---} \rightarrow \text{B}$

En présence de SOD, les  $\text{O}_2^{\cdot-}$  sont consommés,  
la réaction est favorisée :  $\text{A} \xrightarrow{\hspace{1cm}} \text{B}$

#### **IV. Méthodes de dosage de la SOD :**

On distingue deux types de méthodes :

##### **1. les méthodes directes**

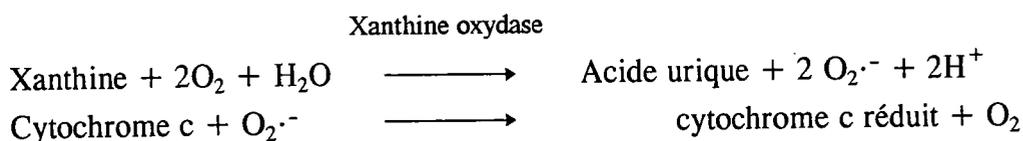
Ces méthodes mesurent directement la consommation des radicaux superoxydes par la SOD. Ceci nécessite de bien contrôler la production des radicaux qui peut se faire par radiolyse (Goldstein, 1988) ou par réduction électrochimique de l'oxygène moléculaire (Rigo & Rotilio, 1985). Ces méthodes sont chères ou peu pratiques mais permettent d'étudier le mécanisme enzymatique.

##### **2. les méthodes indirectes**

La concentration en superoxyde dismutase est déterminée en mesurant sa capacité (Figure 10) à inhiber (a) ou à activer (b) une réaction faisant intervenir des radicaux superoxydes qui assurent la transformation d'une substance A en un produit B. La vitesse de transformation de A en B est fonction de l'activité de la superoxyde dismutase.

L'unité enzymatique représente la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber à 50% (a) ou pour doubler (b) vitesse de la réaction de contrôle réalisée en absence d'enzyme.

La méthode la plus souvent utilisée est la méthode décrite par McCord et Fridovich (1969) ; son principe est basé sur la **réduction du cytochrome c** par les radicaux  $O_2^{\cdot-}$  qui peuvent être générés par un système xanthine/xanthine oxydase. Des interférences sont possibles avec des extraits cellulaires du fait de la présence de cytochrome oxydases et peroxydases dans la fraction. De plus, le cytochrome c commercial peut être contaminé par de la SOD : la pureté des réactifs doit donc être vérifiée.



Tous les compos\u00e9s qui r\u00e9duisent le cytochrome c sont consid\u00e9r\u00e9s comme agents interf\u00e9rents. En particulier les quinones qui peuvent \u00eatre r\u00e9duites directement par la xanthine oxydase en semiquinones ou hydroquinones et qui r\u00e9duiront ensuite le cytochrome c.

La **r\u00e9duction du NBT** (nitro bleu t\u00e9trazolium) en sel de formazan (color\u00e9 en bleu) par des radicaux  $\text{O}_2\cdot^-$  est utilis\u00e9e pour rep\u00e9rer l'enzyme sur des gels afin d'en caract\u00e9riser les diff\u00e9rentes formes. Le sel de formazan a tendance \u00e0 pr\u00e9cipiter et il est difficile d'utiliser cette m\u00e9thode par ailleurs tr\u00e8s sensible en milieu liquide (Beauchamp & Fridovich, 1971).

Une m\u00e9thode tr\u00e8s sensible mais moins utilis\u00e9e est celle de Paoletti & *al.* (1986). Elle est bas\u00e9e sur le suivi \u00e0 340 nm de l'**oxydation du NADH** en pr\u00e9sence de radicaux  $\text{O}_2\cdot^-$  g\u00e9n\u00e9r\u00e9s par  $(\text{EDTA})_2/\text{Mn}$  et  $\beta$ -mercapto\u00e9thanol \u00e0  $\text{pH} = 7,6$ .

La consommation des  $\text{O}_2\cdot^-$  par la superoxyde dismutase (SOD) entra\u00eene une moindre oxydation du NADH. La repr\u00e9sentation du pourcentage d'inhibition par la SOD donne une droite sur papier log-probit en fonction de la concentration en SOD.

Les cations divalents ainsi que les groupements thiols (glutathion r\u00e9duit, cyst\u00e9ine) devront \u00eatre \u00e9limin\u00e9s de l'\u00e9chantillon avant le dosage).

La m\u00e9thode d'**autooxydation du pyrogallol** propos\u00e9e par Marklund & Marklund (1974) est bas\u00e9e sur le suivi \u00e0 420 nm de l'autoxydation en milieu basique ( $\text{pH} = 8,2$ ) du pyrogallol, faisant intervenir les  $\text{O}_2\cdot^-$  du milieu. Cette r\u00e9action est inhib\u00e9e par la SOD. La courbe d'inhibition de cette autooxydation en fonction de la concentration en SOD pr\u00e9sente une partie lin\u00e9aire pour des pourcentages d'inhibition inf\u00e9rieurs \u00e0 60%. Cette m\u00e9thode de dosage permet de travailler \u00e0 un  $\text{pH}$  proche de la neutralit\u00e9 ( $\text{pH} 8,2$ ) alors que les m\u00e9thodes utilisant la dianisidine (Misra & Fridovich, 1977) et l'\u00e9pin\u00e9phrine (Misra & Fridovich, 1972) n\u00e9cessitent des  $\text{pH}$  proches de 10 (la Mn-SOD perd beaucoup de son activit\u00e9 \u00e0 des valeurs de  $\text{pH}$  aussi basiques). Par cette m\u00e9thode, le glutathion, l'ascorbate ou les peroxydases peuvent modifier la vitesse de la r\u00e9action d'autooxydation du pyrogallol.

Tableau n° 9 : Méthodes indirectes de dosage des activités SOD : modes de production des radicaux et conditions du suivi de l'utilisation de ces radicaux.

Génération O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Détection O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	pH	Longueur d'onde (nm)	Auteurs
Xanthine/X. oxydase	Réduction Cyt.c	7,8	550	McCord & Fridovich 1969
Xanthine/X. oxydase	Réduction Cyt.c	10	415	L'Abbé & Fisher, 1990
Flavines photoréduites	Réduction N.B.T. en formazan	7,8	560	Beauchamp & Fridovich, 1971
Photo-oxydation dianisidine	Photo-oxydation dianisidine	7,8	460	Misra & Fridovich, 1977
Auto-oxydation Pyrogallol	Auto-oxydation Pyrogallol	8,2	420	Marklund & Marklund, 1974
Auto-oxydation pyrogallol	Réduction N.B.T. en formazan	8,2	560	Minami & Yoshikawa, 1979
Hématoxyline auto-oxydation	Auto-oxydation hématoxyline	6,8 8,1	560	Martin, 1990
Auto-oxydation épinéphrine	Auto-oxydation épinéphrine	10,2	480	Misra & Fridovich, 1972
Hypoxanthine/XOD	Chimiluminescence de MCLA	8,8	290	Nakano, 1990
Xanthine /XOD	Chimiluminescence de lucigénine	10		Laihia, 1993
EDTA/MnCl <sub>2</sub> / β-mercaptoéthanol	Oxydation NADH	7,4	340	Paoletti & al., 1986
Auto-oxydation de 6-hydroxydopamine	Auto-oxydation de 6-hydroxydopamine	7,4	490	Heikkila, 1985
Auto-oxydation de BXT-01050	Auto-oxydation de BXT-01050	8,8	525	Nebot & al., 1993 (Bioxytech)

MCLA = 2-méthyl-6-(p-méthoxyphényl)-3,7- dihydroimidazo [1,2-a] pyrazin-3-one

XOD = xanthine oxydase

EDTA = acide éthylène dinitrilotétraacétique

NADH = β-nicotinamide-adénine dinucléotide (réduit)

La méthode de dosage **SOD-525** de Bioxytech : le principe consiste en l'activation par la SOD de l'oxydation d'un composé chromogène en un composé chromophore (525 nm) à 37°C et pH = 8,8.

Lorsque la relation entre la concentration en enzyme et l'activité enzymatique n'est pas linéaire (méthodes de McCord & Fridovich (1969) ou de Paoletti & *al.*, 1986), certains auteurs proposent de réaliser une gamme étalon (activité en fonction de la quantité de SOD exprimée en poids) avec de la SOD bovine et de s'y reporter lors de dosages ultérieurs (Paoletti & Mocali, 1990). Mais cette méthode ne tient pas compte de la quantité d'enzyme inactive présente dans l'échantillon étalon et qui fausse les résultats. Il est possible de réaliser une gamme étalon de l'activité en fonction du nombre d'unités enzymatiques dans le milieu (Bioxytech, 1992).

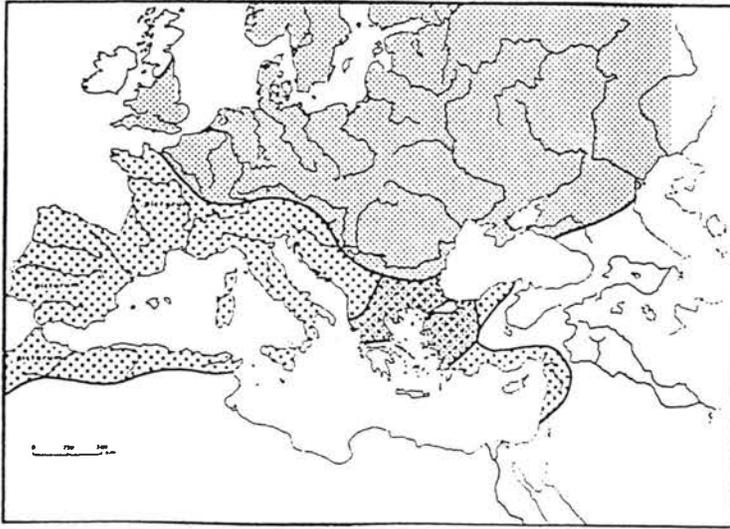
Asada & *al.* (1974) linéarisent la courbe d'activité obtenue par la méthode de McCord & Fridovich (1969) ; cela permet d'extrapoler la quantité d'enzyme nécessaire pour obtenir une unité enzymatique.

Un autre type de linéarisation peut être tenté afin de détecter des interférences dues à des composés autres que la SOD. Eldred & Hoffert (1981) représentent les pourcentages d'inhibition de la réaction contrôle par la SOD, en fonction de la quantité d'échantillon testé sur du papier log-probit afin de déterminer la ED<sub>50</sub> (dose efficace pour inhiber 50 % du contrôle). La pente de la droite obtenue a tendance à se redresser ou à s'aplatir lorsque la concentration en échantillon (qui contient des molécules interférentes) s'accroît.

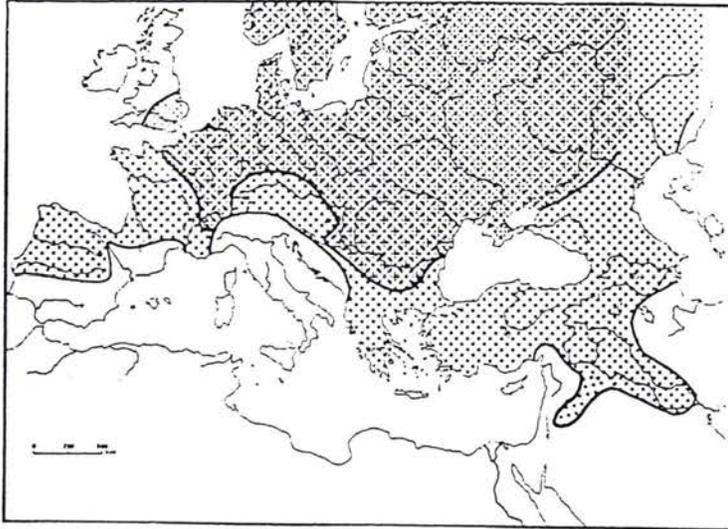
D'autres méthodes que celles citées existent (Tableau 9). Toutes les méthodes indirectes ne sont pas sujettes aux mêmes types d'interférences. Certains composés vont empêcher ou favoriser la production de radicaux superoxyde ; d'autres vont mimer l'action de la SOD. C'est pourquoi Goldstein & Czapski (1991) parlent de mesurer des « SOD like activities » (activités semblables à l'activité SOD) par des méthodes indirectes. Le dosage par une méthode indirecte permettrait de mieux se rendre compte de la capacité des composés à mimer la SOD *in vivo*. Ainsi, Kim & *al.* (1995) mesurent l'activité superoxyde dismutasique d'antioxydants naturels tels l'acide L-ascorbique, le glutathion, l'acide urique ou le D-Mannitol à l'aide de la méthode de Marklund & Marklund (1974) (auto-oxydation du pyrogallol).

Certaines méthodes de dosage nécessitent de se placer à pH élevé. Si l'on désire mesurer l'activité de toutes les isoenzymes de la SOD, il faut plutôt réaliser les mesures à pH proche de la neutralité.

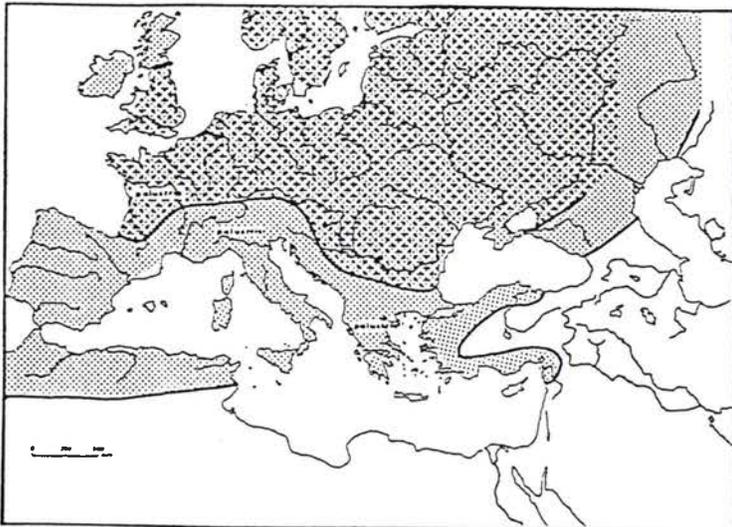
Figure n° 11 : Répartition d'Unionidaes en Europe (Nagel, 1988)



*Unio pictorum* [coarse grid pattern]  
*Unio elongatulus* [fine grid pattern]



*Unio crassus* [coarse grid pattern]  
*Unio tumidus* [fine grid pattern]



*Anodonta* spp. (*piscinalis*, *cygnea*) [coarse grid pattern]  
*Pseudanodonta complanata* [fine grid pattern]  
*palustris* = *A. palustris* ?

Selon la méthode de dosage utilisée, la production de radicaux superoxyde ne se fait pas à la même vitesse et la quantité d'enzyme nécessaire pour utiliser la moitié de ces radicaux varie. Lors de l'expression de résultats de dosages de la SOD, il est donc important de préciser la méthode utilisée.

Les méthodes les plus utilisées sont celles de McCord et Fridovich (1969) et de Marklund & Marklund (1974). La méthode de Paoletti & *al.* (1986) est plus sensible. Quelque soit la méthode utilisée, il existe toujours des facteurs interférents soit au niveau de la production de radicaux superoxyde soit au niveau de la réaction de détection de ces radicaux.

### **V. Les Unionidaes : biologie**

Les bivalves de la famille des Unionidaes sont des mollusques de la classe des Lamellibranches. Ils sont largement répandus en France et en Europe dans les milieux dulçaquicoles, les espèces rencontrées étant plus spécifiques des régions. Ces moules sont trouvées dans des cours d'eau à faible courant ou plans d'eau. Une nouvelle espèce (*Anodonta woodiana woodiana*) provenant de l'est asiatique semble s'être acclimatée en Europe et en France dans les Bouches du Rhône par le biais de l'alevinage depuis 1985 (Girardi & Ledoux, 1989). La distribution des mollusques aquatiques peut être limitée par de très faibles concentrations en sels dissous, particulièrement en carbonate de calcium qui est important pour la formation de la coquille. Ce besoin de carbonate de calcium rend les mollusques plus aptes à vivre dans des eaux alcalines plutôt que des eaux acides ( $\text{pH} < 6$ ) (Elder & Collins, 1991).

La famille des Unionidaes se divise en trois sous familles :

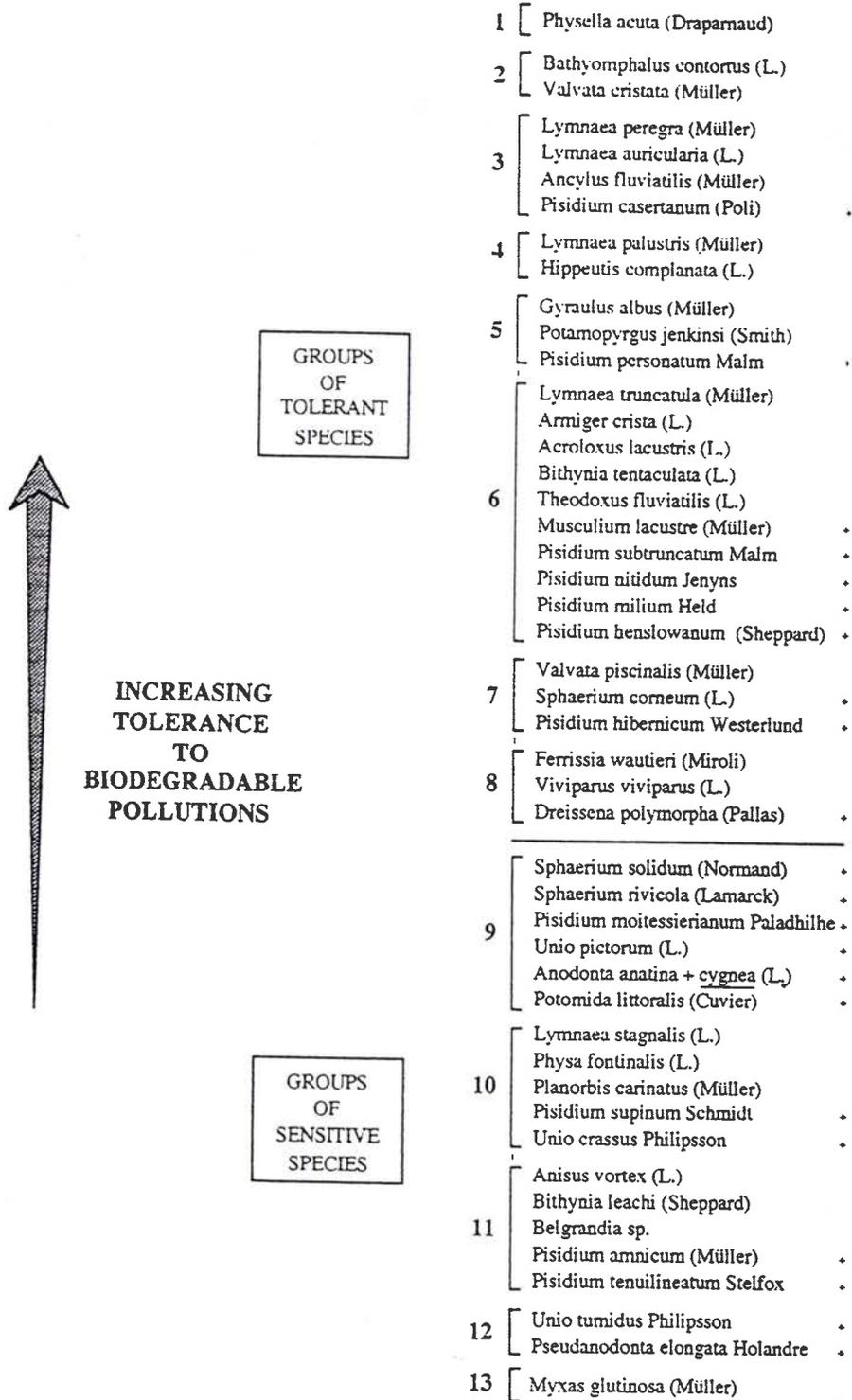
Margaritiferidae,

Unioninae

et Anodontinae.

En tant qu'organismes benthiques filtreurs, ils sont fréquemment utilisés pour évaluer la bioaccumulation de métaux ou de composés organochlorés, cette bioaccumulation permettant d'estimer la biodisponibilité des polluants à partir du milieu aquatique. La plupart des métaux

Figure n° 12 : Degrés de sensibilité des mollusques aquatiques aux pollutions biodégradables (D'après Mouthon, 1996)



Bivalves indiqués par un +

peuvent être bioaccumulés par les bivalves en tant qu'analogues du calcium (Jeffree & al. 1993).

Dans la famille des Unionidaes, les Anodontinaes possèdent la plus large distribution dans les eaux douces européennes (Mäkelä, 1995). D'après Nagel (1988), *Unio tumidus* et *pictorum* en France seraient présents surtout dans le nord et l'est. *Unio crassus* et *Unio elongatulus* sont présents sur le reste du territoire (*Unio elongatulus* étant présent sur le pourtour méditerranéen).

Le genre Anodonta est représenté dans toute l'Europe alors que Pseudoanodonta en France n'est présent que dans la moitié nord (Figure 11).

Selon Mouthon (1996) qui a classé les mollusques en fonction de leur fréquence et de la composition physicochimique du milieu, les Unionidaes sont les mollusques les plus sensibles aux pollutions biodégradables. Mais vu que leur développement nécessite un stade de parasitisme d'un poisson, les effets démoécologiques de la pollution pourraient être liés à la sensibilité du poisson hôte.

En effet, les oeufs des Unionidaes donnent des larves (glochidies) qui se développent entre les feuillets branchiaux de la femelle (marsupium). Après avoir été rejetés dans l'eau, les glochidies doivent se fixer à un poisson hôte et passer par un stade de parasitisme, nécessaire pour la métamorphose en moule juvénile. Le nombre de feuillets branchiaux de la femelle transformés en poche incubatrice varie selon les espèces. Selon que les larves possèdent ou non un crochet, elles se fixeront au niveau des écailles ou bien des branchies (moins dures) de leur hôte. Les glochidies ne parasitent que certains types de poissons, spécifiques pour chaque espèce de bivalve (Nagel, 1988).

D'après cette même étude de Mouthon (1996), *Unio tumidus* serait plus sensible que *Unio pictorum* (Figure 12) aux pollutions biodégradables. Les organismes pulmonés qui peuvent respirer l'air atmosphérique seraient plus tolérants que les bivalves.

**II. MISE AU POINT DU DOSAGE  
DE LA SOD DANS LES ORGANES  
DE *UNIO TUMIDUS***

## **2ème partie : mise au point du dosage de la SOD dans les organes de *Unio tumidus***

La première partie de ce travail a consisté en la mise au point du dosage de la SOD commerciale puis de la SOD contenue dans l'échantillon biologique. Plusieurs méthodes de dosage ont été testées. Afin d'éliminer les facteurs cellulaires qui interfèrent avec les mesures, des essais de purification par centrifugation, gel filtration et concentration ont été effectués.

La présence d'inhibiteurs de protéases a aussi été testée car la libération de protéases lors de l'homogénéisation peut conduire à l'attaque et l'inactivation des enzymes étudiées.

La distinction entre la Mn-SOD et la CuZn-SOD a ensuite été tentée en inhibant la CuZn-SOD par du cyanure.

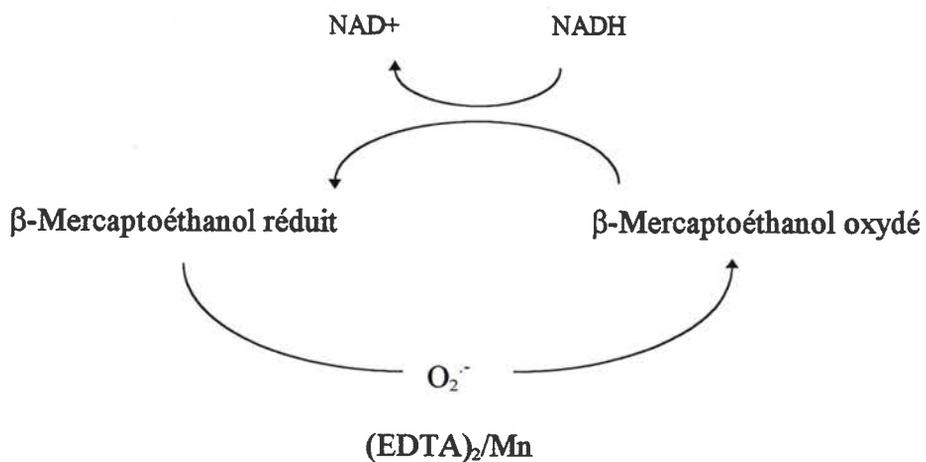
Dans une deuxième partie, l'activité SOD a été évaluée pour *Unio tumidus* en automne et au printemps, après intoxication au cuivre et au thiram en laboratoire, et lors d'une étude de transfert d'un site sain vers un site pollué.

### **1. Description des méthodes de dosage**

La mise au point et l'étude des méthodes d'analyse ont été réalisées à l'aide d'une solution d'enzyme CuZn-SOD étalon.

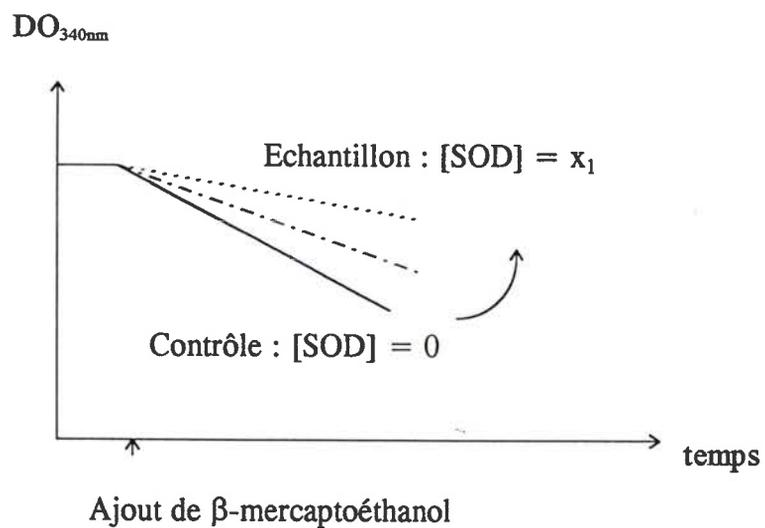
Les essais sur enzyme purifiée ont été réalisés avec de la superoxyde dismutase de foie bovin (EC 1.15.1.1, SIGMA S-4761). Cette enzyme a été diluée de manière à obtenir 3,6  $\mu\text{g}$  de SOD/ml. La solution a été congelée à  $-20^{\circ}\text{C}$  après répartition en aliquots de 1 ml. Un échantillon est décongelé avant chaque série d'essai et gardé dans de la glace fondante.

Figure n° 13 : Méthode de Paoletti & al., (1986) :



L'oxydation du  $\text{NADH}$  est maximale en absence de SOD

Schéma simplifié des réactions mises en jeu en absence de SOD. La consommation des  $\text{O}_2^-$  par la SOD entraîne une moindre oxydation du  $\text{NADH}$ .



## 1. Méthode de Paoletti & al. (1986)

Le dosage se fait par suivi à 340 nm de la réaction d'oxydation du NADH, à 25°C et à pH = 7,6. Cette réaction résulte indirectement de la production de  $O_2^{\cdot -}$  générés par la mise en présence de EDTA<sub>2</sub>/Mn et de β-mercaptoéthanol. La réduction du β-mercaptoéthanol oxydé est associée à l'oxydation du NADH. L'oxydation du NADH est diminuée en présence d'agents compétiteurs vis à vis de  $O_2^{\cdot -}$ , comme la SOD. La concentration en SOD dans le milieu peut donc être évaluée par mesure de l'inhibition de l'oxydation du NADH. (Figure 13)

Sont ajoutés successivement :

- 2,6 ml de tampon
- 100 µl de EDTA/MnCl<sub>2</sub> (100/50 mM)
- 100 µl SOD ou de tampon de dilution pour le contrôle
- 100 µl NADH (8,45 mM dans NaHCO<sub>3</sub> 0,5%)

Mélange et lecture de la D.O. pendant 4 minutes à 340 nm

-100 µl β-mercaptoéthanol (28,2 mM) puis mélange : la réaction démarre. La densité optique est suivie pendant vingt-huit minutes toutes les quatre minutes.

Les tampons étudiés sont :

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 7,6

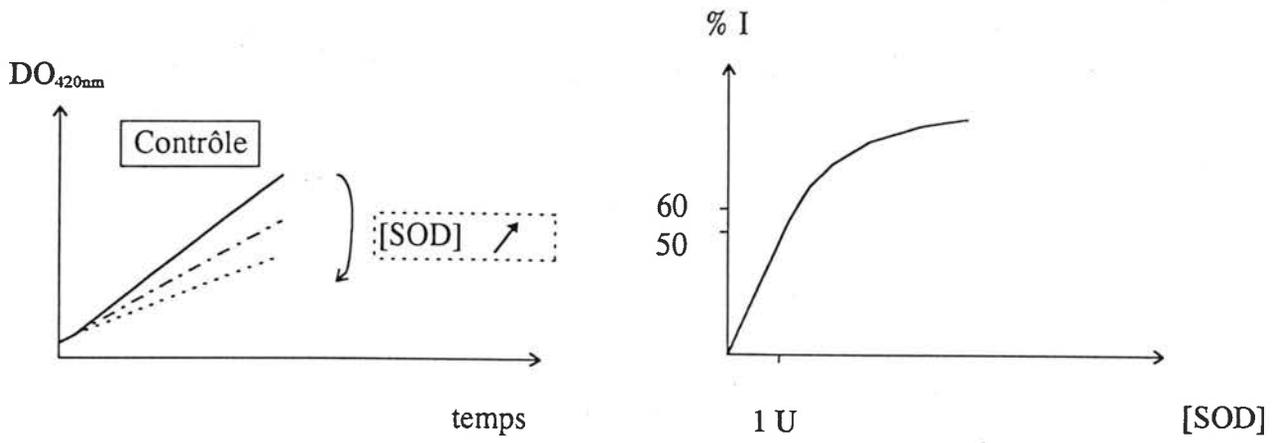
ou Triéthanolamine-Diéthanolamine 100 mM, pH 7,6 pour certains essais

La pente de la réaction est mesurée pendant les huit dernières minutes car c'est la période où la production de  $O_2^{\cdot -}$  est la plus importante.

Le pourcentage d'inhibition (%I) de l'oxydation du NADH par la SOD est calculé de la manière suivante :

$$\%I = 100 - (\text{pente en présence de SOD} / \text{pente en absence SOD}) \times 100$$

Figure n° 14 : Schéma pour le dosage par la méthode de Marklund & Marklund (1974)



Les pourcentages d'inhibition sont reportés sur papier Log-Probit en fonction de la concentration de SOD (selon la proposition de Eldred & Hoffert, 1981). Cette représentation permet de mettre en évidence des facteurs interférents avec les dosages indirects. On en déduit l'équivalent à une Unité enzymatique c'est à dire la quantité de solution à doser qui permet une inhibition de 50 % du contrôle.

Pour les essais sur *Unio tumidus*, nous avons procédé de la même manière à la différence près que les valeurs d'inhibition étaient représentées en fonction de la dilution de la fraction. Nous en avons déduit la valeur de la dilution permettant d'obtenir une Unité SOD et ensuite le nombre d'unités dans l'échantillon non dilué.

## **2. Méthode de Marklund et Marklund (1974)**

Ce dosage est basé sur l'auto-oxydation du pyrogallol en milieu basique qui fait intervenir des radicaux  $O_2^{\cdot-}$ . Le suivi de la réaction se fait à 420 nm, 25°C et à pH 8,2. L'auto-oxydation du pyrogallol commence dès son ajout dans le milieu réactionnel.

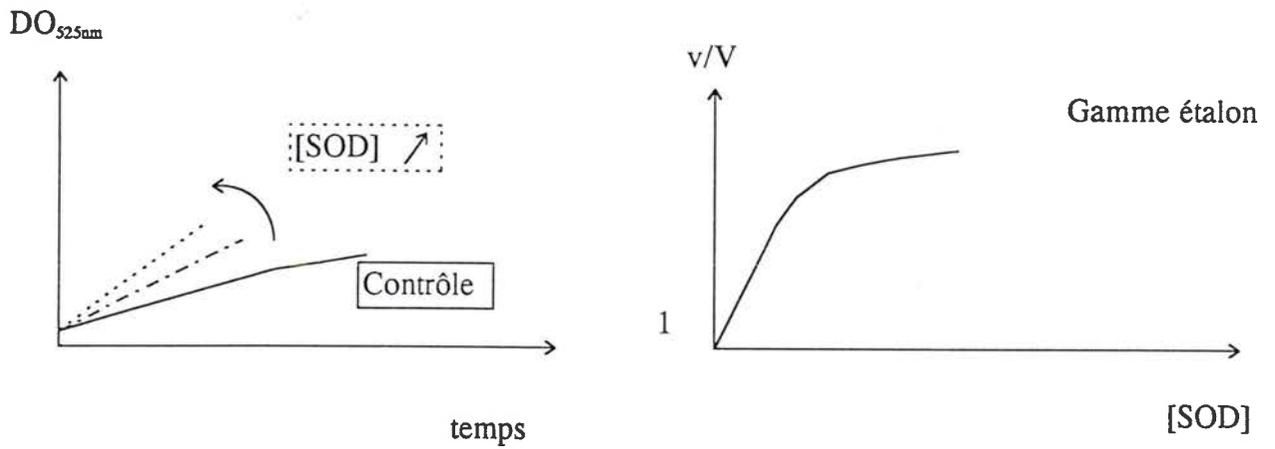
Une unité enzymatique représente la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber de 50 % la vitesse d'auto-oxydation du pyrogallol. Elle est déterminée en représentant %I en fonction de la concentration en SOD ou de la dilution de la fraction. La fonction est linéaire jusqu'à 60% d'inhibition. (Figure 14)

Les tampons étudiés sont :

Tris/HCl 20 mM pH 8,2 ou Tris/Acide cacodylique 50 mM pH 8,2

Certains essais ont été réalisés en présence de DTPA 1 mM dans le tampon

Figure n° 15 : Schéma pour le dosage selon la méthode de Bioxytech :



Sont ajoutés successivement :

- 2,9 ml tampon
- 100  $\mu$ l SOD ou son tampon de dilution pour le contrôle
- 25  $\mu$ l Pyrogallol (24 mM dans HCl 10 mM)

### 3. SOD-525 (Bioxytech)

Cette méthode est basée sur le suivi de la transformation d'un réactif chromogène en composé chromophore à 525 nm, 37°C et à pH 8,8. (Figure 15)

sont ajoutés successivement :

- 30  $\mu$ l de piègeur de mercaptant (dans DMSO contenant 25 % d'éthylène glycol)
- 40  $\mu$ l échantillon SOD ou tampon de dilution pour le contrôle
- 900  $\mu$ l tampon pH 8,8 à 37°C, DTPA 0,11 mM

Le composé chromogène, le piègeur de mercaptant et le tampon pH 8,8 sont fournis dans le kit de dosage Bioxytech SOD-525.(1992)

Le milieu est homogénéisé et incubé 1 min. à 37°C puis sont ajoutés :

- 30  $\mu$ l réactif chromogène (dans  $3,2 \times 10^{-2}$  M HCl)
- mélange rapide et lecture de la DO à 525 nm.

La densité optique est lue à 525 nm et la pente ( $\Delta$ DO) est mesurée autour du temps 30s. (= phase où l'auto-oxydation du chromophore est linéaire).

Une unité enzymatique représente la quantité de SOD qui permet un doublement de la vitesse de formation du produit coloré. La réaction commence lors de la mise en présence du réactif chromogène et du tampon du milieu réactionnel.

Une courbe préétablie par Bioxytech donne la correspondance entre le rapport v/V (= pente présence SOD/pente absence SOD) et le nombre d'unités enzymatiques présentes dans l'échantillon.

Figure n° 16 :

Dosage par la méthode de McCord et Fridovich (1969) : méthode au cytochrome c

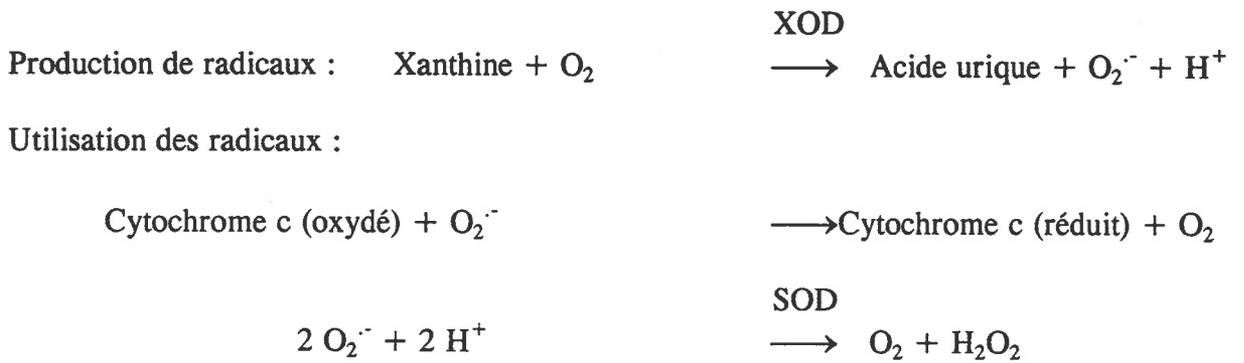
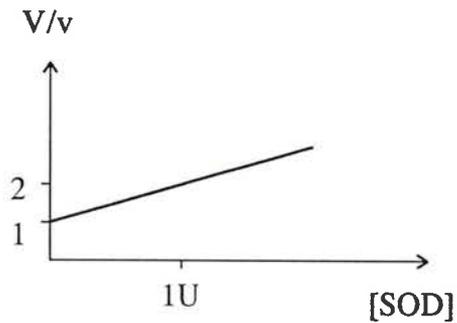


Figure n° 17 : Représentation selon Asada & al., (1974) :



#### 4. Méthode de McCord & Fridovich (1969)

La production de radicaux superoxyde se fait grâce au système xanthine/xanthine oxydase. Les radicaux vont réduire le cytochrome c. (Figure 16)

Sont ajoutés successivement :

- 2,8 ml de tampon phosphate pH 7,8 ; 50 mM  
contenant :

EDTA,Na <sub>2</sub>	0,1 mM
Cytochrome c (ox)	10 μM
Xanthine	50 μM

- 100 μl de xanthine oxydase 1,67 mU/ml (ajouté pour démarrer la réaction de production des radicaux)

La SOD est présente pour l'essai (100 μl pour 3 ml) ou absente pour le contrôle. Le suivi de la réaction dure environ trois minutes et se fait à 550 nm.

Une unité enzymatique de SOD inhibe la vitesse de réduction du cytochrome c de 50 % dans un système couplé avec la xanthine et la xanthine oxydase, à pH 7,8, à 25 °C et dans un milieu réactionnel de 3 ml. La concentration en xanthine oxydase doit permettre une Δ DO de 0,025 /min.

L'interprétation des résultats a été faite selon la méthode d'Asada & al. (1974) qui consiste à représenter V/v en fonction de la concentration en SOD (Figure 17) :

$$V/v = 1 + K[SOD]$$

où V = vitesse en absence de SOD (contrôle)

v = vitesse en présence de SOD (essai)

K = ke/ka

ke = constante de réaction O<sub>2</sub>·<sup>-</sup> avec SOD

ka = constante de réaction O<sub>2</sub>·<sup>-</sup> avec le cytochrome c

## II. Recherche d'une méthode de dosage sensible et rapide

### 1. Méthode de Paoletti & al. 1986

Suite aux dosages sur poissons effectués par Babo (1989) au laboratoire, nous avons commencé nos essais avec la méthode de Paoletti & al. (1986).

#### Nature du tampon

Nous avons tout d'abord étudié l'influence de la nature du tampon sur le dosage de la CuZn-SOD. En effet Babo (1989) avait utilisé au laboratoire un tampon phosphate ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ ) pour le dosage de la SOD sur poisson par la méthode de Paoletti alors que ce dernier préconise l'emploi d'un tampon TDB (Triéthanolamine-Diéthanolamine).

Les dosages de la CuZn-SOD bovine ont été réalisés en présence de tampon TDB, 100 mM, pH 7,6 ou en présence de tampon phosphate 50 mM, pH 7,6.

Les dosages sur CuZn-SOD donnent :

1 U = 40 ng/ml pour le tampon phosphate

1 U = 44 ng/ml pour le tampon TDB.

Les activités obtenues en présence des deux tampons sont les mêmes, nous avons donc continué les dosages avec le tampon phosphate qui sera le tampon utilisé pour l'homogénéisation des tissus d'*Unio tumidus*.

#### Concentration en EDTA/MnCl<sub>2</sub>

Puis nous avons étudié l'influence des concentrations en EDTA/MnCl<sub>2</sub> et du taux de production des  $O_2^{\cdot -}$  en liaison avec l'oxydation du NADH sur les niveaux d'activités

Tableau n° 10: quantités de SOD équivalentes à 1 U.E., calculées à partir de gammes étalon de CuZnSOD et réalisées en présence de différentes concentrations en EDTA/MnCl<sub>2</sub>.

EDTA/MnCl <sub>2</sub> (mM)	pente contrôle (DO/min. x10 <sup>-3</sup> )	[SOD] pour 1 U.E. (ng/ml)
1,75/0,87	8,4	9 à 13 (extrapolé)
2,33/1,17	16,9	19 (extrapolé)
2,92/1,46	24,2	28
3,5/1,75	24,5	50

enzymatiques mesurés. La production de radicaux (qui nécessite la mise en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol et de EDTA/MnCl<sub>2</sub> a été modulée en faisant varier la concentration en EDTA/MnCl<sub>2</sub> tout en gardant les autres paramètres constants.

La CuZn-SOD a été testée sur une gamme de concentrations finales en EDTA/MnCl<sub>2</sub> allant de 1,75/0,87 à 3,5/1,75 mM.

Dans le tableau 10, on remarque que la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber de 50 % de la réaction d'oxydation du NADH (c'est à dire utiliser 50% des radicaux produits) dépend du taux de production de ces radicaux (ou pente du contrôle). Cela signifie qu'il faut se placer à concentration constante en EDTA/MnCl<sub>2</sub> afin d'obtenir toujours la même production de radicaux et de pouvoir comparer les essais. Lors des études sur le terrain, nous avons utilisé EDTA/MnCl<sub>2</sub> à la concentration de 3,3/1,7 mM.

La méthode de Paoletti & al. (1986) étant assez longue (20 à 30 min.), nous en avons testé d'autres plus rapides : méthode de Marklund & Marklund (1974)

SOD-525 (Bioxytech)

McCord & Fridovich (1969)

## **2. Recherche d'une méthode plus rapide**

### ***a) Méthode de Marklund***

La méthode de dosage de Marklund & Marklund (1974) pour laquelle on suit l'auto-oxydation du pyrogallol a été testée pour sa rapidité par rapport à celle de Paoletti.

Influence du tampon :

Nous avons comparé deux tampons :

Tableau n° 11: valeurs moyennes et coefficients de variation de la pente de la droite d'auto-oxydation du pyrogallol dans du tampon Tris/HCl et tampon Tris/Acide cacodylique à pH 8,2 et en absence de DTPA.

<i>Pente du contrôle</i>	<i>mesures sur 2 minutes</i>	<i>mesures sur 5 minutes</i>
Tampon Tris/HCl	18 ± 1	17 ± 3
Tampon Tris/acide cacodylique	17 ± 1	17 ± 3

Tableau n° 12: Pourcentages d'inhibition par la SOD de l'oxydation du NADH (méthode de Paoletti) ou de l'auto-oxydation du pyrogallol (méthode de Marklund)

Méthode de dosage	Dilution du S12000		% inhibition du contrôle par la SOD du S12000 ± $\sigma$	
Paoletti	1/10		60 ± 3	
		1/60		32 ± 1
Marklund	1/5		60 ± 1,5	
		1/10		35 ± 1

$\sigma$  = écart type sur trois mesures spectrophotométriques à partir d'un même échantillon

Tris/ acide cacodylique, 50 mM, pH 8,2 préconisé par Marklund  
 et Tris/HCl, 50 mM, pH 8,2 : éviterait l'emploi de l'acide cacodylique qui contient de l'arsenic.

L'étude des deux tampons pour le dosage par la méthode de Marklund a montré qu'une meilleure sensibilité était obtenue avec le tampon Tris/Acide cacodylique par rapport au tampon Tris-HCl à pH 8,2 :

Tampon Tris/HCl pH 8,2 : une Unité enzymatique obtenue pour 400 ng/ml

Tampon Tris/Acide cacodylique pH 8,2 :

une Unité enzymatique obtenue pour 200 ng/ml

Nous avons aussi comparé les résultats selon que les calculs d'activité étaient réalisés durant les deux ou les cinq premières minutes.

L'auto-oxydation du pyrogallol se fait à la même vitesse en présence des deux tampons mais on remarque (Tableau 11) que les mesures sont plus reproductibles pendant les deux premières minutes de la cinétique.

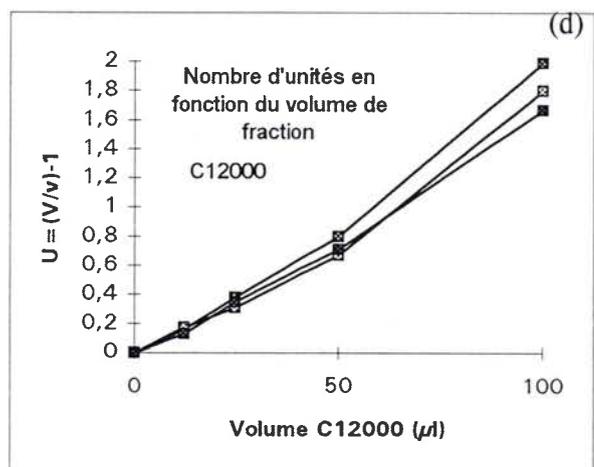
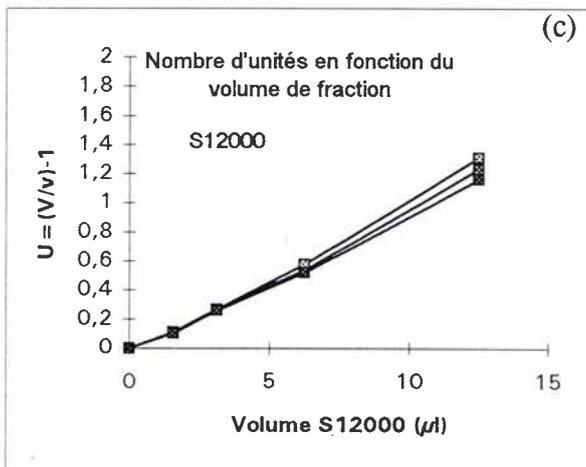
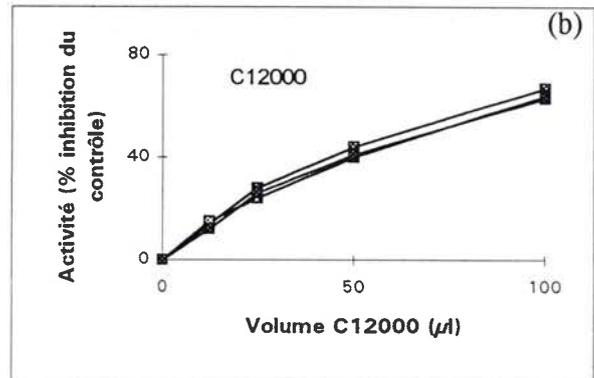
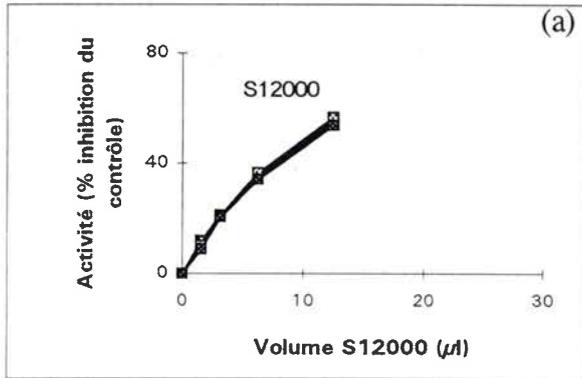
#### ***b) Comparaison des sensibilités de la méthode de Paoletti et de la méthode de Marklund***

Les sensibilités de la méthode de Paoletti et de la méthode de Marklund ont été comparées à partir d'un même surnageant non particulaire (S12000) de glande digestive d'*Unio tumidus*.

Les mesures ont été réalisées en triplicats pour chaque dilution. (La préparation du S12000 est décrite chapitre III. 1., figure 23).

Les résultats (Tableau 12) montrent que pour obtenir un même pourcentage d'inhibition, le dosage par la méthode de Marklund implique d'utiliser des fractions deux à six fois plus concentrées que lors du dosage par la méthode de Paoletti. Il apparaît donc que la méthode de

Figure n° 18 : représentation des activités mesurées par la méthode de McCord & Fridovich (1969) dans le S12000 (a,c) et le C12000 (b,d) de glandes digestives. Le nombre d'unités enzymatique est déduite après transformation d'Asada & al. (1974) (c,d)



Paoletti est beaucoup plus sensible pour les faibles activités superoxyde dismutase et sera choisie pour les mesures d'activité chez *Unio tumidus*.

La moins bonne sensibilité de la méthode de Marklund constituerait un handicap en cas de faibles mesures d'activités SOD des fractions.

### **c) Méthode SOD-525 (Bioxytech)**

La méthode SOD-525 (BIOXYTECH, 1992) est sensée être très rapide (deux minutes) et sensible. Nous avons essayé cette méthode de dosage sur SOD commerciale puis sur un mélange de SOD commerciale et de S12000.

Pour la SOD pure, une unité enzymatique (quantité qui permet le doublement de la réaction contrôle) est obtenue pour une concentration de 400 ng/ml dans la cuve.

Cette méthode est donc moins sensible que les méthodes précédentes.

De plus les essais sur fraction S12000 diluée au demi ont montré une forte interférence des constituants cellulaires sur l'oxydation du réactif chromogène : une importante inhibition (75 %) de la formation du produit coloré alors que cette réaction devrait être fortement accélérée par la SOD.

### **d) Méthode de McCord et Fridovich (1969)**

Des essais sur CuZn-SOD pure ont donné  $1 \text{ U} = 83 \text{ ng/ml}$  dans la cuve de dosage. Cette méthode est donc environ deux à trois fois moins sensible que celle de Paoletti & al. (1986). Son utilisation est cependant très répandue, nous avons donc comparé les deux méthodes. Des essais sur fractions de glandes digestives donnent une relation linéaire par la méthode d'Asada entre le nombre d'unités enzymatiques et la quantité de S12000 dans la cuve de dosage (Figure

Tableau n° 13 : Nombre d'unités enzymatiques de CuZn-SOD qu'il faut ajouter à la fraction tissulaire pour atteindre une unité enzymatique dans la cuve. Les dosages sont faits par la méthode de Paoletti & *al.*, (1986) modifiée, sur S12000 et C12000 de glandes digestives et de branchies

	Unités dans la glande digestive	Quantités (en U) à ajouter pour obtenir une unité	
		Valeurs théoriques	Valeurs expérimentales
S12000	0,4	0,6	0,3 0,4 0,4 0,36 ± 0,06
C12000	0,56	0,44	0,44
	Unités dans les branchies		
S12000	0,48	0,52	0,46 0,44 0,42 0,44 ± 0,02
C12000	0,59	0,41	0,34 0,44 0,39 ± 0,07

18c). Pour le C12000, cette relation n'est plus linéaire et peut engendrer des extrapolations erronées de valeurs d'activité dans le culot. Le volume équivalent à une unité ne sera pas le même selon qu'il est extrapolé à partir d'une mesure sur 10  $\mu$ l ou sur 50  $\mu$ l (Figure 18d).

### **3. Etude des facteurs interférents présents dans les fractions tissulaires**

Nous avons cherché à déterminer quelle était la méthode la plus fiable pour le dosage de la SOD dans les fractions biologiques. Pour cela, nous avons ajouté de la CuZn-SOD pure à des échantillons de glande digestive ou de branchie avant les mesures.

#### ***a) Méthode de Paoletti & al. (1986)***

Après avoir mesuré l'activité SOD de la fraction étudiée (S12000 ou C12000), nous avons déterminé le nombre d'unités enzymatiques de CuZn-SOD à ajouter à la fraction pour atteindre une unité dans la cuve (Tableau 13). Vu la durée du dosage, nous n'avons pas toujours procédé aux mesures en triplicats, cependant, chaque détermination est le résultat de plusieurs mesures qui servent à déterminer la quantité d'échantillon équivalente à une unité (pour les déterminations des activités contenues dans le S12000 et dans le C12000 par exemple). Une seule mesure ne permet pas de déterminer la quantité d'enzyme dans un échantillon. C'est pour cela que nous avons exprimé les résultats en nombre d'unités ajoutées à la fraction pour atteindre une unité enzymatique.

En l'absence d'écart-type, il est difficile de tirer des conclusions sur la présence possible de substances interférentes.

Dans la glande digestive, l'activité de la SOD commerciale est amplifiée en présence de S12000 puisqu'il suffit d'ajouter 0,36 U de CuZn-SOD à 0,4 U de S12000 pour obtenir une

Tableau n° 14 : Nombre d'unités mesuré sur de la SOD commerciale, dans une fraction (S12000 ou C12000) ou sur le mélange des deux. Dosages par la méthode de McCord & Fridovich sur glande digestive et branchies, évaluation du nombre d'unité par la méthode d'Asada & *al.*, (1974)

Glandes digestives	SOD		S12000		SOD + S12000	
	0,17					
	0,12		0,15		0,3	
	0,12	0,15 ± 0,02	0,17	0,15 ± 0,02	0,32	0,32 ± 0,02
	0,17		0,13		0,33	
	0,15				0,34	
	0,17					
	SOD		C12000		SOD + C12000	
	0,24		0,24		0,42	
	0,21	0,23 ± 0,02	0,22	0,24 ± 0,02	0,45	0,43 ± 0,02
	0,25		0,26		0,45	
					0,42	
Branchies	SOD		S12000		SOD + S12000	
	0,16		0,23		0,43	
	0,16		0,23		0,44	
	0,18		0,22		0,46	
	0,21	0,2 ± 0,04	0,18	0,22 ± 0,03	0,39	0,41 ± 0,03
	0,22		0,17		0,39	
	0,27		0,24		0,36	
			0,25		0,39	
			0,26			
	SOD		C12000		SOD + C12000	
			0,18		0,36	
		0,2 ± 0,04	0,19	0,18 ± 0,01	0,40	0,40 ± 0,04
		0,18		0,44		

Figure n°19 : Activités totales contenues dans les glandes digestives (a) et les branchies (b) de six moules *Unio tumidus*. Ces activités totales représentent la somme des activités mesurées dans le S12000 et le C12000 par la méthode de McCord et Fridovich (1969) ou par la méthode de Paoletti & al. (1986) .

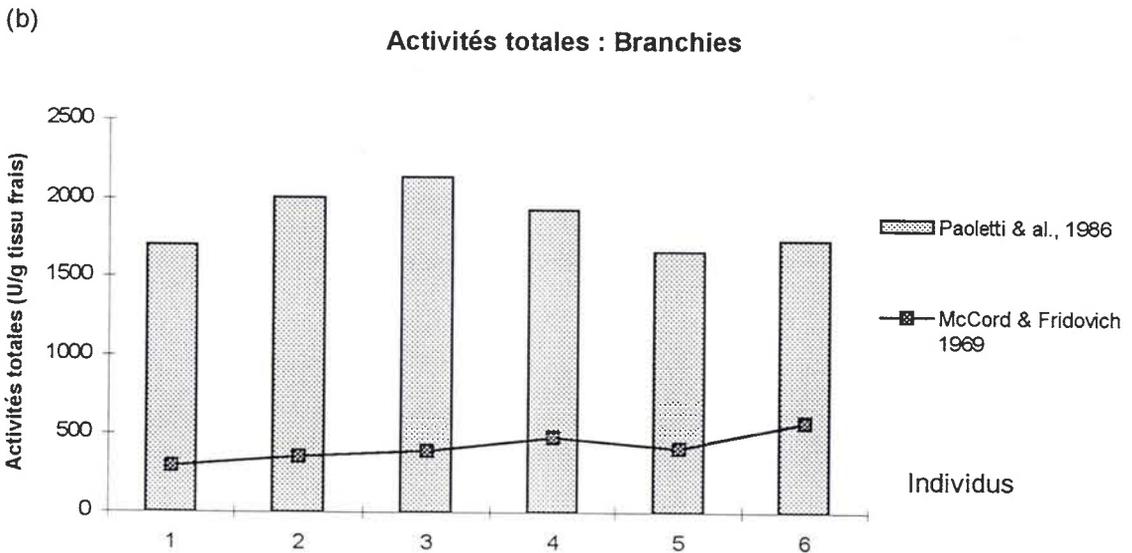
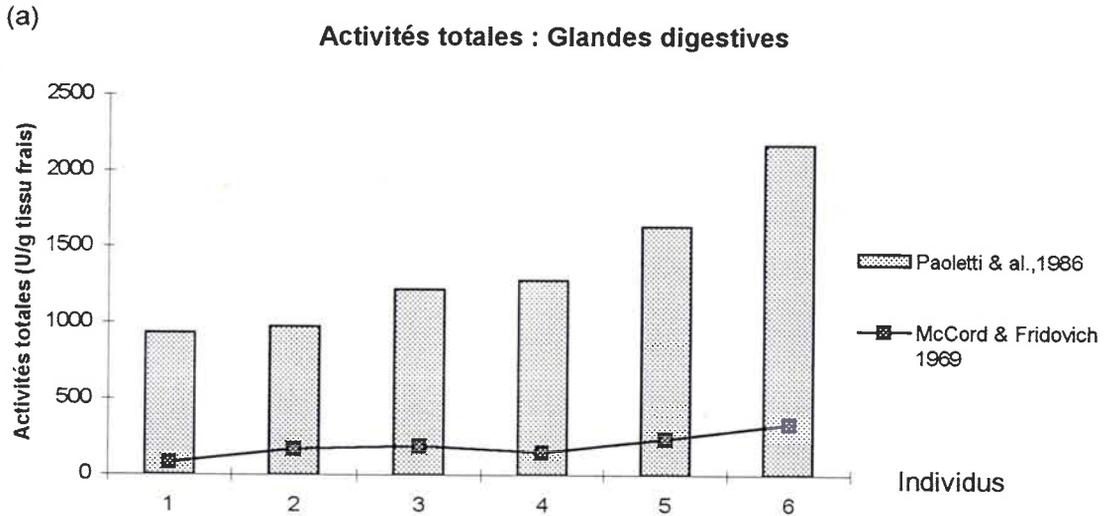
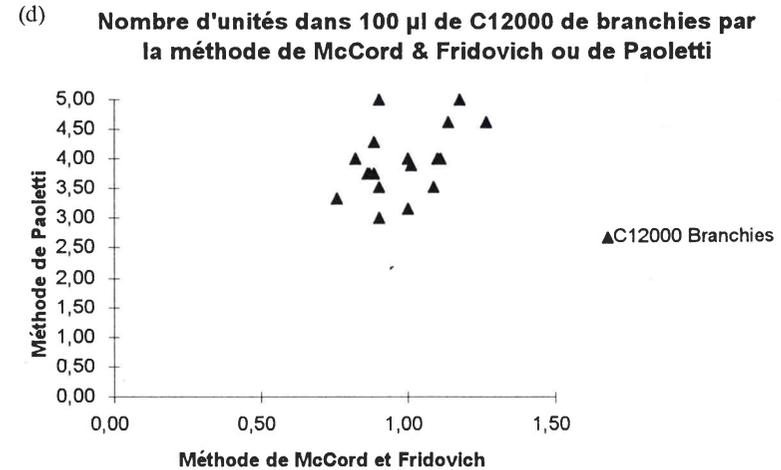
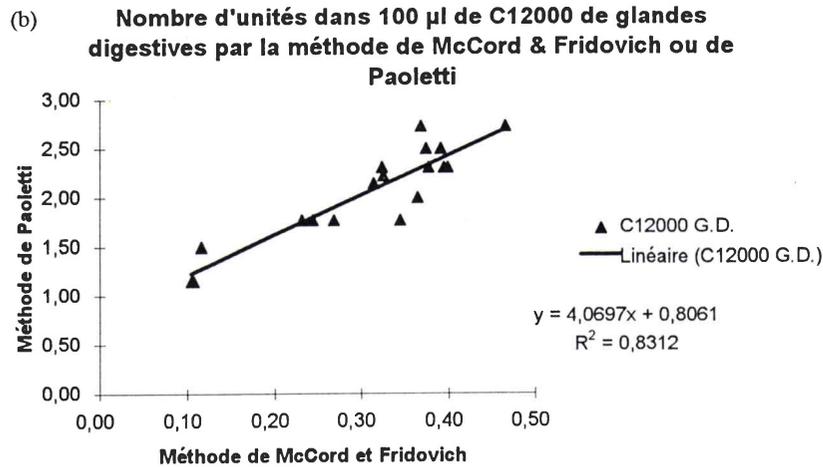
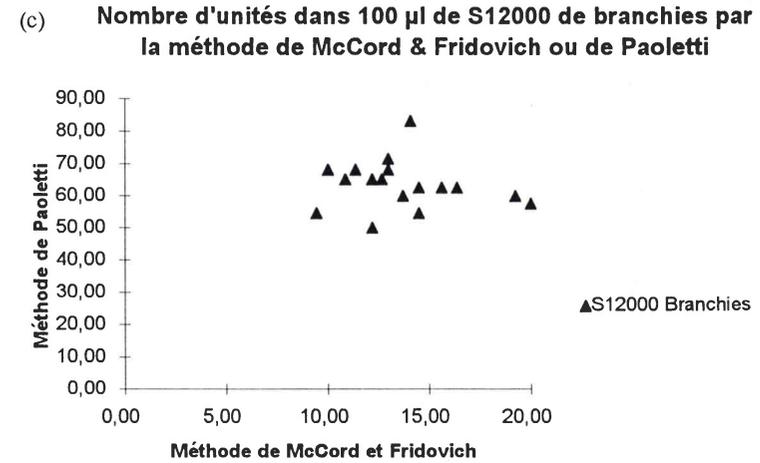
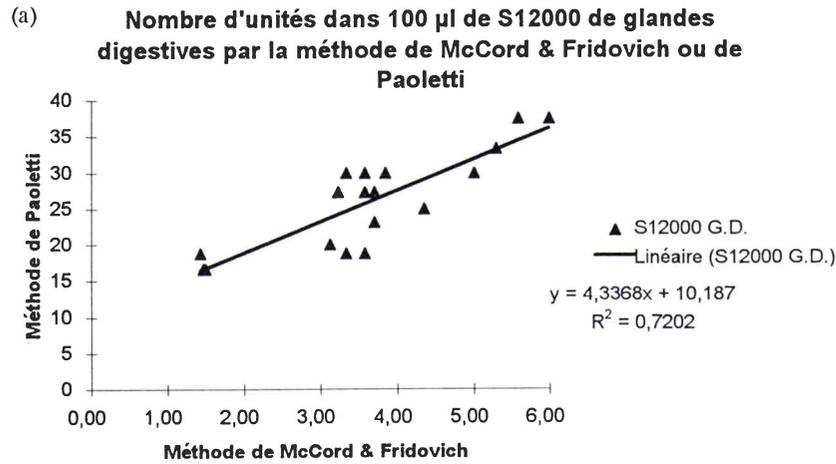


Figure n°20 : Comparaison de la méthode de McCord & Fridovich et de la méthode de Paoletti. Représentation du nombre d'unités dans 100 µl mesurées par les deux méthodes dans les glandes digestives (a,b) et dans les branchies (c,d) au niveau du S12000 (a,c) et du C12000 (b,d)



mesure de une unité. En revanche, on n'observe pas de modification d'activité lorsque la SOD commerciale est ajoutée à 0,56 U de C12000.

Dans les branchies, les valeurs obtenues sur les mélanges de S12000 et SOD commerciales montrent que l'activité de la CuZn-SOD est légèrement amplifiée. Ici, la présence de C12000 n'a pas non plus d'effet sur la mesure d'activité de la SOD pure.

#### ***b) Méthode de McCord et Fridovich (1969)***

Nous avons entrepris des dosages sur de la CuZn-SOD commerciale, sur du S12000, sur du C12000, ou sur un mélange de CuZn-SOD et d'échantillon biologique. Une quantité constante de SOD commerciale a été ajoutée aux échantillons. L'activité finale a été comparée aux activités mesurées séparément sur SOD pure et sur échantillon biologique.

Lors de ces essais, la méthode d'Asada a été utilisée afin de linéariser les résultats et de pouvoir les comparer ( $V/v-1 = \text{nombre d'unité}$ ).

Que ce soit avec le S12000 ou le C12000 de glande digestive, le nombre d'unités enzymatiques obtenues par ajout de CuZn-SOD n'est pas différent de l'addition des deux activités séparées (Tableau 14). Par exemple,  $0,5 (\pm 0,02) + 0,15 (\pm 0,02)$  est équivalent à  $0,32 (\pm 0,02)$

De même, l'activité mesurée sur un mélange de SOD commerciale et de branchie est égale à la somme des deux activités.

#### **4. Comparaison des méthodes lors de dosages simultanés par les méthodes de Paoletti & al. (1986) et de McCord et Fridovich (1969) sur glandes digestives et branchies**

Des organismes prélevés sur deux sites témoins dont les organes avaient été conservés dans l'azote liquide ont permis de réaliser cette comparaison. Les dosages par les deux méthodes ont été réalisés le même jour sur les mêmes fractions issues de purification sur Séphadex G25.

La figure 19 (a,b) représente les activités totales obtenues selon les deux méthodes, pour les deux organes et par individu.

La moyenne des activités totales (U/g poids frais) obtenues par la méthode de Paoletti est la même dans les branchies que dans la glande digestive :

Glandes digestives :  $1367 \pm 466$  U/g poids frais

Branchies :  $1861 \pm 193$  U/g poids frais

La méthode de McCord et Fridovich donne un niveau d'activité supérieur dans les branchies par rapport aux glandes digestives :

Glandes digestives :  $193 \pm 87$  U/g poids frais

Branchies :  $417 \pm 99$  U/g poids frais

La représentation du nombre d'unités mesurées par les deux méthodes dans les branchies n'a pas le même aspect pour le S12000 et le C12000 (Figure 20). On remarque que pour une activité de 60 U dans le S12000 (méthode de Paoletti) l'activité mesurée par la méthode de McCord & Fridovich peut aller de 10 à 20 unités (c'est à dire du simple au double). Il n'y a pas de corrélation non plus dans le C12000 mais le nuage de points est plus homogène.

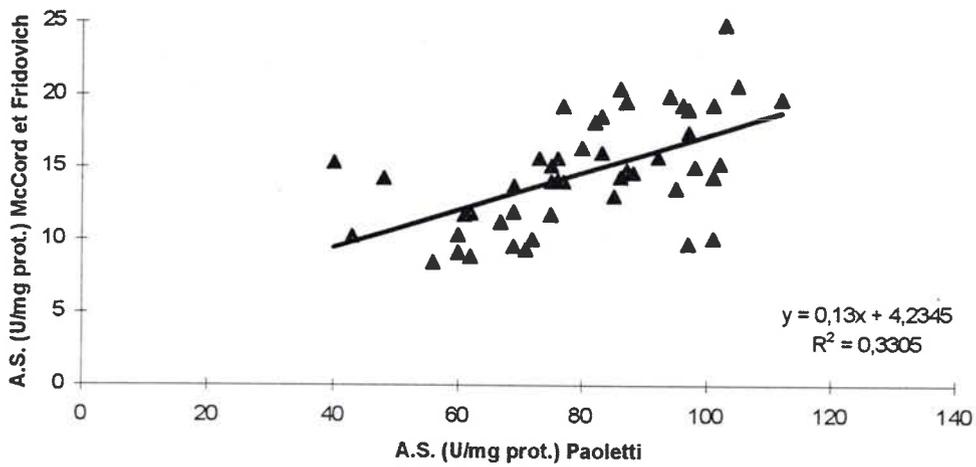
La méthode au cytochrome c pouvant être retenue pour les dosages sur glandes digestives, nous avons réalisé des dosages sur S12000 et C12000 en triplicat et sur 16 individus, en même temps que les dosages par la méthode de Paoletti & al. (1986). Les activités spécifiques trouvées dans le S12000 et le C12000 selon la méthode de dosage sont représentées figure 21 (a,b).

Les équations des droites de régression donnent des ordonnées à l'origine proches de zéro et les pentes pour le S12000 et le C12000 sont voisines :

Figure n°21 : Activités spécifiques mesurées selon la méthode de Paoletti et la méthode de McCord & Fridovich, sur glandes digestives dans le S12000

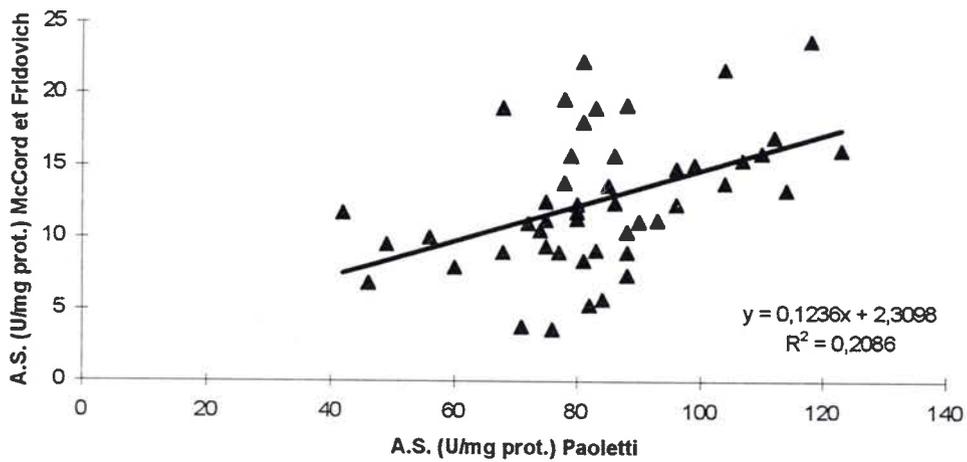
(a)

**Activités spécifiques S12000**



(b)

**Activités spécifiques C12000**



$$S12000 : A.S (McCord et Fridovich) = 0,13 \times A.S.(Paoletti \& al.) + 4,23$$

$$\text{avec } r^2 = 0,33$$

$$C12000 : A.S (McCord et Fridovich) = 0,12 \times A.S.(Paoletti \& al.) + 2,31$$

$$\text{avec } r^2 = 0,2$$

Le coefficient de corrélation est faible dans les surnageants (0,3305) comme dans les culots 12000 g (0,2086). Les activités faibles par la méthode de Paoletti sont aussi faibles par la méthode de McCord et Fridovich. simplement, les variations entre individus semblent plus marquées par cette seconde méthode.

En conclusion, c'est la méthode de McCord et Fridovich qui donne le moins d'interférence. L'évaluation de l'activité SOD des branchies pourrait être réalisée par la méthode de McCord et Fridovich même si la méthode de Paoletti qui surestime les activités est plus sensible.

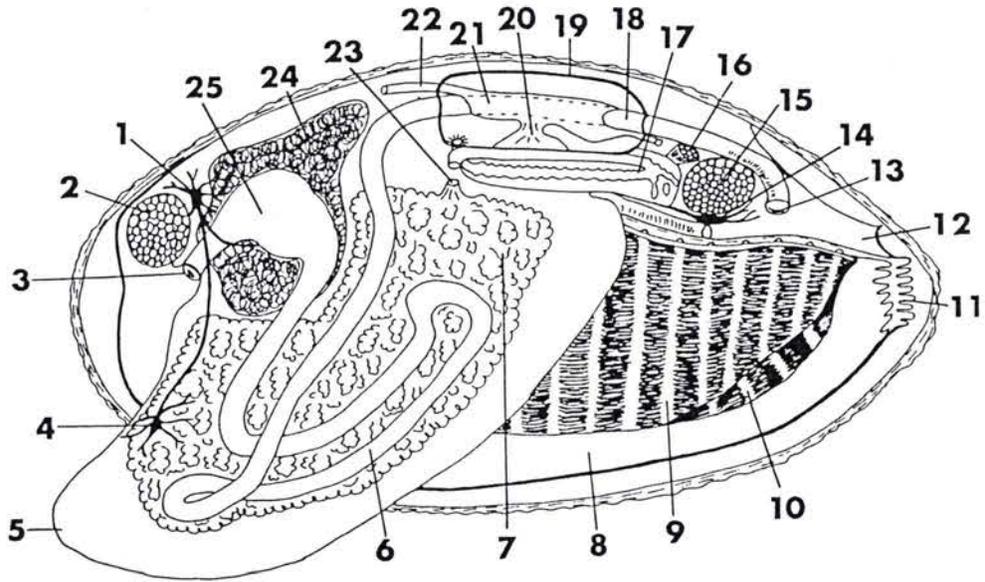
La méthode de McCord et Fridovich a été testée alors que déjà, beaucoup de dosages avaient été faits par la méthode de Paoletti. Cette dernière méthode a tout de même été utilisée par la suite afin de garder une certaine homogénéité dans les résultats et de faciliter les comparaisons.

### **III. Préparation des glandes digestives ou des branchies en vue des dosages enzymatiques**

#### **1. Protocole de fractionnement**

La dissection des Unio s'est faite soit sur sites, soit au laboratoire après transport dans leur eau d'origine lors des premiers essais de mise au point.

Figure n° 22 : Dissection d'un Unio adulte (d'après Maaß, 1987)



1 = Ganglion cérébral ; 2 = Muscle adducteur antérieur ; 3 = Bouche ; 4 = Ganglion pédieux ; 5 = Pied ; 6 = Intestin moyen ; 7 = Gonade ; 8 = Manteau (droit) ; 9 = Branchie interne (droite) ; 10 = Branchie externe (droite) ; 11 = Syphon inhalant ; 12 = Syphon exhalant ; 13 = Anus ; 14 = Ganglion viscéral ; 15 = Muscle adducteur postérieur ; 16 = Muscle rétracteur du pied ; 17 = Rein ; 18 = Intestin ; 19 = Péricarde ; 20 = Oreillette droite ; 21 = Ventricule ; 22 = Aorte ; 23 = Pore génital ; 24 = Glande digestive ; 25 = Estomac



La glande digestive et les branchies (Figure 22) sont pesées, réparties dans des cryotubes et immédiatement plongées dans l'azote liquide (-196°).

Après décongélation rapide (37°C), l'organe étudié est homogénéisé (3 aller-retour de piston de polybroyeur de tissu pour les glandes digestives et 6 pour les branchies) en présence de tampon phosphate pH 7,6 et dans de la glace fondante ; le tampon est utilisé à raison de 2 ml / 500 mg tissu pour la glande digestive et de 1 ml / 500 mg pour les branchies (Figure 23). Il peut contenir selon les expériences un inhibiteur de protéases et un inhibiteur de la glutamyl transpeptidase, le tampon sérine-borate (1 mM).

L'homogénat est centrifugé à 500 g à 4°C pendant quinze minutes. Le surnageant (S500) est récupéré et centrifugé dans des tubes type Eppendorf à 12000 g pendant trente minutes à 4°C. Le surnageant (S12000) est utilisé pour les dosages de SOD après purification sur Séphadex G25 M.

Le culot, homogénéisé à l'aide d'un piston Pellet est repris par 1 ml de tampon d'homogénéisation puis centrifugé à 500 g, 5 min.(a) ou 12000 g, 10 min.(b) : le surnageant est appelé C12000 (a) ou C12000 (b) ; le culot est le CC12000

## 2. Inhibiteurs de protéases

Lors de l'homogénéisation des organes, des protéases peuvent être libérées et dégrader les enzymes. Nous avons donc cherché à limiter ce phénomène en utilisant des inhibiteurs de protéases. Deux types d'inhibiteurs de protéases ont été étudiés :

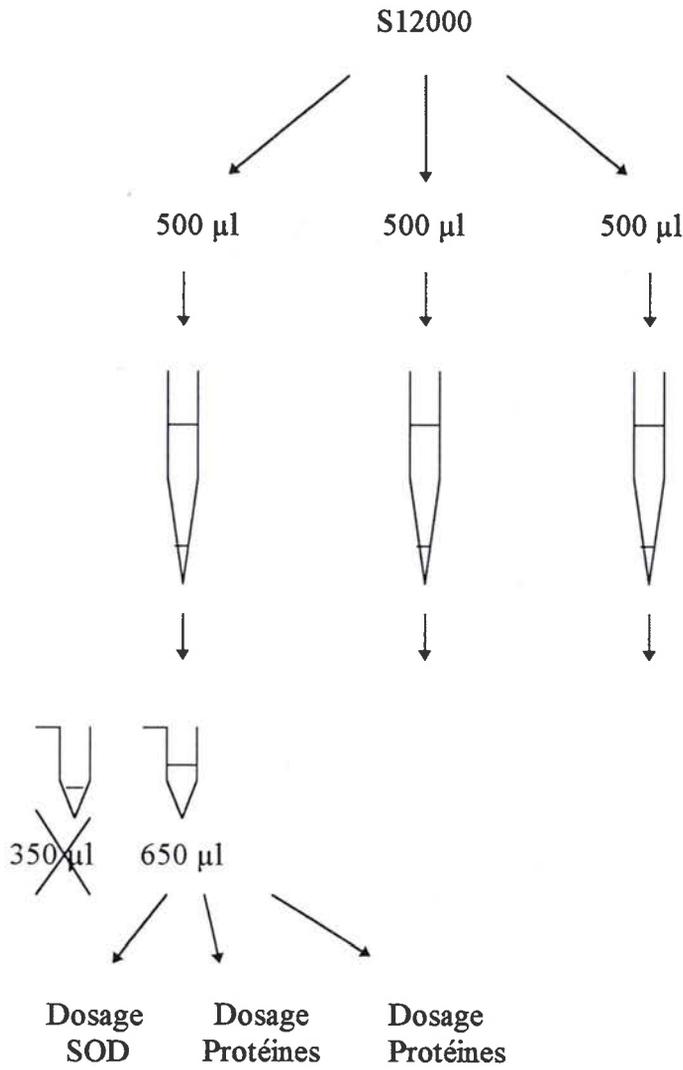
- |  |                     |
|--|---------------------|
| les inhibiteurs de sérines protéases : | - benzamide 1 mM,   |
|  | - benzamidine 1 mM, |
|  | - PMSF 1mM,         |

Tableau n° 15 : Activités spécifiques pour S12000 préparé en présence ou en absence de PMSF ou de tampon Sérine-borate.

Traitement S12000	t=0	t=5h	+PMSF t=5h	+ Sérine-borate t=5h
Activité spécifique	27	25	29	28



Figure n° 24: Préparation de l'échantillon pour le dosage SOD et le dosage des protéines



$\text{Activité spécifique} = \text{activité} / \text{protéines}$ $(U/mg \text{ protéine}) = (U/100 \mu l)$
---

### 3. Purification

Les réactions nécessaires au dosage de la SOD peuvent être accélérées ou inhibées par de multiples facteurs, en particulier les métaux et les molécules réductrices telles la vitamine C ou le glutathion. Nous avons testé plusieurs moyens de se débarrasser de ces molécules contenues dans les homogénats biologiques.

#### *a) Gel filtration*

La gel filtration consiste à faire passer l'échantillon à purifier sur un gel de porosité définie. Nous avons utilisé un gel Séphadex G25M. Le Séphadex se présente sous forme de microbilles composées de chaînes de Dextran polymérisé par de l'épichlorhydrine. Le passage des petites molécules dont on cherche à se débarrasser est retardé car elles pénètrent dans les pores des billes. Les grosses molécules (dont la SOD) ne pénètrent pas dans les pores et sont rapidement éluées. (La limite d'exclusion du G25 pour des protéines globulaires est de 5 KD).

Les colonnes de gel filtration sont constituées d'un cône (pour micropipette de 1 ml) dont l'extrémité étroite est bouchée par du coton, qui permet la rétention du gel. Ce filtre inférieur est recouvert d'un millilitre de gel Séphadex G25M. (Figure 24)

La gel filtration se fait par dépôt de 500  $\mu$ l de la fraction à purifier à la surface du gel. Les 350 premiers  $\mu$ l qui sortent de la colonne (volume mort) sont éliminés. La deuxième fraction de 650  $\mu$ l est conservée pour les dosages. L'éluion se fait avec du tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM, pH 7,6.

Les taux de protéine sont déterminés par la méthode de Bradford, (1976) (Annexe 1).

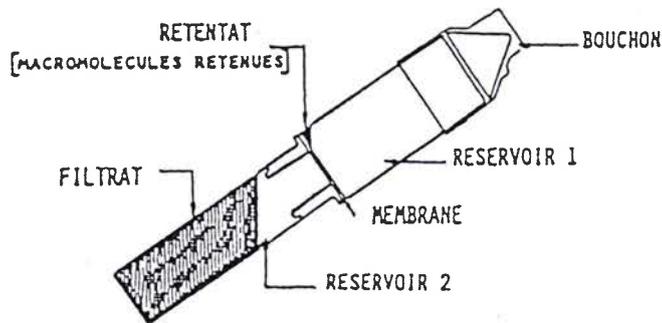
La comparaison a été faite sur S12000 et C12000 de branchies.

Les essais ont été réalisés sur des homogénats de branchies préparés en présence de PMSF. Chacune des fractions S12000 et C12000(b) a été divisée en trois aliquots de 500  $\mu$ l qui ont été passés sur Séphadex G25 de 1 ml.

Tableau n° 16 : Activités spécifiques de S12000 et C12000 de branchies mesurées avant et après passage sur gel Séphadex (U/mg protéines) :

Fraction	Sans purification	Après Séphadex G25
S12000	113 ± 6	122 ± 10
C12000	75 ± 11	195 ± 17

Figure n° 25 : Schéma du microconcentrateur MICROSEP™ (Filtron)



Le réservoir (1) est rempli avec l'échantillon à traiter puis fermé avec le bouchon. Le Microsep doit être placé dans une centrifugeuse à rotor fixe et centrifugé de 3000 à 7500 g (selon le seuil de coupure de la membrane) pendant 20 à 90 minutes.

Tableau n° 17 : Activités et protéines contenues dans la fraction avant et après microconcentration

Volume pour 1 U/ml cuve	5,5 µl	3,2 µl
Protéines	480 µg/ml	825 µg/ml
A.S.	114 U/mg	114 U/mg

L'activité spécifique est la même dans le S12000 passé ou non sur gel de Séphadex. (Tableau 16). En revanche, elle est fortement augmentée par cette étape de purification pour le C12000.

### ***b) Microconcentration***

Un autre moyen de se débarrasser de petites molécules est la microconcentration : l'échantillon est passé sur un filtre dont la taille des mailles est calibrée. Seules les molécules dont le diamètre est inférieur au seuil de coupure du filtre pourront le traverser. La pression nécessaire pour faire passer l'échantillon à travers la membrane poreuse est fournie par la force centrifuge.

Nous avons utilisé un microconcentrateur MICROSEP (Figure 25) dont le seuil de coupure est de 3 KD. (La CuZn-SOD fait environ 30 KD).

La fraction testée était un S12000 de branchies. Une partie a été dosée telle quelle pour son activité ainsi que pour sa richesse en protéines.

Une autre partie a été concentrée : 1500  $\mu$ l ont été déposés dans le réservoir à échantillon du microconcentrateur. La centrifugation à 7500  $g$  a duré 3 h. Nous avons récupéré 700  $\mu$ l d'échantillon concentré.

L'essai de microconcentration sur S12000 de branchies montre que l'activité SOD est concentrée par ce procédé en même temps que d'autres protéines puisque les activités spécifiques obtenues avant ou après microconcentration sont les mêmes (Tableau 17). Ce processus de concentration est très long : les vingt minutes de centrifugation théoriquement nécessaires au passage de l'échantillon ne permettent en réalité que le passage d'une goutte de S12000 à travers le filtre. Cela est peut-être dû à la viscosité très importante du S12000 branchial.

#### **IV. Essais d'identification des deux types de SOD**

Ces essais ont été réalisés par la méthode de Paoletti & *al.* (1986).

##### **1. Inhibition par les cyanures**

Nous avons cherché à distinguer la SOD mitochondriale (Mn-SOD) de la SOD cytoplasmique et peroxysomale (CuZn-SOD) en faisant agir KCN qui inhibe la CuZn-SOD.

##### ***a) Inhibition de la CuZn-SOD pure***

Cette inhibition a été faite pour des dosages de CuZn-SOD bovine par la méthode de Paoletti. Paoletti & Mocali (1990), inhibent la CuZn-SOD (jusqu'à 800 unités/ml) en l'incubant deux heures à 37°C en présence de NaCN 1 mM. La concentration en cyanure dans la cuve lors du dosage ne doit pas dépasser 0,2 mM.

Les premiers essais ont été réalisés après incubation de CuZn-SOD en présence de CN<sup>-</sup> à la concentration de 1mM.

L'inhibition de l'enzyme atteignait 51 % après deux heures d'incubation et après quatre heures, 72 % de la SOD était inactivée.

Les essais suivants ont été conduits en augmentant la concentration en cyanure lors de la préincubation, en prenant garde de ne pas dépasser 0,2 mM de CN<sup>-</sup> dans la cuve lors du dosage. Ils ont consisté en l'incubation d'une solution de CuZn-SOD à 3000 ng/ml (équivalent à environ 100 U/ml)

- pendant une heure    à 37°C en présence de KCN 3 mM, (0,1 mM dans la cuve)
- à 20°C en présence de KCN 3 mM, (0,1 mM dans la cuve)
- à 20°C en présence de KCN 6 mM, (0,2 mM dans la cuve).

Tableau n° 18 : Pourcentages d'inhibition de la SOD (100ng/ml cuve) après exposition un heure au cyanure en fonction de la concentration en inhibiteur et de la température d'incubation de l'enzyme

Température d'incubation	Concentration en cyanure (incubation)	Concentration en cyanure (cuve)	Inhibition de la CuZn-SOD
37°C	3 mM	0,1 mM	100 %
20°C	3 mM	0,1 mM	43 %
20°C	6 mM	0,2mM	73 %

Tableau n° 19 : Pourcentages d'inhibition de la réaction d'oxydation du NADH en fonction des concentrations en CN<sup>-</sup> finales (= dans la cuve). L'incubation de la CuZn-SOD (6000 ng/ml) a duré deux heures à 37°C.

KCN (mM) Préincubation	0	6	30	60
KCN (mM) dans la cuve	0	0,2	1	2
Consommation des radicaux superoxyde par la SOD	96 %	76 %	4 %	0 %

Pour la SOD non traitée, le KCN était remplacé par de l'eau distillée.

L'inhibition de la CuZn-SOD s'est révélée être beaucoup plus rapide à 37°C qu'à 20°C. Elle est aussi plus importante à plus forte concentration en cyanure. Nous avons obtenu une inhibition totale de la solution de SOD à 100 U/ml (Tableau 18).

Nous avons tenté d'inactiver une solution plus concentrée en CuZn-SOD (200 U/ml) à l'aide de cyanure allant de 0,2 à 2 mM (=concentration dans la cuve).

Les valeurs d'activité SOD (c'est à dire d'inhibition de la réaction contrôle) (Tableau 19) montrent qu'après deux heures d'incubation en présence de KCN 6 mM, l'activité de la SOD est encore assez importante. L'enzyme peut encore consommer 76 % des radicaux superoxyde. La dose en KCN nécessaire pour atteindre 100 % d'inhibition de l'enzyme est de 2 mM dans la cuve, ce qui est incompatible avec cette méthode de dosage d'après Paoletti et Mocali, (1990). Nous avons en effet constaté que lors d'un dosage de Mn-SOD commerciale en présence de cyanure à la concentration de 2 mM, l'activité de l'enzyme était multipliée par trois.

#### ***b) SOD *Unio tumidus****

La méthode de McCord et Fridovich a été utilisée pour évaluer la proportion d'activité due à la CuZn-SOD dans des échantillons lors des essais définitifs de transfert de moules d'un site sain vers un site pollué. La mise en présence de CuZn-SOD commerciale et de KCN 2 mM pendant le dosage avait auparavant permis d'inhiber l'enzyme à environ 90%.

Les résultats reportés dans le tableau 20 permettent de donner une proportion de CuZn-SOD dans les échantillons d'au minimum 83%. Ceci est une approximation car en plus du fait que seulement 90% de la CuZn-SOD est inhibée dans nos conditions d'essais, les valeurs des activités résiduelles très faibles sont difficile à déterminer.

Une autre possibilité pour distinguer les deux isoenzymes est le fractionnement subcellulaire.

Tableau n° 20 : Evaluation du pourcentage de l'activité enzymatique due à la CuZn-SOD dans les S12000 de glandes digestives chez *Unio tumidus*.

Cette évaluation a été faite lors des essais de transfert d'un site sain vers un site pollué. Les dosages ont été réalisés en triplicat par la méthode de McCord et Fridovich en présence ou absence de KCN 2 mM.

Proportions de l'activité due à la CuZn-SOD (en %)

	moyenne	écart type	
Site tém. 1 J0	85 ±	6	] 83* ± 4
Site tém. 1 J15	90 ±	5	
Site tém. 1 J30	78 ±	16	
Site tém. 1 J30	79 ±	5	
Site tém. 2	87 ±	7	
Amont J15	88 ±	6	
Amont J15	86 ±	5	
Amont J30	83 ±	6	
Amont J30	85 ±	4	
Amont J'15	76 ±	8	
Amont J'15	85 ±	1	
Aval1 J30	79 ±	4	
Aval2 J'15	61 ±	3	

\* : Cette moyenne ne tient pas compte des mesures réalisées sur l'individu Aval2-2 J'15. En effet les individus de cette condition possèdent des activités spécifiques très faibles et ne peuvent pas être considérés comme normaux.

Tableau n° 21 : Comparaison des activités spécifiques trouvées dans le S500, le C500 et le S12000 de glande digestive de *Unio tumidus*.

Fraction	S500	C500	S12000
A.S. (U/mg prot.)	192	179	256
	198	171	278

## 2. Fractionnement subcellulaire

Le protocole de fractionnement mis en place par Cossu (1992) devait permettre de distinguer entre les activités issues de la fraction particulaire (mitochondries, lysosomes, peroxyosomes) des activités issues de la fraction non particulaire (mais contenant les microsomes et microperoxyosomes).

Les essais sur *Unio tumidus* ont consisté en la vérification du niveau d'activité des différentes fractions. Nous ne procédions pas encore à la purification sur Séphadex, le tampon d'homogénéisation ne contenait pas encore d'inhibiteur de protéase et les conditions de dosage n'étaient pas encore optimisées. Cependant ces essais ont tous été réalisés dans les mêmes conditions et sont donc comparables.

L'activité SOD contenue dans une glande digestive d'*Unio tumidus* a été mesurée dans le S500, le C500 ainsi que le S12000(a). (Dosages par la méthode de Paoletti).

Cette comparaison des activités aux différents niveaux de la préparation nous montre que l'activité spécifique du S12000 est supérieure à celle trouvée dans le S500. La SOD est donc partiellement purifiée par rapport au S500. Cependant, on remarque une activité spécifique encore importante dans le C500. (Tableau 21).

Nous n'avons pas utilisé le C500 par la suite car il contenait des fragments de tissu non broyé lors de l'homogénéisation. Le protocole de préparation des autres enzymes (catalase, glutathion peroxydases et glutathion réductase) a donc été suivi.

Remarquant que les dosages sur C12000(a) étaient sujets à des interférences lors de l'utilisation des fortes concentrations en fraction dans la cuve, nous avons comparé avec le dosage sur C12000(b) c'est à dire centrifugé à 12000 g 10 min. au lieu de 500 g 5 min.

Tableau n° 22 : Comparaison des activités enzymatiques mesurées à partir d'un culot 12000g centrifugé à 500g, cinq minutes et centrifugé à 12000g pendant dix minutes.

	C12000(a)	C12000(b)	S12000
2ème centrifugation	500g, 5 min.	12000g, 10 min.	-
Volume pour 1 U.	100 µl	100 µl	3,1
Protéines (mg/100µl)	368	67	665
A.S.(U/mg protéines)	12	67	72

Tableau n° 23 : Activités spécifiques déterminées dans le C12000 et dans le CC12000

Fraction	A.S.(U/mg protéines)	Proportion par rapport à l'activité totale (%)
S12000	81	84
C12000	67	5
CC12000	35	11

Tableau n° 24 : Activités spécifiques et proportions des activités contenues dans les différentes fractions de glandes digestives chez *Unio tumidus* après exposition ou non dans la Fensch. Dosage par la méthode de Paoletti & al., 1986

Site et individu		CC12000		C12000		S12000	
		A.S. U/mg prot.	A.T U/g pds.frais	A.S. U/mg prot.	A.T. U/g pds.frais	A.S. U/mg prot.	A.T. U/g pds.frais
Site tém. 1 J0	4	49	120	161	232	82	1654
Site tém. 1 J0	5	15	84	124	119	67	1430
Site tém. 1 J15	4	35	154	98	253	82	1783
Site tém. 1 J15	5	27	111	88	241	82	2113
Site tém. 1 J30	4	34	161	76	186	81	1753
Site tém. 1 J30	5	30	105	98	204	83	1786
Site tém. 2	4	22	97	98	173	91	1795
Site tém. 2	5	34	138	74	187	71	1514
Site tém. 2	6	24	115	104	278	69	1908
Amont J15	4	24	120	72	122	70	1441
Amont J15	5	23	91	93	169	66	1646
Amont J30	4	26	136	148	194	81	1815
Amont J30	5	12	106	77	163	76	1705
Amont J'15	4	26	118	70	119	72	1739
Amont J'15	5	40	67	85	128	58	1200
Aval 1 J30	3	24	76	88	115	82	1474
Aval 1 J15	4	18	69	75	141	66	1554
Aval 1 J15	5	13	52	90	148	88	1689
Aval 1 J30	4	11	33	71	121	64	1575
Aval 1 J30	5	14	32	77	96	65	1290
Aval 2 J'15	4	6	24	48	69	44	781
Aval 2 J'15	5	33	40	44	57	42	827
			5%		9%		86%

La comparaison des activités obtenues après centrifugations à 500g ou 12000g pour l'obtention du C12000 nous montre (Tableau 22) qu'une centrifugation à vitesse plus rapide et pendant plus longtemps permet d'augmenter l'activité spécifique mesurée. La centrifugation à 12000g permet l'élimination de composés (organites non broyés) qui ne participent pas à l'activité enzymatique.

Un essai a été réalisé afin d'estimer l'activité résiduelle contenue dans le culot après la centrifugation 12000 g finale. Pour cela, le culot obtenu après centrifugation 12000 g a été homogénéisé à l'aide d'un mini potter et repris par 1 ml de tampon. Cette fraction est appelée CC12000.

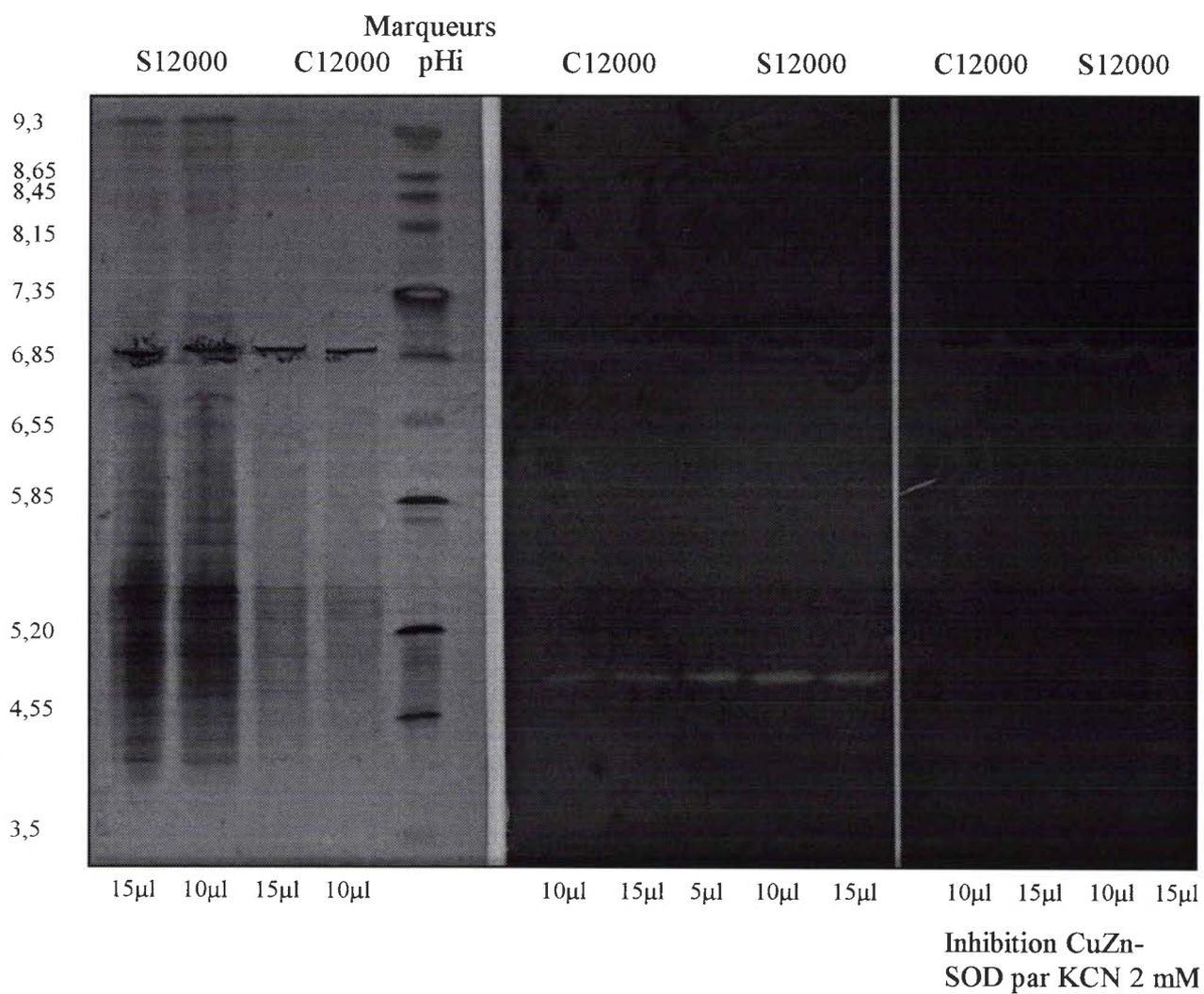
Les mesures d'activités dans le C12000 et dans le culot résultant (CC12000) nous montrent que l'activité spécifique résiduelle du CC12000 (35 U/mg prot.), comme l'activité totale, n'est pas négligeable (Tableau 23). Le CC12000 contient onze pour cent de l'activité alors qu'à peine la moitié est retrouvée dans le C12000.

Cette activité est en partie due à la MnSOD (mitochondriale). L'élimination de cette fraction entraîne une perte de l'enzyme mais elle permet d'éliminer des facteurs interférents et facilite ainsi les mesures.

Des essais ultérieurs (transfert d'un site sain vers un site contaminé) ont servi à déterminer l'activité résiduelle dans le CC12000. La préparation des S12000, C12000 et CC12000 a été faite ici par une personne différente par rapport aux premiers essais. Le rapport entre les activités totales contenues dans le CC12000 et le C12000 est inversé (Tableau 24) alors que les activités spécifiques sont du même ordre de grandeur.

Les pertes de matériel qui peuvent avoir lieu aux différentes étapes de purification sont susceptibles de varier avec l'expérimentateur, bien que les activités spécifiques mesurées ne soient pas modifiées. De plus on remarquera que la perte enregistrée au niveau du CC12000 ne représente que cinq pour cent en moyenne de l'activité totale. Cela est négligeable si l'on considère le coefficient de variation sur les mesures d'activité qui est d'environ dix pour cent.

Figure n° 26 : Visualisation de l'activité superoxyde dismutase de *Unio tumidus* après isoélectrofocalisation sur gel de polyacrylamide (pH 3-10)



Coloration au  
Bleu de Coomassie

Révélation des SOD par la méthode de Beauchamp  
et Fridovich, 1971

CuZn-SOD *Unio tumidus* : pHi = 4,9

### 3. Isoélectrofocalisation

La SOD contenue dans les échantillons a aussi été visualisée sur gel de polyacrylamide après isoélectrofocalisation : 15  $\mu$ l d'échantillon (S12000 ou C12000) passé sur colonne Séphadex sont déposés sur le gel (SERVA PRECOTES 3-10, 245 x 125 mm, épaisseur = 300  $\mu$ m).

La migration se fait sous 15 mA pendant quatre heures. Le support du gel est réfrigéré entre 0 et 4°C. Lorsque la migration est finie, le gel est retiré et découpé selon le type de révélation à réaliser :

La bande où ont été déposés les marqueurs de pHi est colorée au bleu de Coomassie (Annexe 2) afin de visualiser les protéines.

Les bandes contenant l'échantillon à étudier sont d'abord mises à tremper dans du nitro bleu de tétrazolium à 0,025 % pendant 20 minutes à l'obscurité. Si on désire inhiber la Fe-SOD, on ajoutera du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mM) dans ce bain et dans le suivant.

Après les vingt minutes, le gel est transféré dans un tampon TEMED-riboflavine (Annexe 2) pendant quinze minutes. L'ajout de KCN 2 mM permettra d'inhiber la CuZn-SOD, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mM) inactivera la Fe-SOD ; cette étape nécessite aussi l'obscurité. A la fin de cette période d'incubation, le gel est exposé à la lumière pendant dix minutes environ à température ambiante. La révélation est stoppée lorsque le contraste est maximum.

Ces essais d'isoélectrofocalisation ont permis de déterminer le pHi de la CuZn-SOD d'*Unio tumidus* qui est de 4,9 (Figure 26) dans la glande digestive et dans les branchies. Ils n'ont pas permis cependant la mise en évidence de la Mn-SOD. Des dépôts plus importants de fraction avaient pour conséquence une déformation des lignes de migration (en vagues au lieu de rectilignes) mais sans l'apparition de nouvelles bandes.

## **V. Discussion**

### **1. Les méthodes de dosage**

Les premiers essais de comparaison des tampons pour la méthode de dosage de Paoletti & *al.* (1986), ont donné des résultats de sensibilité égaux pour le tampon TDB et le tampon phosphate. DeFreitas & Valentine (1984) avaient montré que la CuZn-SOD pouvait être partiellement inhibée pour des concentrations en phosphate égales ou supérieures à 50 mM et à force ionique constante. Les ions phosphates se fixeraient à l'Arginine-141 dont la chaîne chargée positivement serait neutralisée. Cet arginine ne pourrait plus participer au guidage des radicaux superoxyde vers le site actif. Une autre possibilité selon DeFreitas & Valentine (1984) serait que le phosphate se fixe au cuivre du site actif. Ces auteurs proposent d'utiliser un tampon Hepes [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid] à la place du tampon phosphate. Dans nos conditions, la nature du tampon n'ayant pas de conséquence sur les activités mesurées, nous avons continué à utiliser le tampon phosphate 50 mM, pH=7,6.

Lors des essais par la méthode de Paoletti, nous avons remarqué que la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber la réaction contrôle de 50 % (= une unité) dépendait du niveau de cette réaction contrôle (c'est à dire du niveau de production des radicaux superoxyde. Cette observation est en accord avec celles de Jewett & Rocklin (1993) qui ont étudié plusieurs méthodes indirectes de dosage de la SOD. Elle a pour conséquence que si une substance augmente la vitesse d'oxydation du NADH (méthode de Paoletti & *al.*, 1986), la sensibilité de l'essai est diminuée. Si plusieurs volumes d'un échantillon inconnu sont utilisés pour déterminer une Unité de SOD, la quantité de substance qui interfère ne sera pas constante dans les essais. Cependant, l'utilisation de méthodes indirectes permet l'obtention d'une meilleure indication sur le comportement des analogues de la SOD *in vivo* (Goldstein & Czapski, 1991).

Les essais de comparaison de tampon pour le dosage par la méthode de Marklund ont montré une meilleure sensibilité lors de l'utilisation du tampon Tris/acide cacodylique par rapport à l'utilisation du tampon Tris/HCl. Une unité enzymatique équivaut à 400 ng SOD/ml en présence de Tris/HCl contre 200 ng/ml en présence de Tris/acide cacodylique. Selon Marklund & Marklund (1974), les ions chlorures auraient une action inhibitrice sur la SOD.

La méthode de Paoletti & *al.* (1986) est la plus sensible. La méthode de Marklund et Marklund (1974), ainsi que la méthode de Bioxytech ne permettaient pas toujours de mesurer les activités présentes dans le C12000. En effet, lors de l'utilisation de ces deux techniques, nous pouvions observer parfois une diminution d'activité alors que le volume de fraction mis dans la cuve de dosage augmentait. La méthode au cytochrome c n'a été testée qu'au cours de la deuxième partie de cette étude et donc jusque là, la méthode de Paoletti a été retenue.

## 2. Ajouts dosés

Par la méthode de Paoletti les constituants cellulaires semblent amplifier l'activité SOD des S12000 surtout au niveau des glandes digestives et un peu au niveau des branchies. Le passage sur colonne Séphadex G25 après centrifugation à 12000 g n'aurait pas suffi à éliminer tous les agents interférents au niveau du S12000 mais quelque soit l'organe, les constituants du C12000 ne modifient pas l'activité de la SOD.

Les activités mesurées dans les branchies par la méthode de McCord et Fridovich sont le double de celle des glandes digestives alors que la méthode de Paoletti donne des activités égales pour les deux organes :

Or d'après les ajouts dosés, l'activité dans les glandes digestives est surestimée par la méthode de Paoletti ; cela signifie qu'en réalité, l'activité spécifique des branchies est supérieure à celle de la glande digestive. C'est ce que nous avons observé à l'aide de la méthode de Mc Cord et Fridovich qui n'a pas présenté d'interférence lors des ajouts connus. Il est aussi possible que la méthode de McCord et Fridovich surestime l'activité contenue dans les branchies (les ajouts

connus permettent de mettre en évidence des effets de matrice mais pas de détecter des composés qui se comporteraient comme la molécule à doser).

Une dénaturation de la SOD par chauffage pourrait être entreprise suivie de dosages par les deux méthodes retenues afin de déterminer si les activités sont égales ou non dans la glande digestive et dans les branchies et de déterminer la part d'activité due à des facteurs interférents.

Les branchies des Unionidae sont riches en hémolymphe qui d'après Potts (1954) ne contient pas de pigment respiratoire et est très pauvre en minéraux dissous ainsi qu'en acides aminés. Elles sont recouvertes de mucus qui sert à retenir le phytoplancton nécessaire à l'alimentation des moules. Ce mucus a une capacité importante à fixer les métaux, et pourrait peut-être avoir une influence sur les réactions rédox mises en jeu lors de l'évaluation de l'activité SOD.

Abele-Oeshger (1996) a mesuré les activités SOD chez trois bivalves marins dépourvus de pigment respiratoire (dosages par la méthode de Marklund et Marklund, 1974). Après inactivation de l'activité SOD par ébullition, l'auteur montre que chez ces trois bivalves, l'activité présente au niveau des branchies est pour moins de dix pour cent due à de la CuZn-SOD. Une des espèces étudiées était dépourvue d'activité SOD vraie. L'activité SOD non spécifique allait de 21% ( $\pm 17$ ) à 100%.

Les activités mesurées lors de nos dosages sont au moins à 83% dues à de la CuZnSOD dans les glandes digestives. Selon Abele-Oeshger, cela ne signifie pas forcément que les 17% restants soient issus de l'activité de la Mn-SOD. Au niveau des branchies, les essais d'inhibition n'ont pas été réalisés mais un essai d'isoélectrofocalisation a permis de mettre en évidence de la CuZn-SOD dans le S12000. Le pHi enzymatique de 4,9 déterminé à partir des branchies est le même que celui déterminé au niveau de la glande digestive. Que ce soit dans l'un ou l'autre des organes, la Mn-SOD n'était pas visible après électrophorèse.

La méthode de McCord et Fridovich (1969) qui n'a été testée qu'au cours de la deuxième partie de ce travail doit être retenue pour sa rapidité même si elle est un peu moins sensible que la méthode de Paoletti & al. (1986). Nous l'avons utilisée pour déterminer la proportion d'activité due à la CuZn-SOD, par rapport à l'activité totale. La méthode de Paoletti qui avait déjà été utilisée pour une partie des essais a été gardée pour la fin de l'étude afin d'obtenir des

résultats homogènes, plus faciles à interpréter. Bien que sujette à de possibles interférences, elle nous a permis d'estimer une « SOD like activity » représentative de la capacité à neutraliser les radicaux superoxydes en milieu biologique. On remarquera que les activités spécifiques mesurées dans les S12000 sont très proches de celles mesurées dans les C12000 pour lesquels aucune interférence n'était visible.

L'activité SOD de la fraction particulaire (C12000 et CC12000) est faible comparée à celle du surnageant. La mesure nécessite un volume d'échantillon important, ce qui accroît la probabilité d'interférences. L'estimation de l'activité enzymatique y est plus difficile que pour le S12000.

### **3. Sources de variabilité**

L'activité spécifique représente le degré de pureté de l'enzyme. Elle dépend de la richesse en enzyme par rapport aux protéines totales dans l'organe et du degré de purification lors des essais. La SOD étant principalement cytosolique, son activité spécifique peut dépendre de la présence de protéines membranaires (sans activité) ou d'organites non cassés dans la fraction dosée (contamination du S500 par le C500, du S12000 ou C12000 par le CC12000).

Lors de la purification sur Séphadex G25, le degré de pureté obtenu après passage sur colonne sera fonction du volume de gel, de son degré de tassement, du rapport hauteur sur diamètre de la colonne, mais aussi du volume de l'échantillon à filtrer, de sa charge en molécules à retenir et de la fraction gardée après l'élution.

Afin d'éliminer toutes les petites molécules (sels), l'échantillon déposé ainsi que la fraction récupérée après le volume mort doivent être de faible volume par rapport au volume de gel. En fonction du volume récupéré, l'échantillon contiendra des grosses protéines (passage non retardé) mais aussi des petites protéines dont la proportion dépendra du volume récupéré. Les grosses protéines seront purifiées si le volume récupéré est faible, (avec risque de perte). Si le volume récupéré est grand, les grosses protéines resteront mélangées aux plus petites qui sont

retardées, les pertes seront réduites. La présence en plus ou moins grande quantité des petites protéines non actives sera responsable de la modification de l'activité spécifique ;

L'activité totale dépend de la richesse de l'organe en enzyme, mais aussi des pertes enregistrées à chaque étape de la purification c'est à dire :

-séparation du S500 et C500

-séparation du S12000 et C12000

-séparation du C12000 et CC12000

-pertes lors du passage sur Séphadex G25 : selon le volume de la fraction récupérée, les petites molécules dont l'élution est retardée seront ou non récupérées. Si on désire les éliminer totalement, le volume gardé doit être petit, on risque de ne pas récupérer toutes les grosses protéines.

Plusieurs séries de dosage de CC12000 préparés par des expérimentateurs différents ne donnent pas les mêmes résultats. Les activités spécifiques sont du même ordre de grandeur mais les proportions d'enzyme contenue dans le C12000 et dans le CC12000 sont inversées. Ceci peut être dû au fait que l'homogénéisation, le prélèvement du S500, du S12000, et C12000 n'étaient pas réalisés par la même personne dans les deux cas. Il est possible que nous ayons lors de la séparation du S500 et C500 contaminé le S500 avec la fraction plus lourde. Cette contamination se retrouverait dans le CC12000.

Selon l'opacité de l'homogénat, le S500 peut être difficile à séparer du C500 car souvent, il existe une phase intermédiaire entre les deux. Cette opacité (ou couleur) peut dépendre (pour la glande digestive) du lieu de prélèvement. En effet, nous avons remarqué que les homogénats de glandes digestives obtenues à partir d'individus provenant d'un milieu chargé en matières organiques en décomposition (Site témoin 2) étaient beaucoup plus denses (opaques) que ceux obtenus à partir d'individus issus d'un milieu moins riche (Site témoin 1) (les proportions volume tampon / poids organes restant les mêmes). Malgré cette difficulté, la quantité d'enzyme dans les organites, représentée par la somme CC12000 + C12000 est d'environ 15 % et ne varie pas selon le préparateur.

#### 4. Distinction de la CuZn et de la Mn-SOD

L'inhibition de la CuZn-SOD par les cyanures s'est révélée être difficile lors de l'utilisation de la méthode de Paoletti. En effet, la concentration de 2 mM en cyanure utilisée en général pour inhiber l'enzyme pendant l'essai est incompatible avec cette méthode de dosage. La concentration ne doit pas dépasser 0,2 mM dans la cuve lors des mesures. Paoletti propose d'incuber l'enzyme pendant deux heures en présence de cyanure avant l'essai, mais ce protocole n'a pas suffi lors de nos essais à inhiber des solutions aux concentrations les plus élevées en SOD.

L'inhibition par les cyanures, contrairement à l'inhibition par  $H_2O_2$  est réversible (Borders & Fridovich, 1985).

La difficulté d'estimation des deux types de SOD peut être due à plusieurs causes :

il est possible que la concentration de 0,2 mM en cyanure présent dans la cuve lors du dosage ne soit plus suffisante pour empêcher les ions  $CN^-$  fixés lors de la préincubation de se séparer du site actif au cours de l'essai,

la présence de phosphate 50mM rendrait la fixation de  $CN^-$  sur le site actif moins efficace (DeFreitas & Valentine, 1984).

La distinction entre les deux isoenzymes peut aussi être faite en inhibant la Mn-SOD par du SDS. Il faut tout d'abord posséder de la Mn-SOD purifiée chez l'organisme étudié et vérifier sa résistance au traitement par le SDS. En effet, selon son origine, la Mn-SOD est plus ou moins résistante à la dénaturation.

Le pH isoélectrique de la CuZn-SOD déterminé chez *Unio tumidus* est de 4,9. Pedrajas & al. (1993) ont trouvé une Cu-Zn-SOD de pHi compris entre 5,1 et 6,1 chez *Mugil sp.* avec apparition de nouvelles bandes (isoenzymes) en condition de stress provoquée par  $H_2O_2$ . Nous n'avons pas pu mettre en évidence la Mn-SOD par cette technique électrophorétique car sans doute présente en trop faible quantité. Il serait nécessaire de purifier et concentrer plus les échantillons avant de les déposer sur le gel.

# **III. ETUDES DE TERRAIN ET INTOXICATIONS**

### 3ème partie : études de terrain et intoxications

#### I. Protocoles expérimentaux

Dans une seconde partie, nous avons mesuré les niveaux de base de la superoxyde dismutase chez *Unio tumidus* au niveau de la glande digestive et des branchies. Ces mesures ont été réalisées en octobre et aux mois de mai-juin. (Des dosages des glutathion peroxydases, glutathion réductase, du glutathion et de la catalase ont été réalisés en parallèle par C. Cossu-Leguille. Les quantités de malonaldéhyde, produit de la lipoperoxydation, ont été déterminées par A.Doyotte).

Les études sur *Unio tumidus* ont été menées dans deux directions complémentaires :

- évaluation du niveau d'activité SOD en conditions normales (=niveaux de base) en fonction de la saison, de la période de reproduction pour les organismes femelles et du site de prélèvement.
- évaluation de la réponse des *Unio* lors d'intoxications en laboratoire ou lors de transferts de moules encagées en milieux pollués. L'effet de l'encagement sur l'activité SOD des moules a été étudié préalablement à ces études.

L'organe étudié est préparé comme indiqué (2ème partie,III., figures 23 et 24). Les mesures d'activité sont réalisées en triplicat sur les fractions S12000 et C12000. Pour le S12000 par exemple, trois aliquotes de 500  $\mu$ l seront passés sur trois colonnes Séphadex différentes. Chacun des trois éluats fait l'objet d'un dosage SOD. Le dosage des protéines est effectué en duplicat par la méthode de Bradford afin de déterminer l'activité spécifique de chacun des éluats. La moyenne et variabilité sur les trois fractions tiendront donc compte du passage sur le Séphadex G25.

Pour les calculs d'activité totales nous avons procédé de la manière suivante :

soit  $v$  le volume en  $\mu\text{l}$  équivalent à 1 U/ml dans la cuve de 3 ml (ou 3 U au total), les 650  $\mu\text{l}$  d'éluat contiennent  $650 \times 3 \text{ U} / v$  qui proviennent de 500  $\mu\text{l}$  de fraction.

Les volumes de S12000 et de C12000 ont été notés, ce qui permet d'en déduire le nombre total d'unités enzymatiques.

Pour S12000 par exemple, le nombre d'unités =  $(650/v) \times 3 \text{ U} \times (\text{Vol S12000}/500)$ .

Pour certains échantillons de volume réduit, la quantité passée sur colonne a due être réduite. Dans ces cas là, le volume de Séphadex et de la fraction récupérée ont été proportionnellement diminués.

L'évaluation du niveau de base de la SOD a été faite au printemps (mai) et en automne (octobre). Les Unio provenaient de l'étang de pêche du site témoin 2, ils ont été disséqués et congelés à  $-196^\circ\text{C}$  sur place.

- Les premières valeurs n'ont pas été retenues soit que les dosages n'aient été faits qu'une seule fois, soit qu'ils n'étaient pas encore optimisés.

- tous les dosages ont été réalisés en triplicat, après passage sur colonne et en présence des mêmes concentrations en EDTA/ $\text{MnCl}_2$ .

Les culots C12000 étaient issus d'une centrifugation à 12000 g, 10 min. (C12000 (b)).

### **1. Niveau des activités SOD basales au mois de mai (printemps) 1994**

Dosages réalisés sur un échantillon de six individus mâles et six individus femelles prélevés dans un étang de pêche (site témoin 2) dans lequel les *Unio tumidus* sont nombreux. Les activités sont évaluées dans la glande digestive et dans les branchies ; les volumes de S12000 et de C12000 sont notés et permettent de calculer l'activité totale (U/g poids frais).

## **2. Effet de l'encagement**

L'étude de l'effet de l'encagement a été faite durant le mois d'octobre 1994 : des bivalves ont été prélevés au site témoin 2 (étang de pêche) et encagés.

Quatre cages contenant quatre moules chacune ont été laissées sur place.

Quatre cages contenant quatre moules chacune ont été transférées dans une gravière ou site témoin 1, alimenté par la nappe phréatique. Ce site considéré comme un site sain est peuplé par au moins deux espèces d'Unionidae : *Unio tumidus* et *Unio pictorum*. (Annexe n°3). Les résultats d'analyses du sédiment des sites témoins 1 et 2 pendant cette période sont donnés en annexe 4.

Après deux semaines, les organismes ont été récupérés, les organes ont été congelés sur place à -196°C. Les individus non encagés laissés sur place ont servi pour évaluer le niveau de base d'octobre 1994 sur les glandes digestives. Lors de cette étude, seules les activités présentes dans les glandes digestives ont été dosées.

## **3. Comparaison des activités SOD sur moules originaires des deux sites témoins (ou considérés non contaminés)**

Une comparaison des activités enzymatiques d'*Unio* en provenance du site témoin 1 (ancienne gravière alimentée en eau par la nappe phréatique) ou du site témoin 2 (étang de pêche alimenté par la nappe phréatique) a été réalisée sur individus prélevés mi septembre. La température de l'eau au niveau du sédiment était de 16°C dans les deux sites. Les méthodes de Paoletti & al. (1986) et de McCord et Fridovich (1969) ont servi à doser la SOD dans les glandes digestives et branchies de trois individus de chaque site.

## **4. Intoxication au laboratoire par du cuivre et du thiram**

Suite à ces dosages sur individus en conditions physiologiques, nous avons cherché à observer les variations d'activités enzymatiques, engendrées par un stress oxydant au laboratoire.

Une étude de Vasseur & al. (1988) réalisée sur bactéries (*Photobacterium*) ainsi que sur protozoaires (*Colpidium campylum*) avait montré une synergie de toxicité du cuivre et des dithiocarbamates. L'hypothèse d'un stress oxydant à l'origine de cette toxicité avait été émise,

la présence de cuivre pouvant favoriser la production de radicaux, et les dithiocarbamates pouvant agir comme inhibiteurs de la CuZn-SOD et dépléter le glutathion. Des essais préliminaires avaient permis d'observer des diminutions d'activités des glutathion réductase, peroxydase sélénium dépendante et du glutathion (total et réduit). L'exposition aux doses retenues entraînaient la mort des individus après dix jours.

L'étude comprend vingt cinq individus répartis en cinq conditions :

- cinq moules témoin
- cinq moules témoins DMSO (7 mM)
- cinq moules exposées au cuivre 30  $\mu\text{g/l}$
- cinq moules exposées au Thiram 100  $\mu\text{g/l}$  (+ DMSO 7 mM)
- cinq moules exposées au Cuivre 30 $\mu\text{g/l}$  + Thiram 100  $\mu\text{g/l}$  (+ DMSO 7 mM)

L'intoxication a duré trois jours avec renouvellement du milieu tous les jours dans de l'eau déminéralisée contenant 10 % de milieu LC (Annexe 5) concentré 5 fois.

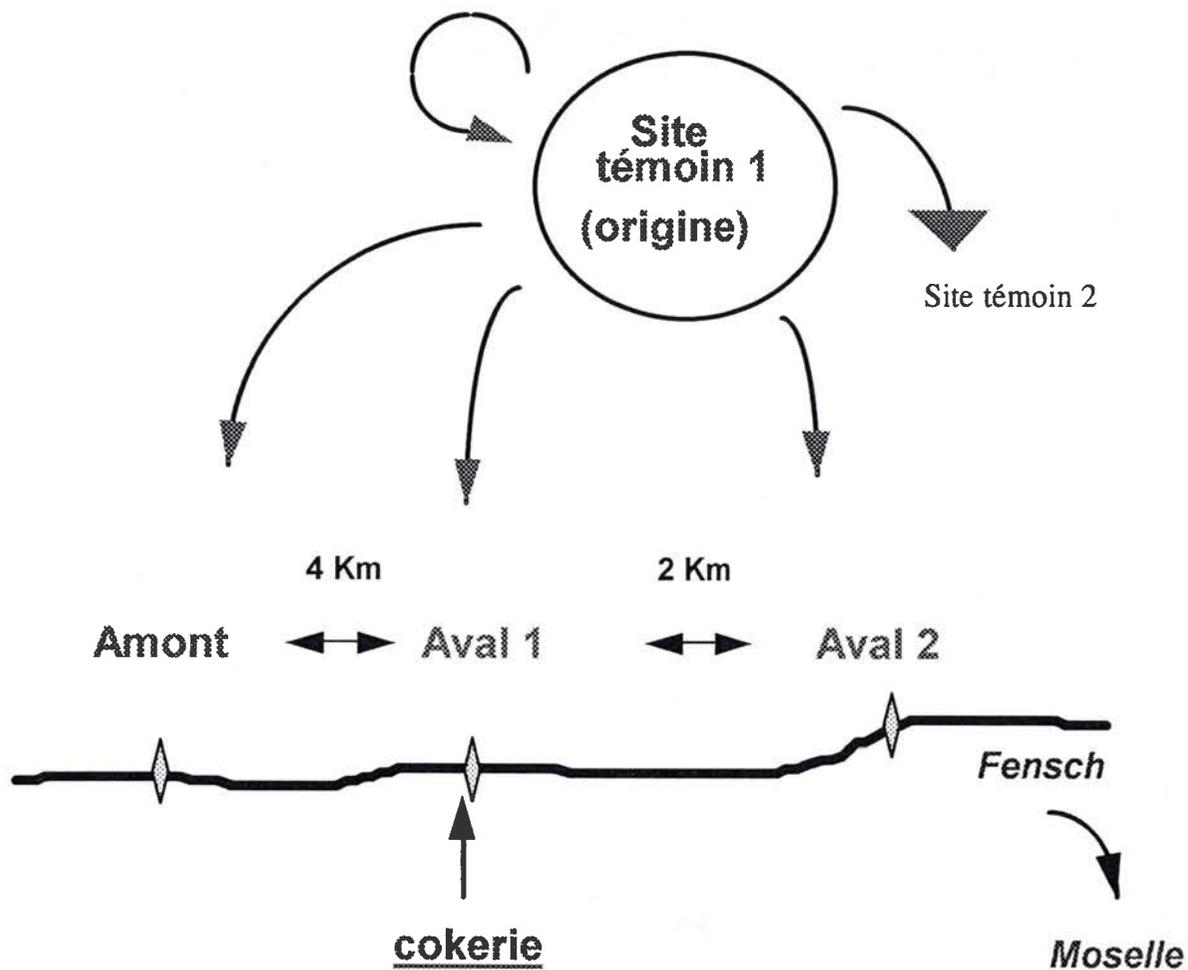
A la fin de l'exposition, les glandes digestives et branchies ont été congelées à  $-196^{\circ}\text{C}$ . Les activités spécifiques et totales ont été évaluées.

## **5. Transfert d'un site sain vers un site pollué (Figure 27)**

Suite à cette étude en laboratoire, nous avons cherché à travailler dans des conditions environnementales, en amont et en aval de la source de rejets d'une cokerie. Cette étude a été réalisée en deux étapes : un essai préliminaire suivi de l'essai définitif trois mois plus tard.

L'évaluation des contaminants dans la fraction des sédiments inférieure à un millimètre n'a été effectuée que lors de l'essai définitif.

Figure n° 27 : Schéma des transferts en amont et en aval d'une cokerie



### ***a) Essai préliminaire***

Les Unio ont été transférés en amont et dans deux sites en aval d'une cokerie située le long de la Fensch, pendant une semaine au mois de juillet. Pour chaque condition, nous avons déposé une cage contenant trois individus, une cage laissée dans le site d'origine des moules (site témoin 1) a servi de témoin non exposé.

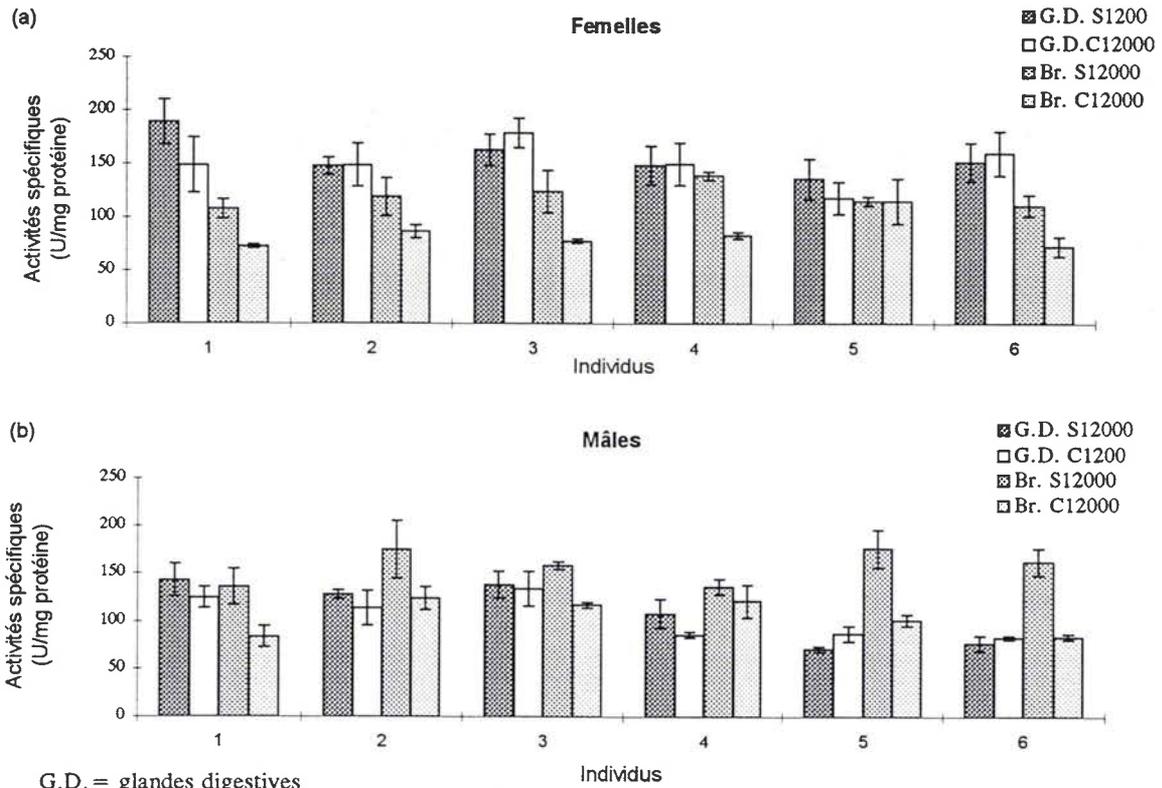
Cet essai préliminaire ayant permis d'observer une modification d'activités enzymatiques liées au glutathion sur les sites les plus pollués, une étude sur quatre semaines et sur les mêmes sites a été entreprise.

### ***b) Essai définitif : (septembre-octobre 1995)***

Cette étude a été réalisée avec cinq individus par cage. Huit cages ont été réparties sur les quatre sites. Cinq individus ont été prélevés dans le site témoin 1 le jour de la mise en cage et du transfert afin de déterminer les valeurs à J0 des paramètres étudiés. Après deux et quatre semaines, une cage a été prélevée sur chaque site, les organismes ont été disséqués immédiatement et les organes à doser congelés à  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Au cours de cette campagne, les cages en aval 2 à trente jours avaient disparu. L'expérience a été recommencée partiellement en remplaçant deux nouvelles cages en amont et au point aval 2. Une cage supplémentaire de six Unio a aussi été installée au site témoin 2 pendant trente jours.

Figure n° 28 : Activités spécifiques mesurées au mois de mai dans les glandes digestives et les branchies de femelles (a) et de mâles (b) d'*Unio tumidus* du site témoin 2



G.D. = glandes digestives  
 Br. = branchies  
 Les moyennes et écart-types sont calculés à partir de trois mesures

Tableau n° 25 : Récapitulatif des activités SOD chez les mâles et les femelles du site témoin 2 en mai 1994

	Femelles		Mâles	
	Glandes digestives	Branchies	Glandes digestives	Branchies
Activité spécifique (U/mg protéine) S12000	156 ± 22	119 ± 15	111 ± 31	157 ± 23
Activité totale (U/g tissu frais)	2818 ± 342	1034 ± 190	2014 ± 456	1225 ± 282

Les moyennes et écartypes sont calculés à partir des 3 x n mesures d'activité (avec n pour le nombre d'individus).

## **II. Résultats des études de terrain et intoxication sur *Unio tumidus***

### **1. Activité basale de la SOD**

L'étude du **niveau de l'activité basale de la SOD sur mâles et femelles au printemps** a montré (Figure 28a) que chez les femelles, l'activité spécifique trouvée dans la glande digestive est supérieure à celle trouvée dans les branchies (c'est aussi le cas pour l'activité totale). Au contraire, chez les mâles, (Figure 28b) l'activité spécifique (S12000) est inférieure dans la glande digestive alors que l'activité totale est inférieure dans les branchies (Tableau 25). L'activité spécifique dans les branchies de mâles est supérieure à celle trouvée chez les femelles. Cependant la comparaison des activités totales (U/g poids frais) entre branchies mâles et femelles ne montre pas de différence. Dans les glandes digestives, l'activité spécifique du S12000 est très proche de celle du culot alors qu'au niveau des branchies, l'activité spécifique du C12000 est en général plus faible.

Des activités aux mois de juillet, septembre et octobre ont été mesurées au cours d'autres campagnes de prélèvement sur les sites témoins 1 ou 2 :

- lors
- de la comparaison des deux sites de référence (mois de septembre)
  - de la mise en cage (utilisation des individus témoins au mois d'octobre)
  - de transferts vers les sites pollués (utilisation des individus témoins au mois de juillet et d'octobre).

Les résultats sont transcrits dans le tableau 26 . Les activités spécifiques étant les mêmes dans le C12000 que dans le S12000, nous n'avons reporté que les activités spécifiques contenues dans le surnageant.

Au cours de l'année 1995, on remarque un pic d'activité spécifique dans les glandes digestives et branchies d'individus du site témoin 1 au mois de septembre. L'activité totale n'est pas

Tableau n° 26 : Récapitulatif des activités spécifiques mesurées dans le S12000 et des activités totales (S12000 + C12000) chez des individus témoins = niveaux de base. Les dosages ont été réalisés par la méthode de Paoletti (a) ou la méthode de McCord et Fridovich (b).

Site	Mois	nombre d'individus	Glandes digestives				Branchies			
			A.S.		A.T.		A.S.		A.T.	
			(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
Témoins 2	mai-94	12	133 ± 35		2416 ± 545		138 ± 27		1130 ± 253	
Témoins 2	oct-94	16	120 ± 27		3695 ± 1009					
Témoins 1	juil-95	3	68 ± 9		1229 ± 458		70 ± 8		706 ± 94	
Témoins 1	sep-95	3	126 ± 16	17 ± 5	1439 ± 531	202 ± 190	121 ± 27	26 ± 5	1857 ± 234	422 ± 119
Témoins 2	sep-95	3	114 ± 23	16 ± 4	1294 ± 281	184 ± 40	132 ± 34	29 ± 10	1865 ± 195	413 ± 57
Témoins 1	oct-95	4 ou 5 3	68 ± 11	18 ± 5	1840 ± 262	439 ± 109	83 ± 17		899 ± 189	

A.S. : Activités spécifiques sur S12000 (U/mg protéine)

A.T. : Activités totales (U/g poids frais)

(a) : Méthode de Paoletti & al. (1986)

(b) : Méthode de McCord & Fridovich (1969)

Les moyennes et écart-types sont calculés à partir des 3 x n mesures avec n pour le nombre d'individus étudiés

Figure n° 29 : Activités spécifiques mesurées par la méthode de Paoletti & al. (1986) dans les glandes digestives (a) et les branchies (b) d'*Unio tumidus* originaires des sites témoins 1 et 2. Les moyennes et écart-types sont calculés à partir des résultats de trois dosages de SOD.

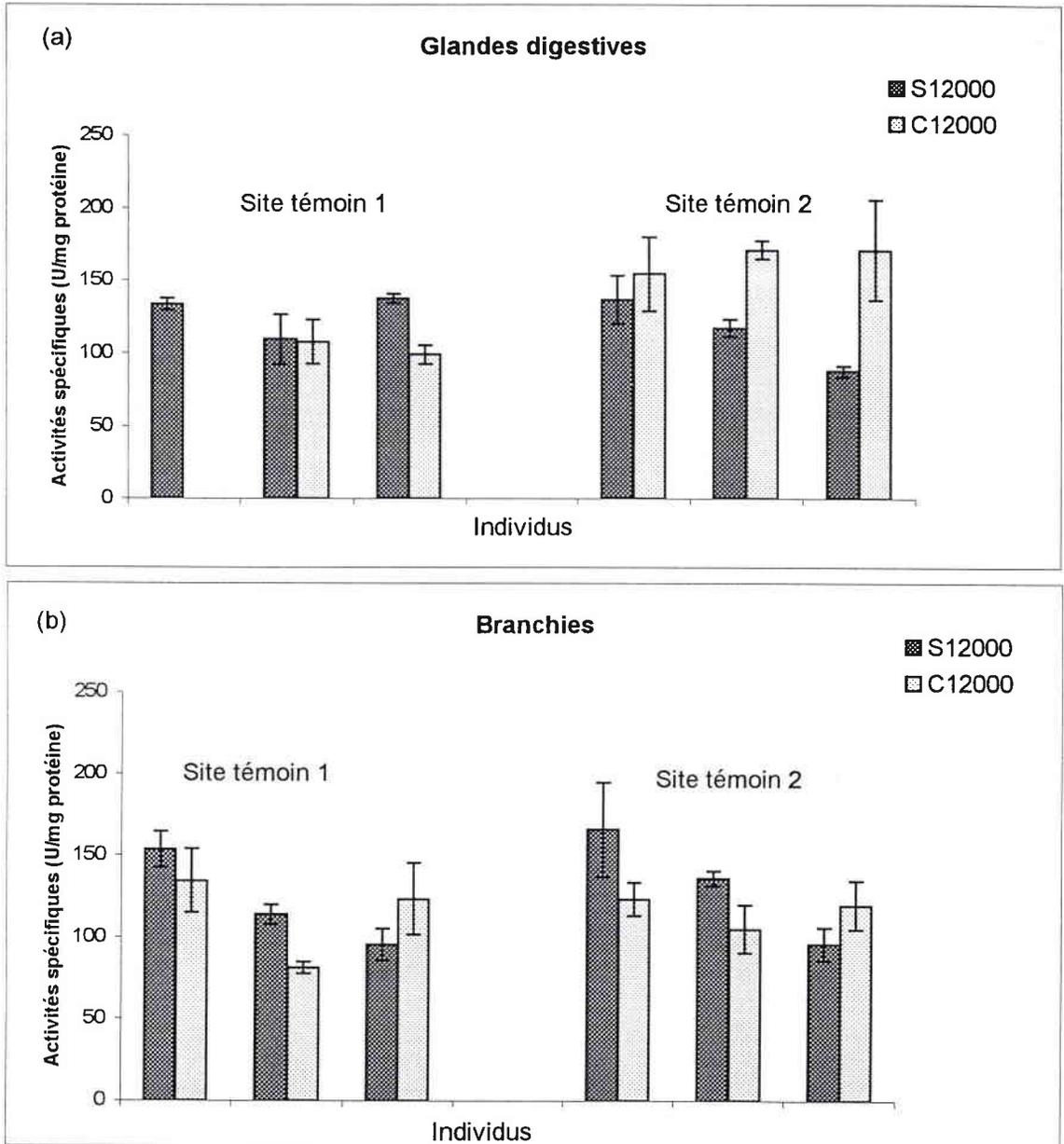


Tableau n°27 : mesures des activités spécifiques et totales de la SOD par les méthodes de Paoletti et de McCord et Fridovich. Comparaison d'individus provenant de deux sites témoins (mois de septembre 1995).

Glandes digestives		Paoletti		McCord et Fridovich		Paoletti			McCord et Fridovich		
		A.S. S12000	A.S. C12000	A.S. S12000	A.S. C12000	AT S12000	AT C12000	AT totale	AT S12000	AT C12000	AT totale
Site Témoins 1	F(+)	m ± s 133 ± 4	m ± s n.d.	m ± s 11 ± 1	m ± s n.d. ±	883	48	931	75	4	79
	F(-)	109 ± 17	108 ± 15	17 ± 3	17 ± 1	1136	83	1218	178	13	191
	F(+)	137 ± 3	99 ± 6	21 ± 1	15 ± 1	2042	128	2169	318	20	337
	<b>m ± s</b>	<b>126 ± 16</b>	<b>103 ± 12</b>	<b>16 ± 5</b>	<b>16 ± 1</b>	<b>1353 ± 530</b>	<b>86 ± 36</b>	<b>1439 ± 531</b>	<b>190 ± 106</b>	<b>12 ± 7</b>	<b>202 ± 190</b>
Site Témoins 2	F(+)	137 ± 17	154 ± 26	16 ± 2	22 ± 5	1220	57	1277	141	8	149
	M	117 ± 6	171 ± 6	20 ± 1	25 ± 0	902	74	976	157	11	168
	F(-)	88 ± 4	171 ± 35	13 ± 2	31 ± 5	1545	84	1629	219	15	235
	<b>m ± s</b>	<b>114 ± 23</b>	<b>165 ± 10</b>	<b>16 ± 4</b>	<b>26 ± 5</b>	<b>1222 ± 281</b>	<b>72 ± 13</b>	<b>1294 ± 281</b>	<b>173 ± 40</b>	<b>11 ± 4</b>	<b>184 ± 40</b>

Branchies		Paoletti		McCord et Fridovich		Paoletti			McCord et Fridovich		
		A.S. S12000	A.S. C12000	A.S. S12000	A.S. C12000	AT S12000	AT C12000	AT totale	AT S12000	AT C12000	AT totale
Site Témoins 1	F(+)	m ± s 153 ± 11	m ± s 134 ± 19	m ± s 26 ± 2	m ± s 33 ± 3	1623	77	1700	274	19	293
	F(-)	114 ± 6	81 ± 4	21 ± 1	23 ± 3	2058	81	2139	371	23	393
	F(+)	95 ± 10	123 ± 22	32 ± 2	33 ± 7	1615	118	1733	545	32	577
	<b>m ± s</b>	<b>121 ± 27</b>	<b>113 ± 28</b>	<b>26 ± 5</b>	<b>30 ± 7</b>	<b>1765 ± 233</b>	<b>92 ± 21</b>	<b>1857 ± 234</b>	<b>397 ± 119</b>	<b>25 ± 7</b>	<b>421 ± 144</b>
Site Témoins 2	F(+)	166 ± 29	123 ± 10	41 ± 7	31 ± 1	1828	102	1930	452	26	479
	M	136 ± 4	105 ± 15	24 ± 3	21 ± 1	1944	62	2006	342	12	354
	F(-)	96 ± 10	120 ± 15	23 ± 2	30 ± 2	1553	105	1658	381	26	408
	<b>m ± s</b>	<b>132 ± 34</b>	<b>116 ± 14</b>	<b>29 ± 10</b>	<b>27 ± 5</b>	<b>1775 ± 194</b>	<b>90 ± 22</b>	<b>1865 ± 183</b>	<b>392 ± 57</b>	<b>22 ± 7</b>	<b>413 ± 62</b>

AT = activité totale en U/g poids frais

A.S. = activité spécifique en U/mg protéine

n.d. = non déterminé (taux de protéine trop faible)

m = moyenne

s = écart type : mesuré à partir de trois mesures pour un individu ou de neuf essais pour une condition

modifiée au niveau des glandes digestives alors qu'elle varie comme l'activité spécifique dans les branchies.

Dans le site témoin 2, on remarque que les activités spécifiques restent stables dans les glandes digestives et dans les branchies en mai 1994, octobre 1994 et septembre 1995, et au même niveau que les activités du site témoin 1 en septembre 95.

Les autres activités antioxydantes étaient stables en octobre d'une année sur l'autre alors que l'activité catalasique des branchies l'activité de la glutathion réductase dans les glandes digestives étaient réduites au printemps (mai).

## 2. Activité SOD dans deux sites de référence

La comparaison d'activité de **trois moules originaires des sites témoins 1 ou 2** ne permet pas de mettre en évidence de différence entre les niveaux d'activité spécifique des *Unio* des deux sites, que ce soit au niveau des branchies ou de la glande digestive (Figure 29). Les dosages réalisés par la méthode de Paoletti & *al.*, (1986) et de McCord & Fridovich, (1969) ont permis de déterminer des activités spécifiques allant de  $88 \pm 4$  (glande digestive) à  $166 \pm 29$  U(Paoletti & *al.*)/mg protéine (branchies) et de  $11 \pm 1$  (glande digestive) à  $41 \pm 7$  U(McCord & Fridovich)/mg protéine (branchies). Les activités spécifiques observées dans les glandes digestives et branchies sont du même ordre de grandeur lorsqu'on utilise la méthode de Paoletti. Par la méthode de McCord & Fridovich, les activités sont plus élevées dans les branchies. (Tableau 27). Cette méthode n'a pas montré d'interférence lors des ajouts dosés.

Remarque : l'activité spécifique contenue dans le C12000 d'un individu provenant du site témoin 1 n'a pas pu être déterminée car la quantité de protéines dans l'échantillon était trop faible.

Figure n° 30 : Activités spécifiques contenues dans les S12000 et C12000 de glandes digestives d'*Unio tumidus*. Ces moules originaires du site témoin 2 ont été laissées libres sur place (a), encagées dans le site témoin 2 (b) ou encagées et transférées dans le site témoin 1 pendant quinze jours (c).

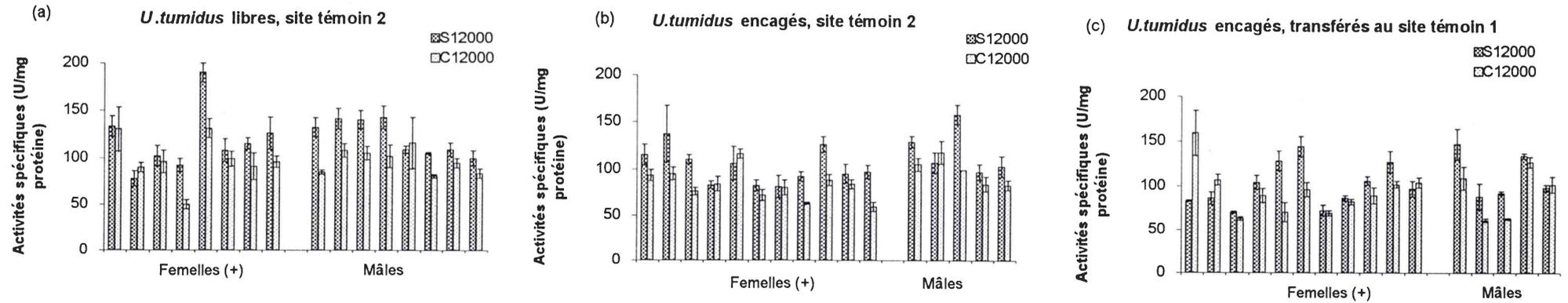
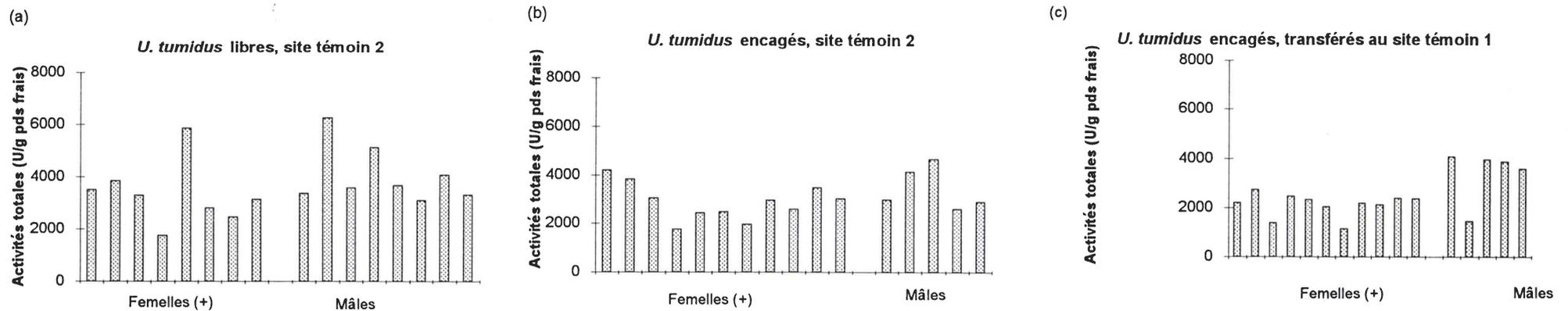


Figure n° 31 : Activités totales (S12000 + C12000) contenues dans les glandes digestives d'*Unio tumidus*. Ces moules originaires du site témoin 2 ont été laissées libres sur place (a), encagées dans le site témoin 2 (b) ou encagées et transférées dans le site témoin 1 pendant quinze jours (c).



Femelles (+) : avec glochidies entre les feuillets branchiaux  
 Les écart-types sont obtenus pour trois mesures par individu

### 3. Essais de mise en cage d'*Unio tumidus*

Lors des essais d'**encagement** de moules maintenues dans leur lieu d'origine (site témoin 2) ou transférées dans un autre site de référence (site témoin 1), nous n'avons pas observé de différence d'activité spécifique entre les individus restés libres, encagés sur place, et encagés déplacés. Lors des dosages, nous n'avons pas fait la distinction entre les deux types de SOD. Tous les organes avaient été prélevés le même jour, sur individus restés libres ou encagés depuis deux semaines.

Les niveaux d'activité sont de  $120 \pm 27$  U/mg protéine dans le S12000 et de  $97 \pm 21$  U/mg protéine dans le C12000 des glandes digestives de moules non encagées (Figure 30).

Le coefficient de variation sur les triplicats d'estimation de l'activité spécifique est d'environ 10% mais il a pu atteindre pour certains essais la valeur de 25 %. Il est plus important dans les fractions C12000 que dans les S12000. Si l'on tient compte des variations entre individus, le coefficient de variation sur les mesures atteint 25 à 30 % de la moyenne générale pour une condition donnée (Données en annexe 6).

Les activités totales montrent des moyennes dont le coefficient de variation peut lui aussi atteindre les 30%. Après quinze jours, les activités totales vont de 1700 à 6200 U/g de tissu frais chez les moules libres du site témoin 2, de 1700 à 4650 U/g tissu frais chez les encagées du site témoin2 et de 1150 à 4000 U/g tissu frais chez les moules encagées transférées au site témoin 1. Le test de Tukey donne une différence significative ( $p=0,05$ ) entre les activités totales des moules non encagées du site témoin 2 et des moules transférées et encagées au site témoin 1 avec une activité supérieure chez les moules restées libres. Cette diminution de l'activité totale est liée à une diminution du taux de protéines dans la glande digestive, ce qui fait que les activités spécifiques restent constantes.

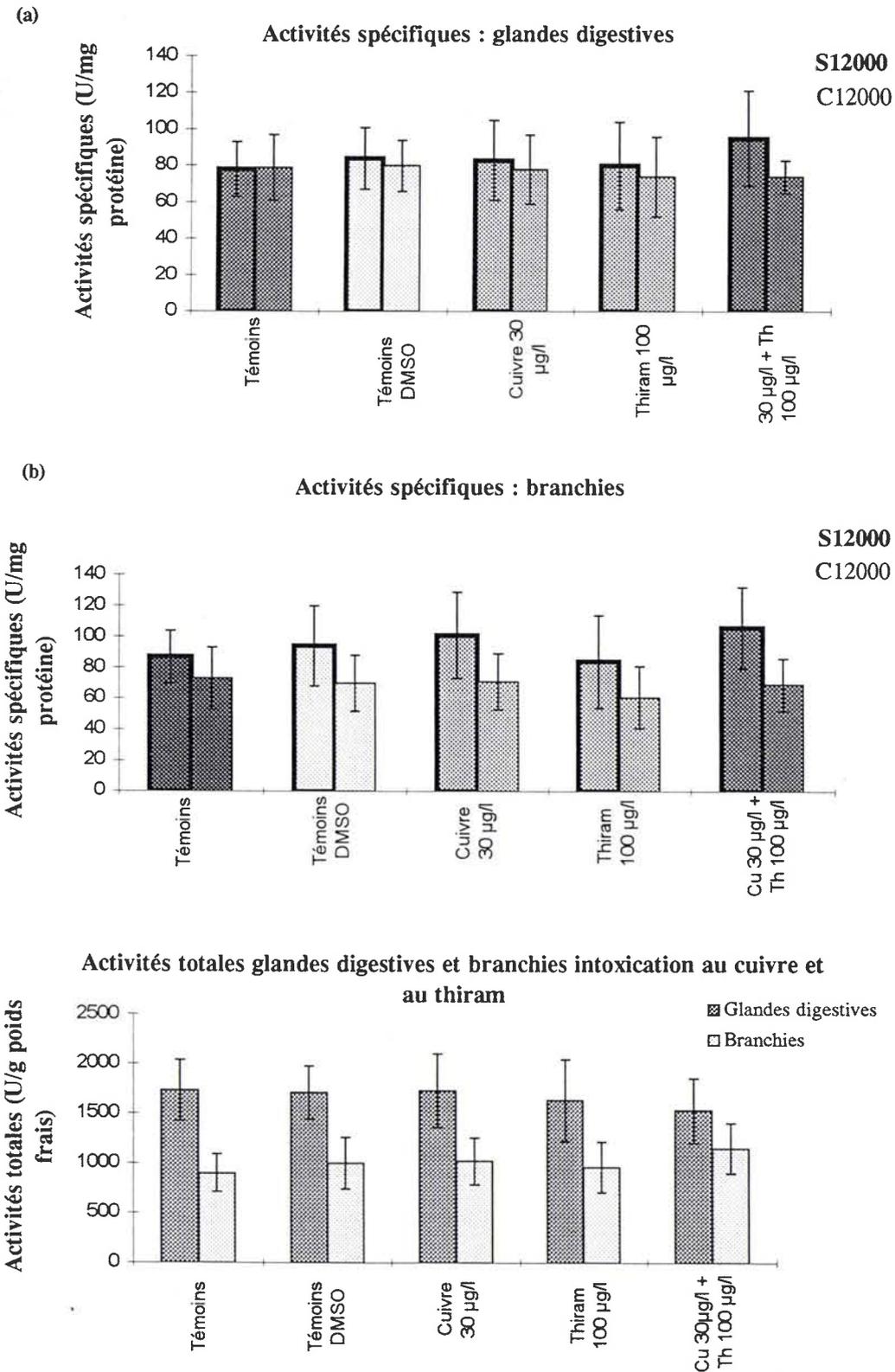
Les dosages n'ont été réalisés que sur glandes digestives et nous n'avons pas observé de différence d'activité entre mâles et femelles (Figure 31).

Les activités spécifiques pour les glutathion peroxydases, glutathion réductase et catalase n'ont pas été modifiées à la suite de l'encagement et du transfert, le taux de glutathion restant inchangé.

Tableau n° 28 : Résultats des essais d'intoxication au cuivre (30 µg/l) et au thiram (100 µg/l) sur *Unio tumidus* pendant trois jours

	Témoins	Témoins DMSO	Cuivre 30 µg/l	Thiram 100 µg/l	Cu 30 µg/l + Th. 100 µg/l	
SOD	—	—	→	→	→	
Catalase	—	—	↘	↘	↘	
Se-GPx	—	—	↘ →	↘ →	↘ →	Br GD
Glutathion réductase	—	—	↘	↘	↘	
GSH/GSSG	—	—	↘ ↘	↘ ↘	↘ ↘	Br GD
Glutathion total	—	—	↘	↘	↘	
MDA	—	—	→	→	↘	

Figure n°32 : Activités spécifiques sur glandes digestives (a), branchies (b), et activités totales (c) chez *U.tumidus* exposés en laboratoire au cuivre, au thiram et à un mélange des deux.



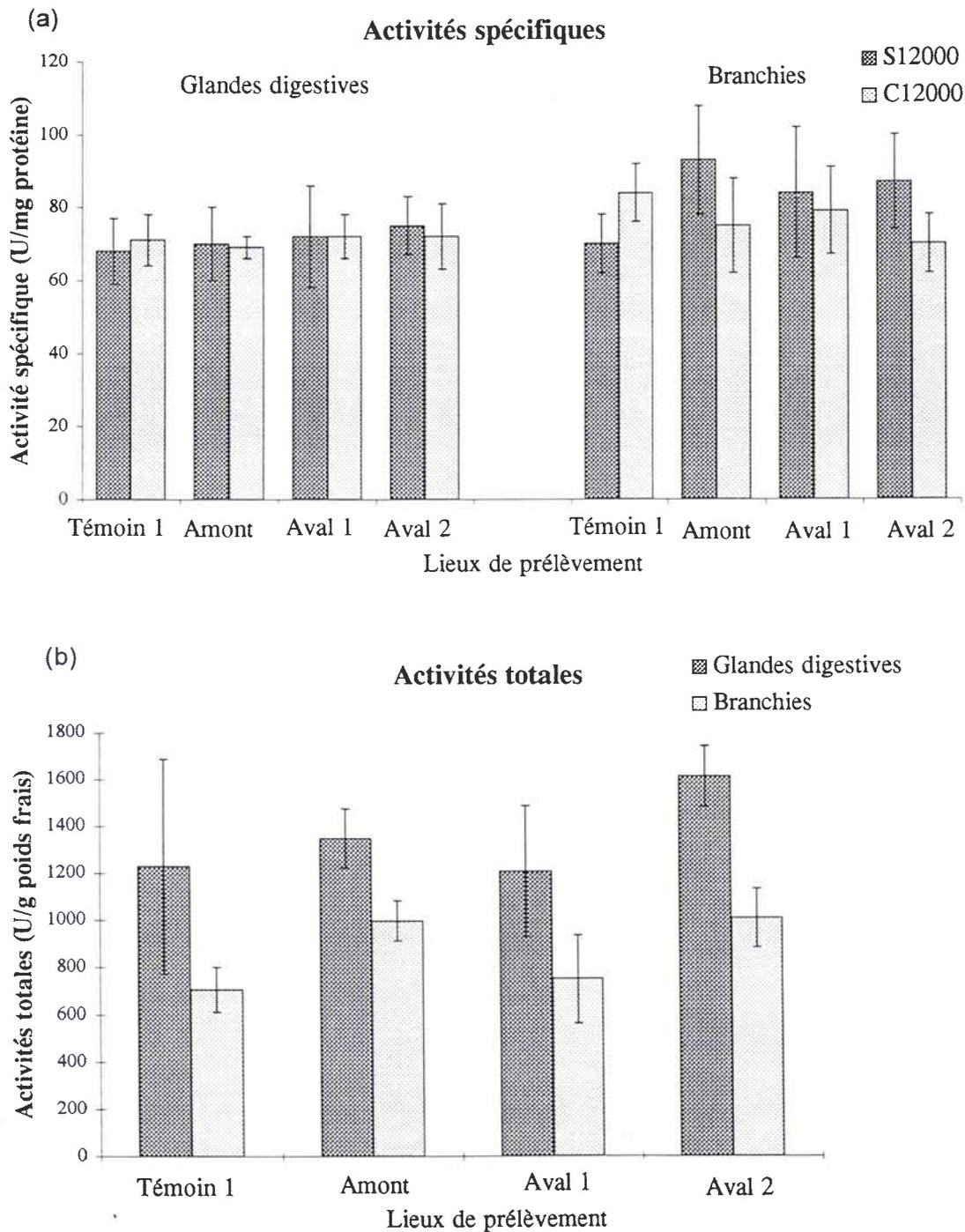
Les moyennes et écart-types ont été calculés à partir des 3 x n mesures (avec n pour le nombre d'animaux étudiés).

A la fin de la période d'encagement (octobre 1994), nous avons pu constater que les moules étaient parvenues à s'enfouir dans le sédiment.

Tableau n° 29 : Variations des paramètres entre J0 et J8 chez des moules transférées ou non dans la Fensch.

	Témoins	Amont	Aval 1	Aval 2
SOD	—	→	→	→
Catalase	—	→	→	→
Se-GPx	—	→	↘	↘
Glutathion réductase	—	→	↘	↘
GSH/GSSG	—	→	↘	↘
Glutathion total	—	→	↘	↘
MDA	—	→	→	→

Figure n° 33 : Activités spécifiques (a) et activités totales (b) mesurées dans la glande digestive et dans les branchies d'*Unio tumidus* (trois individus par condition). Les moules ont été encagées et soit laissées sur place au site témoin 1, soit transférées au site amont, aval 1 ou aval 2 pendant une semaine au mois de juillet.



Les moyennes et écart-types sont calculés à partir de de neuf dosages par condition (= 3 x 3)

#### 4. Intoxications au laboratoire des moules au cuivre et au thiram

Les intoxications au **cuivre et au thiram** réalisées en octobre n'ont pas permis de montrer de variation d'activité SOD entre les différents traitements imposés aux *Unio* en laboratoire. Que ce soit pour l'activité spécifique ou l'activité totale, tous les groupes présentent des niveaux équivalents dans les branchies ou dans les glandes digestives (Figure 32 a,b). Dans les glandes digestives des témoins, l'activité spécifique est de  $79 \pm 15$  U/mg protéine alors que dans les branchies elle est de  $87 \pm 17$  U/mg protéine. L'activité totale contenue dans les glandes digestives ( $1734 \pm 307$  U/g poids frais) est plus élevée que celle des branchies ( $902 \pm 190$  U/g poids frais).

Les coefficients de variations compris entre 20 et 30% pour les glandes digestives et entre 20 et 36% dans les branchies ne permettent pas de mettre en évidence des variations entre les différentes conditions d'exposition (Valeurs en annexe 7).

La glutathion réductase, glutathion peroxydase sélénium dépendante et catalase ont vu leurs activités réduites pour les trois conditions d'intoxication, les diminutions étaient plus marquées dans les branchies (Tableau 28). Dans la glande digestive, l'activité glutathion peroxydase sélénium dépendante est diminuée lors de l'intoxication simultanée par le cuivre et par le thiram alors que rien n'est visible lors de la mise en présence avec l'un des deux produits seul.

La quantité de glutathion total était aussi diminuée chez les individus exposés au cuivre, au thiram et surtout au mélange cuivre plus thiram. La proportion de glutathion réduit par rapport au glutathion oxydé était diminuée dans les branchies. Dans les glandes digestives, cette proportion est diminuée pour l'intoxication au cuivre.

On observe une augmentation de MDA lors de l'exposition au mélange cuivre - thiram en particulier. Les individus qui présentaient une diminution importante des enzymes antioxydantes montraient en parallèle des taux de MDA élevés.

## 5. Transfert vers un site pollué

### a) Préliminaire

L'essai préliminaire de transfert des *Unio* vers un site sain (Site témoin 1) et vers un site pollué a été réalisé sur trois individus par condition et pendant huit jours au mois de juillet, les dosages ont été réalisés par la méthode de Paoletti.

Il n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre les traitements que ce soit au niveau des branchies ou de la glande digestive (Figure 33a), lors du calcul des activités spécifiques ou des activités totales. (Tukey,  $p=0,05$ ). Les niveaux des activités spécifiques sont équivalents dans les branchies ( $70 \pm 8$ ) et dans la glande digestive ( $68 \pm 9$ ) dans le site témoin 1. Les valeurs sont assez homogènes et vont de 68 à 75 U/mg protéine pour le site aval 2. Les activités totales sont ici aussi plus fortes dans la glande digestive ( $\sim 1350$  U/g poids frais) que dans les branchies ( $\sim 865$  U/g poids frais) (Figure 33b).

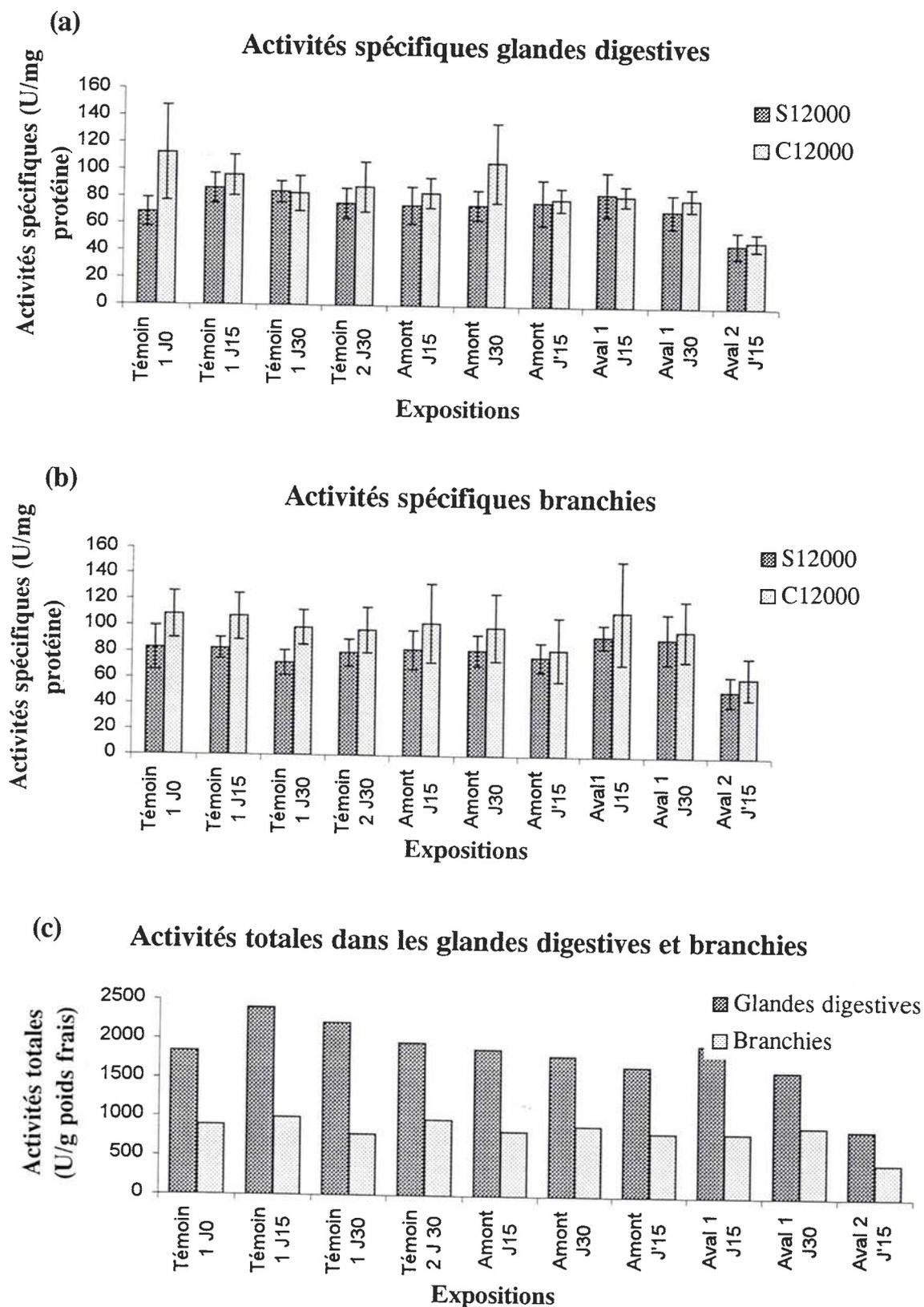
Les autres paramètres ont été évalués par C. Leguille-Cossu et A. Doyotte pendant cette étude (Tableau 29). L'activité de la catalase, comme celle de la SOD n'a pas été modifiée lors de l'exposition. En revanche, les activités spécifiques des glutathion peroxydase sélénium dépendante et glutathion réductase ont été diminuées chez les individus placés en aval de la cokerie. Le taux de glutathion oxydé par rapport au glutathion total augmente lorsqu'on passe du site amont au premier puis au deuxième site aval.

Les résultats détaillés des activités SOD sont donnés en annexe 8.

Pour tous ces paramètres, on remarquera qu'aucun d'entre eux n'a varié entre le site témoin d'origine et le site en amont de la cokerie. Les effets en général étaient plus marqués pour le site aval 1 situé au niveau du rejet de la cokerie.

Suite à cette expérience, nous avons refait un essai comprenant plus d'animaux par condition, et sur une durée plus longue afin de suivre l'évolution des paramètres dans le temps.

Figure n° 34 : Activités spécifiques (a et b) et activités totales (c) SOD mesurées chez *U.tumidus* après exposition dans un cours d'eau contaminé par des métaux, HAP et PCB. Les écart-types et moyennes sont calculés à partir des 3 x n mesures avec n pour le nombre d'individus étudiés.



### *b) Essai définitif*

Lors de cette étude, des organismes ont été prélevés après zéro, quinze et trente jours d'exposition à des rejets de cokerie. Que l'on s'intéresse aux témoins, aux individus du site amont ou du site Aval 1, les valeurs d'activités spécifiques ou totales n'évoluent pas au cours du temps dans les deux organes. Nous n'avons pas pu étudier l'évolution des activités au site aval 2 car la cage prévue pour J30 avait à nouveau disparu. De plus les moules n'auraient peut-être pas vécu jusqu'à J30 dans ce milieu car les individus prélevés à J'15 étaient moribonds (faible réponse à une stimulation mécanique).

Au bout de quinze jours d'expérience, quelque soit l'organe, les activités spécifiques SOD (CuZn et Mn-SOD) au niveau du site Aval 1 sont identiques à celles de l'amont et les valeurs obtenues à l'amont sont identiques à celles du témoin du site 1 (Figure 34). Seules les activités mesurées au site Aval 2 à J'15 ( $47 \pm 10$  U/mg prot.) sont significativement diminuées par rapport à l'amont J'15 ( $77 \pm 10$  U/mg prot.). Le calcul des activités totales donne les même informations. Au site Aval2 J'15, l'activité totale SOD des glandes digestives diminue de 47%. Cette baisse est accompagnée d'une diminution faible du taux de protéine (environ 13%). Cela signifie que la baisse d'activité spécifique est due soit à une diminution de l'activité de l'enzyme (inhibition), soit à un arrêt de sa synthèse. Il est possible que cette inhibition ou arrêt de synthèse soit issu d'un mécanisme spécifique pour la SOD mais nous avons remarqué que ces organismes moribonds dégageaient une forte odeur de fermentation. Il se pourrait que les protéines bien qu'encore présentes dans le tissu aient commencé à être décomposées dans leur ensemble. (les valeurs des activités spécifiques sont données en annexe 9).

En ce qui concerne les autres enzymes antioxydantes (Tableau 30), on observe une diminution des activités des glutathion peroxydases et glutathion réductase surtout en aval de la cokerie, les diminutions étant plus marquées au deuxième site aval et dans les branchies. Les quantités de glutathion total n'ont pas varié au cours du temps pour un site donné alors que le rapport (glutathion réduit / glutathion oxydé) a été diminué au site Aval 1 entre le quinzième et le

Tableau n° 30 : Variations des paramètres à J15 et J30 chez des *Unio tumidus* transférés ou non dans la Fensch pendant 15 et 30 jours.

	Témoins		Amont		Aval 1		Aval 2
	J15	J30	J15	J30	J15	J30	J15
SOD	—	—	→	→	→	→	↘
Catalase	—	—	→	→	→ ↗	→	↘
Se-GPx	—	—	↘	↘	↘	↘	↘
GPx-Se indépendante	—	—	→	→	↘ ↗	↘	↘
Glutathion réductase	—	—	↘	↘	↘	↘	↘
GSH/GSSG	—	—	→	→	↘	↘	↘
Glutathion total	—	—	↘	↘	↘	↘	↘
MDA	—	—	→	→	→	→	↗

Tableau n° 31 : Résultats des analyses de micropolluants effectuées sur la fraction inférieure à 1 mm des sédiments des sites étudiés lors des transferts d'*Unio tumidus* pendant un mois en amont et en aval de la cokerie.

	Témoïn 1	Témoïn 2	Amont	Aval 1	Aval 2	unités
HAP	37,77	822	24007	15751	42261	µg/kg M.S.
PCB	< 1,81	15,51	2059	1245	1293	"
As	9,9	12,7	39,3	28,6	32,6	mg/kg M.S.
Cr	11	17,5	34,4	77,8	73,6	"
Cu	7,9	9,4	89,3	93,5	92,6	"
Cd	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	"
Pb	8	11,2	254	198	163	"
Hg	< 0,05	< 0,05	0,96	18,4	0,52	"
Ni	16,4	19	40,6	56,3	70,8	"

Pesticides organochlorés : inférieurs aux seuils de détection

Chlorophénols : inférieurs aux seuils de détection

HAP : six composés ont été dosés

PCB : sept composés dosés

Les analyses ont été effectuées par le Centre d'Analyses et de Recherches du département d'Hydrologie et Environnement de l'ULP (Strasbourg)

trentième jour dans les branchies. Parallèlement, la catalase et la glutathion peroxydase sélénium indépendante montraient un pic d'activité.

Ici aussi, les variations étaient plus visibles au niveau des branchies, toutes les activités antioxydantes étant réduites au deuxième site aval.

L'évaluation des contaminants du sédiment (fraction inférieure à un millimètre) a été réalisée au cours de cette étude. Les principaux polluants sont des HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques) présents à des concentrations supérieures à 15000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  M.S. (six molécules dosées). Les PCB (polychlorobiphényles) et métaux sont aussi présents en quantité importante. Les résultats condensés des analyses sont donnés tableau 31, le détail est en annexe 10.

### **III. Discussion**

#### **1. Niveaux des activités basales des superoxydes dismutases**

L'étude des niveaux de base de la SOD chez *Unio tumidus* nous a montré que des différences importantes pouvaient exister entre les individus. Les coefficients de variation sont souvent d'environ 20%. Burgeot & al. (1996) qui dosent la SOD dans le foie de poisson de six individus trouvent des variations du même ordre de grandeur : 14 à 30%. Roberts & al. (1987) obtiennent des coefficients de variation plus importants, sur un nombre d'individus pourtant supérieur. Certains auteurs réalisent les dosages sur de très nombreux individus pour réduire les variations : Mather-Mihaich & DiGiulio (1986) testent quatre-vingt poissons et obtiennent un coefficient de variation d'environ 5%. D'autres auteurs préfèrent regrouper plusieurs organes avant l'homogénéisation, le coefficient de variation est alors plus proche de 10% (4 groupes de 2 organes : DiGiulio & al., 1993 ; 4 groupes de 5 : Regoli & Principato, 1995 ; 4 groupes de 10 : Viarengo & al., 1991(b)). (Tableau 32)

Lors de nos essais, des pertes étaient remarquées à chaque étape de purification, en particulier lors du prélèvement du S500 : des fragments de tissu étaient perdus au niveau du C500. Afin d'éviter ces pertes, il faudrait procéder à une homogénéisation forte (Potter électrique avec espace piston-potter faible pour casser les mitochondries). Cela permettrait une perte minime de matériel lors de la centrifugation à 500 g. Le dosage sur la fraction S100000 permettrait d'obtenir un degré de purification plus homogène entre individus (un lavage du culot C100000 n'étant pas exclu).

La variabilité des mesures sur chaque individu est relativement importante et reflète la variabilité de la purification de l'échantillon lors de son passage sur trois colonnes de Séphadex G25 différentes. Les différences d'activité enzymatique entre les individus sont aussi importantes, que ce soit chez les témoins ou chez les individus exposés.

Il est reconnu que la sensibilité aux toxiques des bivalves aquatiques est assez variable selon les individus. Une variabilité importante entre individus a aussi souvent été observée lors de la mesure de l'accumulation des métaux chez les bivalves. Cette sensibilité peut dépendre de

Tableau n° 32 : Protocoles de préparation des fractions et méthodes de dosage utilisées par différents auteurs pour évaluer l'activité SOD

Organisme		Organe	Conservation	Homogénéisation	Centrifugation	Purification	Méthode de dosage
<b>Poissons</b>							
<i>Leiostomus xanthurus</i>	M	Foie		Polytron homogenizer	9000g 10min.		Bensiger & Johnson, 1981 (luminol/XOD)
<i>Scorpaena guttata</i>	M	Foie Rein Branchies Intestin	-80°C	Homogénéiseur Verre/Téflon	1400g (se reporter à autre publication)		Heikkila & Cabbat, 1976 (6-hydroxydopamine)
<i>Ictalurus punctatus</i>	D	Foie Branchies	-	Broyeur de tissu Thomas motorisé (piston téflon), puis homogénéat à -70°C	*		Hyland & al., 1983 (DMSO/cytc)
<i>Squatina argentina, Sphyrna lewini, Myliobatis goodei, Raja castelanui, Psammobatis scobina, Raja agassizi</i>	M	Foie Branchies Muscle Coeur		Wilhem Filho & al., 1993	-	-	Misra & Fridovich, 1972 (modifié Boveris & al., 1983)
<i>Cyprinus carpio</i>	D	Foie Branchies Muscle		*			Misra & Fridovich, 1972, Matkovic & al., 1977
<i>Rutilus rutilus, Cyprinus carpio, Abramis brama, Perca fluviatilis, Ctenopharyngodon idella, Hypophthalmichthys molitrix</i>	D	Foie		*	16000g 15min.		Misra & Fridovich, 1972
<i>Cyprinus carpio</i>	D	Foie		*			Oberley & Spitz, 1984
<i>Salmo trutta fario (Rana perezi, Xenopus laevis, Columba livia, Serinus canarius, Rat, Cochon d'Inde)</i>		Foie	-25°C	*		Dialyse 24 heures	Paoletti & al., 1986
<i>Scomber scombrus, Pollachius virens (=mollusque)</i>	M	Foie Branchies Coeur	Congélation	Broyeur de tissu Thomas, puis 20 aller-retour de potter Elvehjem	7000g 20min.	Elimination hémoglobine par précipitation à l'éthanol / chloroforme	Sun & Zigman, 1978 (auto-oxydation adrénaline)
<i>Mullus barbatus</i>	M	Foie	-196°C	Potter Elvehjem (10sec.)	(Selon Förlin & Andersson, 1985) 100000g	Séphadex G25	McCord & Fridovich, 1969
<i>Oreochromis niloticus</i>	D	Branchies Foie Rein (perfusés puis excisés)	-	*	(Lu & al., 1969)		McCord & Fridovich, 1969
<i>Ictalurus punctatus</i>	D	Foie excisé et perfusé	-196°C puis -80°C	*	100000g		McCord & Fridovich, 1969
<i>Mugil sp.</i>	D	Foie	-196°C puis -80°C	*	31000g, 1 heure	Passage sur laine de verre (élimination lipides)	Méthode au cytochrome c (=McCord & Fridovich, 1969 ?)
<i>Limanda limanda</i>	M	Foie	-196°C puis -70°C	*	500g 15min. 12000g 30min. 100000g 60min.	Séphadex G25	McCord & Fridovich, 1969

Fraction dosée	Ordre de grandeur des activités enzymatiques chez les témoins			nombre de répliquats	Ordre de grandeur des coefficients de variation	Auteurs
	U/mg protéine	U/g poids frais	autres unités			
S9000 gardé à -196°C puis à -20°C	97,3 ± 49,5 à 199,0 ± 58,9			n=19 et n=10	30 à 51 %	Roberts & al., 1987
fraction cytosolique lourde		1330 ± 231 1329 ± 319 552 ± 86 840 ± 144		n=5	17% 24% 16% 17%	Bay & al., 1990
*	4,13 ± 0,19 1,33 ± 0,05			n=80 et n=89 ind.	4 à 5 %	Mather-Mihaich & DiGiulio, 1986
Homogénat			2,1 à 4 ± 0,8 0,6 à 2,1 0,7 à 1,1 ± 0,1 0,5 à 2,19 ± 0,6 nmol SOD/g poids frais	n=1 et n=4 n=1 et n=1 n=1 et n=5 n=1 et n=5	20% 79% 9% 29%	Wilhelm Filho & Boveris 1993
*		1283,9 ± 214,9 208,2 ± 15,1 32,2 ± 3,4		n=4 ou 5 ind.	17% 7% 11%	Radi & Matkovics, 1988
S16000		~750				Wdzieczak & al., 1982
Homogénat			% d'inhibition de la réaction du NBT/mg	n=10 ind.	~ 10%	Dimitrova & al., 1994
Homogénat		2500 3000 7000 6000 28000 17500 25000		n=6 à 8 ind.		Lopez Torres & al., 1993
S7000 ?		S. s. P. v. 716 à 460 56 à 125 158 à 3594				Aksnes & Njaa, 1981
S100000			8,1 ± 1,7 à 14,4 ± 2 ou 11 ± 3,3 U/min./mg prot	n=6	14 à 30 %	Burgeot & al., 1996
Cytosol	8,8 ± 0,9 57,4 ± 6,7 36,1 ± 2,5			n=6 n=9 n=7(gpes) groupes de 1 ou 2 ind.	10% 12% 7%	Bainy & al., 1995
S100000 ?	4,43 ± 0,29 à 9,91 ± 0,51 ± 1,10			4 groupes de 2 organes (n=4gpes)	7 à 10 %	DiGiulio & al., 1993
S31000	8,3 ± 1			1groupe de 10 ind. (3 dosages)	12%	Rodríguez-Ariza & al., 1993
S100000		246 ± 41		n=5	17%	Livingstone & al., 1993

Organisme		Organe	Conservation	Homogénéisation	Centrifugation	Purification	Méthode de dosage
<b>Poissons</b>							
<i>Zosterisessor ophiocephalus</i>	M	Foie		*	9000g 100000g	Séphadex G25	McCord & Fridovich, 1969, (+Beyer & Fridovich, 1987 + Vandervoalle & Petersen, 1987)
<b>Mollusques</b>							
<i>Lamellidens marginalis</i>	D	G.D. Branchies	-196°C puis -80°C	*	*		Beauchamp & Fridovich, 1971 (NBT)
<i>Geukensia demissa</i>	M	G.D.		Broyeur motorisé (piston téflon) puis -70 °C	*		McCord & Fridovich, 1969
<i>Rangia cuneata</i> <i>Geukensia demissa</i>	M	G.D.	-	*	12000g 30min.	Dialyse	McCord & Fridovich, 1969
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	M	G.D.		Ultra-turrax	100000g, 1heure		McCord & Fridovich, 1969
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	M	Branchies		Ultra-turrax	100000g, 1heure		McCord & Fridovich, 1969
<i>Mytilus edulis</i>	M	G.D.	-196°C puis -70°C	*	100000g	Séphadex G25	McCord & Fridovich, 1969
<i>Mytilus edulis</i>	M	G.D.		Potter Elvehjem motorisé	500g 15min. 12000g 30min. 100000g 90min.	Séphadex G25	McCord & Fridovich, 1969
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	M	G.D.		Potter Elvehjem motorisé	9000g 100000g	Séphadex G25	McCord & Fridovich, 1969, (+Beyer & Fridovich, 1987 + Vandervoalle & Petersen, 1987)
<i>Mytilus edulis</i>	M	G.D.	- 196°C puis -70°C	*	500g 15 min. 12000g 30min.	Séphadex G25	McCord & Fridovich, 1969
<i>Mytilus edulis</i>	M	G.D.		*	500g 15min. 12000g 30min.	Séphadex G25	McCord & Fridovich, 1969
<i>M. galloprovincialis</i> Transport vers le laboratoire à sec	M	G.D.	-196°C puis -80°C	Potter Elvehjem téflon motorisé	500g 12000g 100000g	Séphadex G25	McCord & Fridovich, 1969
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	M	G.D.	-196°C puis -80°C	Potter Elvehjem téflon motorisé	500g 12000g 100000g	Séphadex G25	McCord & Fridovich, 1969
<i>Mytilus edulis</i>	M	G.D.	-196°C puis -80°C	*	500g 12000g 100000g	Séphadex G25	McCord & Fridovich, 1969 ? (se réfère à Porte 1991)

ind. = individu, G.D. = glande digestive, gpe = groupe, (\*) = conditions expérimentales non précisées,  
M = organismes marins, D = organismes d'eau douce

Fraction dosée	Ordre de grandeur des activités enzymatiques chez les témoins			nombre de réplicats	Ordre de grandeur des coefficients de variation	Auteurs
	U/mg protéine	U/g poids frais	autres unités			
S100000		189 ± 25 à 353 ± 31 (Pas de valeur témoin)		n = 3 à 7	5 à 9%	Livingstone & al., 1995
surrogate de l'homogénat	5,6 ± 0,27 11,1 ± 1,03			n=6 ind.	9 à 13 %	Chetty & Indira, 1995
*	12,6 ± 3,63 à 18,43 ± 1,042			4 groupes de 2 ind. (n=4 gpes)	6 à 29 %	Wenning & al., 1988
S12000	12,42 ± 0,98 et 15,69 ± 0,67			n=8 et n=6 gpes de 2 ind.	4 à 8%	Wenning & DiGiulio, 1988
S100000	9,65 ± 0,87			4 groupes de 5 ind. (n=4gpes)	9%	Regoli & Principato, 1995
S100000	9,57±1,08			4 groupes de 5 ind. (n=4gpes)	11%	Regoli & Principato, 1995
S100000		241 ± 14 à 260 ± 11		3 groupes de deux G.D. (n=3gpes)	4 à 6 %	Livingstone & al., 1990
C12000 (mito) C100000 (micro) S100000 (cytos)	16,3 ± 0,7 11,9 ± 1,5 6,6 ± 0,9			n = 3 ou 4	4 % 13 % 14 %	Livingstone & al., 1992
S100000		634 ± 45 à 658 ± 27 (Pas de valeur témoin)		n = 5 à 6	4 à 7 %	Livingstone & al., 1995
S12000		~1000 ± 80 à 3500 ± 500		4 groupes de 10 G.D. (n=4gpes)	~8 à 14 %	Viarengo & al., 1991 (a)
S12000		593 ± 86 à 569 ± 218		n=?	15 à 38 %	Viarengo & al., 1991 (b)
S100000	7,5 ± 0,5 à 11 ± 0,5			groupe de 6 G.D.	5 à 7%	Solé & al., 1995a
S100000	6,4 ± 0,2 à 13 ± 0,1			groupe de 6 G.D.	1 à 2 %	Solé & al., 1995b
S100000	4,9 ± 0,3			groupes de 6 G.D. (essais en duplicat)	6%	Solé & al., 1996

l'âge, de la taille et en particulier du niveau métabolique de l'organisme. Certains auteurs dosent la SOD après avoir regroupé les organes de deux individus ou plus, afin d'atténuer cette variabilité (Tableau 32). Dans nos essais, les populations prélevées étaient cependant à peu près homogènes en âge (2 à 4 ans) et en taille.

Il est difficile de comparer nos résultats aux données de la littérature car les protocoles de préparation sont souvent différents du nôtre ou ne sont pas décrits précisément (Tableau 32).

Les différences se situent au niveau :

- de la fraction subcellulaire analysée, dont la composition dépend de la vitesse et de la durée de centrifugation, ainsi que des éventuelles purifications avant dosage,
- du degré et de la qualité de l'homogénéisation,
- de la méthode de dosage utilisée.

L'homogénéisation est en général assez poussée (potter motorisé) et suivie ou non de centrifugations. Le dosage de la SOD sera fait aussi bien sur homogénat (Filho & Boveris, 1993 ; Dimitrova & *al.*, 1994) que sur S100000 (Livingstone & *al.*, 1993), après purification (Wenning & DiGiulio, 1988) ou sans (Chetty & Indira, 1995) (Tableau 32). Dans le cas d'études sur le sang l'activité mesurée est rapportée au taux d'hémoglobine de l'hémolysat et non pas au taux de protéines (Roche & *al.*, 1992).

La méthode de dosage la plus utilisée est celle de McCord & Fridovich et permet l'obtention d'activités de SOD comprises en général entre 5 et 20 U/mg de protéines chez les mollusques aquatiques. Les résultats que nous avons obtenus par cette méthode sont du même ordre de grandeur, avec une activité spécifique supérieure dans les branchies par rapport à la glande digestive.

La comparaison des deux méthodes (McCord & Fridovich, 1969 et Paoletti & *al.*, 1986) montre que selon le tissu auquel on s'intéresse, le facteur permettant d'extrapoler les résultats d'une méthode à une autre n'est pas le même. En général, chez les bivalves, l'activité SOD est mesurée dans la glande digestive mais rarement dans les branchies. Sauf dans le cas de Chetty & Indira (1995) qui trouvent des valeurs d'activité spécifique doubles dans les branchies (11 U/mg prot.) par rapport à la glande digestive (5,6 U/mg prot.) chez le bivalve dulçaquicole

*Lamellidens marginalis* (méthode de Beauchamp & Fridovich, 1971). Cela correspond à la proportion que nous avons obtenue par la méthode de McCord & Fridovich (1969).

Les dosages par la méthode de McCord & Fridovich sur *Mytilus* donnent des valeurs de 10 U/mg protéine dans la glande digestive et dans les branchies (Regoli & Principato, 1995). D'autres équipes estiment l'activité dans la glande digestive chez *M. galloprovincialis* de 6 à 17 U (Solé & al., 1995a) ou de 12 à 18 U/mg protéine (Wenning & al., 1988) chez *Geukensia demissa*.

La méthode de Paoletti & al. (1986) est rarement citée dans la littérature relative à l'étude des biomarqueurs, cependant Lopez Torres & al. (1993) l'ont utilisée pour évaluer l'activité SOD dans des foies de poissons, amphibiens, oiseaux et mammifères. Les activités totales allaient de 2500 à 30000 U/g poids frais avec les valeurs les plus basses chez les espèces aquatiques alors que nos valeurs se situent entre 1200 et 3600 U/g poids frais.

Dans la plupart de nos essais, l'activité totale en U/g poids frais est inférieure dans les branchies par rapport au foie ou à la glande digestive alors que les activités spécifiques sont identiques par la méthode de Paoletti. Cela signifie que l'activité totale plus faible dans les branchies résulte simplement d'une plus faible teneur en protéines.

Les activités SOD peuvent aussi être exprimées en U/g poids frais. Ainsi chez les moules (marines), des activités totales dans la glande digestives allant de 198 ( $\pm 27$ ) (Livingstone & al., 1990) à 1000 ( $\pm 80$ ) (Viarengo & al., 1991b) ont été observées. Nos valeurs comprises entre 80 et 340 U/mg poids frais sont plus proches de celles obtenues par Livingstone & al., 1990.

Les mesures de la SOD à différentes périodes de l'année permettent de constater que des variations rapides peuvent avoir lieu. En effet, on passe d'un niveau de 70 U/mg protéine en juillet à 120 U/mg protéine à la mi-septembre. Quinze jours plus tard, les activités ont retrouvé leur niveau bas (80U/mg). Cette activité élevée est observée dans les deux sites de référence. Viarengo & al., 1991(b) avaient observé un pic d'activité au mois de juin sur *M.*

*galloprovincialis*. Ces variations ne peuvent pas être imputées à notre protocole expérimental car le niveau de production des radicaux superoxyde (représenté par la vitesse d'oxydation du NADH en absence de SOD) est resté constant lors des différentes évaluations des niveaux d'activités basales. Toutes les solutions étaient préparées de manière identique lors des différentes campagnes d'études.

Les activités SOD mesurées dans des individus originaires des sites témoins 1 ou 2 ont le même niveau. Les mesures n'ont été réalisées que sur trois individus de chaque site et la variabilité entre individus ne permet pas de mettre en évidence de différence entre sites. Les analyses des micropolluants montrent que le site témoin 2 est plus chargé en HAPs et PCBs. Les deux sites ne sont pas en communication l'un avec l'autre et les deux populations sont sans doute d'origine distincte. Mais la pratique de la pêche et donc l'apport régulier de poissons d'élevage parasités par les glochidies d'*Unio* pourrait contribuer à renouveler génétiquement les deux populations.

Les mises en cages ont permis de démontrer que le niveau de la SOD restait stable dans les glandes digestives ; les dosages sur branchies n'ont pas été réalisés faute de temps. Les autres paramètres étudiés n'ont pas été modifiés. Au cours de cette étude, les moules encagées ont pu s'enfoncer dans le sédiment, ce qui n'était pas toujours possible au niveau des sites des études ultérieures. Englund & Heino (1994) qui étudient le rythme d'ouverture des valves de *Anodonta anatina* au cours de la journée remarquent que des moules enfoncées dans le sédiment n'ont pas le même rythme que des moules encagées : celles-ci ont une activité élevée toute la journée (avec une légère baisse entre quatre et dix heures du matin). Selon ces auteurs, les moules témoin ont une activité basale beaucoup plus basse avec un pic entre vingt-quatre et cinq heures du matin. Pour Englund & Heino (1994), cette activité accrue est un avantage pour les expériences de biomonitoring, cependant dans nos conditions, elle risquerait d'induire un stress supplémentaire. L'influence de ce facteur devrait être vérifiée car le fond de nombreux cours d'eau est caillouteux et ne laisse pas aux moules la possibilité de pénétrer dans le sédiment.

## 2. Essais de transferts en milieux contaminés

### a). Essais sur le terrain

Lors des transferts de site sain vers des sites pollués par des HAPs, PCBs et métaux, l'activité SOD n'a pas été modifiée.

Lors de la première étude qui ne durait qu'une semaine, aucun paramètre n'a été modifié entre les individus restés encagés dans leur site d'origine et le site amont. L'analyse des sédiments n'a été réalisée que trois mois plus tard lors de l'essai définitif de transfert. L'absence de réponse du système antioxydant dans le site amont peut avoir plusieurs raisons :

la pollution du sédiment n'induit pas de stress oxydant,

les moules ne filtrent pas l'eau de l'interface sédiment-eau (le fond est caillouteux, elles ne s'y enfoncent pas).

Pourtant, les activités des glutathion peroxydase sélénium dépendante et glutathion réductase ont été diminuées au premier site aval alors que les moules ne pouvaient là non plus s'enfouir. Il est probable que les modifications du taux de glutathion réduit et des enzymes associées soient plutôt une conséquence des polluants contenus dans la phase aqueuse. Burgeot & al. (1996) ont comparé les activités enzymatiques de poissons (*Mullus barbatus*) vivant dans des sites plus ou moins contaminés par des HAPs. Les activités SOD étaient les mêmes chez des individus issus d'un site pollué à 848  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb) ou à 35209  $\mu\text{g}/\text{kg}$  alors que la glutathion peroxydase et la catalase étaient plus élevées dans le site le plus contaminé. Rodriguez-Ariza & al. (1993) remarquent une activité 1,4 fois plus importante de la SOD chez des poissons originaires d'un site pollué par des HAPs en faible quantité (44 ng/g), des PCB (2,3 ng/g) des métaux et surtout des pesticides (DDT = 7ng/g). Comme dans tous les essais sur le terrain en présence de mélanges complexes de polluants, il est difficile de trouver la substance responsable d'une modification d'activité enzymatique. Le second essai sur les mêmes sites mais plusieurs mois plus tard a permis d'observer une réponse différente des organismes. Toutes les activités enzymatiques sauf celle de la SOD étaient diminuées que ce soit en amont ou en aval de la cokerie mais surtout en aval. Cossu-Leguille (1996) a aussi observé une augmentation d'activité de la catalase et de la glutathion peroxydase sélénium indépendante au

premier site aval après trente jours d'exposition alors que la proportion de glutathion réduit par rapport au glutathion oxydé était diminuée. A quinze jours, le glutathion diminuait alors que la glutathion peroxydase sélénium indépendante n'était pas induite. L'activité glutathion réductase qui est réduite ne pourrait pas régénérer le glutathion sous sa forme réduite.

Les niveaux d'activité de la SOD sont assez variables entre les individus et nous avons observé un pic d'activité en septembre 1995 dans deux sites différents (Tableau 32). Il semblerait donc que la régulation de la SOD soit très sensible aux conditions environnementales.

### ***b) Essais en laboratoire***

Lors des essais d'intoxication au laboratoire pendant trois jours, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de variation de l'activité SOD, que ce soit avec le cuivre à 30  $\mu\text{g/l}$ , le thiram à 100  $\mu\text{g/l}$ , ou le mélange des deux. L'activité catalasique est elle aussi restée stable alors que les activités de la glutathion peroxydase sélénium dépendante et de la glutathion réductase ainsi que le rapport GSH/GSSG pour l'intoxication au cuivre et au mélange cuivre plus thiram dans les branchies étaient réduits. Radi & Matkovics (1988) qui intoxiquent *Cyprinus carpio morpha* avec du cuivre à 2 mg/l, n'observent aucune modification de l'activité SOD, en revanche, elle est inhibée pour des concentrations supérieures à 4 mg/l dans le foie et dans les branchies. Ces concentrations en métal sont cependant élevées : des études de comparaison de sensibilité aux toxiques sur glochidies d'*Anodonta imbecilis*, et sur *Ceriodaphnia dubia* donnent en eau moyennement dure une CL50 48h de 388  $\mu\text{g/l}$  pour *A. imbecilis*. En eau douce ( $\text{CaCO}_3 = 39 \text{ mg/l}$ ), elle passe à 171  $\mu\text{g/l}$  pour *A. imbecilis*; les métaux moins solubles en eau dure forment des complexes avec les carbonates et sont moins toxiques. Chez *C. dubia*, la CL50 48h du cuivre est de 65  $\mu\text{g/l}$  (Keller & Zam, 1991), les daphnies sont donc plus sensibles que les glochidies d'Unionidaes. Les moules adultes sont plutôt utilisées pour étudier la bioaccumulation des métaux : Salánki & V.-Balogh, 1989 exposent *Anodonta cygnea* au cuivre à des concentration de 10 et 100  $\mu\text{g/l}$  et observent les

périodes d'activité des organismes. La durée de filtration qui passe de vingt heures à huit heures pour 10  $\mu\text{g/l}$  est réduite à une heure par jour à la concentration en cuivre de 100  $\mu\text{g/l}$ . L'augmentation de la quantité de cuivre dans les organes ne devient significative qu'après soixante-douze heures d'exposition. Le métal s'accumule surtout dans les branchies, suivies du manteau, le niveau restant assez stable dans le foie. Il serait intéressant de tester les enzymes antioxydantes pour des concentrations en cuivre inférieures à 10  $\mu\text{g/l}$  ou à des doses pour lesquelles aucune modification de l'activité du mollusque n'est observée. L'observation d'une diminution du taux de glutathion total dans la cellule en présence de cuivre, ou de thiram, pourrait être la conséquence de sa complexation avec l'une de ces deux molécules ou de l'activation de glutathion transférases. Le taux de glutathion réduit par rapport au glutathion oxydé dans les branchies est très diminué chez les individus exposés au cuivre seul, un peu moins en présence de cuivre et de thiram, et presque pas en présence de thiram seul.

Lors de ces études, les enzymes antioxydantes liées au glutathion ont répondu aux intoxications. La quantité de glutathion et sa proportion sous forme réduite est aussi un bon indicateur de l'état d'oxydation de la cellule. Une diminution de cette proportion est souvent liée à une augmentation de la lipoperoxydation. Etant donné le temps nécessaire aux dosages, l'étude d'expositions longues à de faibles teneurs en toxique(s) n'a pas pu être entreprise. Elle nous rapprocherait plus du but que nous nous étions fixé c'est à dire trouver des **biomarqueurs d'impact à long terme** des micropolluants sur des écosystèmes hydriques.

Michaelidis & Athanasiadou (1994) mettent en évidence une réduction de l'amplitude et de la fréquence des battements cardiaques chez *Anodonta cygnea* lorsque la tension en oxygène passe de 50 à 10 mm Hg. *A. cygnea* garde les valves fermées plus longtemps lorsque le pH du milieu est égal à cinq. Il peut ainsi les garder fermées et donc rester en conditions anoxiques pendant au moins cinq jours (Pynnönen & Huebner, 1995). Lors de transferts en amont et en aval d'un rejet industriel, si l'on désire améliorer l'interprétation des résultats, il serait important de vérifier les paramètres suivants : température, pH, dureté de l'eau ( $\text{mg/l CaCO}_3$ ), conductivité ( $\mu\text{S/cm}$ ), oxygène dissous, turbidité. En effet, ces facteurs font partie des paramètres susceptibles d'être modifiés dans un cours d'eau, aux points de rejets et en aval de ceux-ci.

Leur influence indirecte (par l'intermédiaire de modification physico-chimiques internes) sur la réponse des enzymes antioxydantes devrait être vérifiée.

Au cours de cette recherche d'un biomarqueur capable d'être modifié avant que les populations de l'écosystème ne soient altérées lors de pollutions diffuses, nous avons remarqué que l'activité superoxyde dismutase était stable pour des apports en xénobiotiques importants. En revanche, les enzymes liées au glutathion avaient des activités modifiées. Des concentrations très faibles en toxiques devraient être testées car les mécanismes d'induction mis en jeu au niveau cellulaire risquent de ne pas être les mêmes. Des inductions qui auraient lieu à faible concentration en toxique pourraient être masquées par des effets de toxicité (inhibition des enzymes induites). Si il s'avère que des biomarqueurs de stress oxydant ne soient pas spécifiques d'un composé donné, cette non spécificité peut être un avantage pour la détection de l'effet de polluants qui, non toxiques à l'état individuel le deviennent lorsqu'ils sont combinés. Elle pourra aussi être un handicap lorsque l'on cherchera la raison du stress afin d'éliminer sa source.

### 3. Comparaison des activités basales avec les autres espèces

Chez les poissons, les activités SOD peuvent varier selon l'espèce étudiée. Wilhelm Filho & Boveris (1993) observent des activités allant de 0,5 chez *Raja agassizi*. à 2,1 nmol SOD/g poids frais chez *Squatina argentina*. Selon les tissus, les activités varient de 32 (muscle) à 208 (branchies) et à 1284 U/g poids frais (foie) chez *Cyprinus carpio*. (Radi & Matkovics, 1988). La même constatation a été faite sur la rascasse pour laquelle Bay & al., (1990) évaluent par une méthode différente des activités de 1330 U/g poids frais dans le foie et de 552 U/g poids frais dans les branchies. L'activité SOD totale est plus élevée dans le foie que dans les branchies chez les poissons. Wilhelm Filho & Boveris (1993) mesurent des activités par g poids frais d'environ le double dans le foie par rapport aux branchies. Pour Aksnes & Njaa (1981) aussi, la quantité de SOD/g poids frais est au moins quatre fois plus importante dans le

foie que dans les branchies d'organismes marins (seiche et maquereau). Pour les poissons d'eau douce, on observe des différences importantes d'activité au niveau du foie : par exemple Bainy & al. (1995) observent des activités d'environ 57 U/mg protéine chez *Oreochromis niloticus* au niveau du cytosol alors que DiGiulio & al. (1993) mesurent par la même méthode (McCord & Fridovich, 1969) une activité d'environ 4 U/mg protéine chez *Ictalurus punctatus*. Rodríguez-Ariza & al. (1993) observent aussi chez *Mugil sp.* une activité de 8 U/mg protéine au niveau de S31000.

En eau de mer, le foie de la limande et du gobie sont aussi riche en SOD l'un que l'autre. Entre 190 et 350 U/g poids frais pour le gobie (Livingstone & al., 1995) contre 246 U/g poids frais chez la limande (Livingstone, 1993).

Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que l'activité mesurée par Livingstone & al., 1990 sur glandes digestives de *M. edulis*, (240 à 260 U/g poids frais) mais beaucoup plus faible que l'activité mesurée lors d'autres essais sur les moules marines. On remarque en effet que Livingstone & al. (1995) sur *M. galloprovincialis* et Viarengo & al. (1991a) sur *M. edulis* mesurent des activités plus proches de 600 U/g poids frais, que ce soit à partir du S100000 ou du S12000. Cette activité enzymatique peut même atteindre 1000 à 3500 U/g protéine chez la même espèce de moules (*M. edulis*) dans la glande digestive (Viarengo & al., 1991b). Les activités spécifiques mesurées par la méthode de McCord & Fridovich sur S100000 de glande digestives de *M. galloprovincialis* ou de *M. edulis* sont assez homogènes et vont de 5 U/mg protéine (Solé & al., 1996) à 10 U/mg protéine (Regoli & Principato, 1995). Pour cette équipe, l'activité spécifique trouvée dans les branchies de *M. galloprovincialis* est au même niveau que celle des glandes digestives. En revanche, des mesures effectuées par Chetty & Indira (par la méthode de Beauchamp & Fridovich) sur moules dulçaquicoles *Lamellidens marginalis* donnent des activités spécifiques branchiales doubles de celles de la glande digestive.

Les différences d'activités SOD entre poissons et mollusques ne semblent pas flagrantes. Lopez Torrez & al. (1993) ont montré que l'on pouvait observer des valeurs d'activité totale plus faibles chez des espèces totalement aquatiques par rapport à des organismes terrestres.

Chez *M. edulis*, on peut observer des variations importantes d'activité sur plusieurs études réalisées par la même équipe : Viarengo & al., 1991(a) et 1991(b). On peut observer des valeurs allant de 570 à 3500 U/g poids frais dans les glandes digestives.

Lors de nos essais nous avons essayé de faire la distinction entre les différents types de SOD, afin de mettre en évidence une activation ou inhibition de l'une des deux isoenzymes.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de variation d'activité totale de la SOD, cela ne signifie pas qu'il ne se passe rien. En effet, une modification de la Mn-SOD qui est minoritaire peut passer inaperçue lors de la mesure de l'activité totale, ou même être compensée par une modification inverse de l'activité CuZn-SOD.

L'inhibition de la CuZn-SOD lors de l'utilisation de la méthode de Paoletti n'a pas pu être réalisée efficacement alors que par la méthode de McCord & Fridovich (1969), nous avons obtenu une proportion d'environ 83 % de CuZn-SOD par rapport à la SOD totale dans les glandes digestives d'*Unio tumidus*. Ces essais n'ont pu être réalisés systématiquement sur tous les animaux étudiés car nous avons gardé la méthode de Paoletti pour l'évaluation des activités basales ou des moules intoxiquées. Les analyses sur fraction particulière (C12000) et cytoplasmique ont quand même permis d'évaluer une proportion de dix pour cent d'activité totale contenue dans le C12000. Les deux fractions présentaient des activités spécifiques très proches l'une de l'autre.

La modification de l'activité enzymatique peut résulter d'une moindre expression de la protéine, mais aussi de modifications (attaques de l'enzyme) chimiques de groupements intervenant dans le processus enzymatique. Nous avons cherché à mettre en évidence l'apparition de nouvelles formes ou disparition d'isoenzymes après isoélectrofocalisation. Ces essais nous ont permis de déterminer le pHi de la CuZn-SOD d'*Unio* à 4,9 mais malheureusement l'activité MnSOD était trop faible pour être détectée sur le gel. Nous n'avons pas non plus vu de nouvelles isoenzymes lors de l'électrophorèse d'échantillons transférés dans le cours d'eau pollué.

# **CONCLUSION**

## Conclusion

Ce travail a permis de retenir deux méthodes parmi les quatre méthodes de dosage testées : la méthode de Paoletti & al. (1986) qui est la plus sensible et qui a servi pour toutes estimations d'activité SOD de ce travail. La méthode de McCord & Fridovich, (1969) est aussi intéressante pour sa rapidité. La séparation des fractions particulaires et cytosoliques a été réalisée par centrifugation mais n'a pas permis de mettre en évidence des différences de comportement des activités lors des expositions aux toxiques.

Les inhibitions de la CuZn-SOD par le cyanure ont montré qu'environ quatre-vingt pour cent de l'activité mesurée était due à cette isoenzyme. Son pH isoélectrique a été déterminé et est de 4,9 dans les glandes digestives et dans les branchies.

Les activités SOD se sont montrées stables au cours de chaque campagne de prélèvement mais ont donné des variations saisonnières non négligeables. Cette enzyme antioxydante semble donc plus modulée par des facteurs naturels que par les pollutions auxquelles les moules ont été exposées.

Dans les conditions que nous avons étudiées, l'évaluation de l'activité superoxyde dismutasique ne semble pas être un bon biomarqueur d'exposition. Pour réaliser des mesures fiables, il faut purifier l'échantillon et aussi vérifier systématiquement que l'activité mesurée n'est due qu'à l'enzyme dosée. En revanche, si une méthode de purification et concentration de l'enzyme est assez rapide pour être utilisée en routine, elle permettrait peut-être de mettre en évidence de nouvelles isoenzymes. La méthode la plus efficace pour distinguer les différents types de SOD est encore l'électrophorèse suivie d'une révélation soit de l'activité SOD soit de la protéine SOD (meilleure quantification sur le gel) à l'aide d'anticorps. Le fractionnement subcellulaire permet une première approche de la répartition de l'enzyme mais nécessiterait des vérifications du degré de pureté de la fraction (dosages enzymatiques supplémentaires) à chaque étape du fractionnement.

Parmi les autres paramètres mesurés en parallèle, les enzymes liées au glutathion et particulièrement la glutathion réductase se sont montrées les plus sensibles au stress que nous avons imposés à *Unio tumidus*. Le taux de glutathion réduit était aussi souvent diminué simultanément.

Les biomarqueurs de toxicité tels le malonaldéhyde, les protéines oxydées ou les lésions de l'ADN sont aussi intéressants à suivre. En effet ces lésions, en particulier celles au niveau de l'ADN pourraient jouer un rôle dans l'évolution et l'adaptation des systèmes biologiques à leur environnement (Mantovani, 1995).

Des études des paramètres retenus comme biomarqueurs devraient être faites en conditions moins stressantes pour les moules afin de mieux évaluer les réponses pour des pollutions diffuses. Les paramètres physico-chimiques relatifs à l'eau et aux sédiments auxquels sont exposés les moules devraient aussi être systématiquement déterminés afin de mieux interpréter les résultats et conclure sur la pertinence de l'utilisation des enzymes de lutte contre le stress oxydant comme biomarqueurs d'exposition.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques

- ABELE-OESCHGER, D. (1996) A comparative study of superoxide dismutase activity in marine benthic invertebrates with respect to environmental sulphide exposure. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **197**, 39-49
- AHMAD, S. (1995) Oxidative stress from environmental pollutants. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **29**, 135-157
- AKSNES, A. & NJAA, L.R. (1981) Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology* **69B**, 893-896
- ASADA, K., TAKAHASHI, M. & NAGATE, M. (1974) Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agricultural and Biological Chemistry* **38**, 471-473
- BABO, S. 1989 Mesures de l'activité d'enzymes de détoxification cellulaires chez *Salmo gairdneri*. Superoxyde dismutase - Catalase - Glutathion peroxydase. *Rapport de D.E.A.*, Université de Metz
- BAINY, A.C.D., SAITO, E., CARVALHO, P.S.M. & JUNQUEIRA, V.B.C. (1996) Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicology* **34**, 151-162
- BANCI, L., CARLONI, P. & ORIOLI, P.L. (1994) Molecular dynamics studies on mutants of Cu,Zn superoxide dismutase : The functional role of charged residues in the electrostatic loop VII. *Proteins : Structure, Function, and Genetics* **18**, 216-230
- BARJA DE QUIROGA, G., GUTIERREZ, P., ROJO, S. & ALONSO-BEDATE, M. (1984) A comparative study of superoxide dismutase in amphibian tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology* **77B**, 589-593
- BATTISTONI, A. & ROTILIO, G. (1995) Isolation of an active and heat-stable monomeric form of Cu,Zn superoxide dismutase from the periplasmic space of *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **374**, 199-202
- BAY, S.M., GREENSTEIN, D.J., SZALAY, P. & BROWN, D.A. (1990) Exposure of scorpionfish (*Scorpaena guttata*) to cadmium : biochemical effects of chronic exposure. *Aquatic Toxicology* **16**, 311-320
- BEAUCHAMP, C. & FRIDOVICH, I. (1971) Superoxide dismutase : Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**, 276-287
- BENOV, L., CHANG, L.Y., DAY, B. & FRIDOVICH, I. (1995) Copper, Zinc superoxide dismutase in *Escherichia coli* : periplasmic localization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **319**, 508-511
- BEYER, W., IMLAY, J. & FRIDOVICH, I. (1991) Superoxide dismutases. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **40**, 221-253

- BIOXYTECH S.A. (1992) Dosage spectrophotometrique de l'activité superoxyde dismutase par la méthode SOD-525. *Notice d'emplois* disponible chez Bioxytech S.A., Z.A. des Petits Carreaux - 2, av. des Coquelicots - F 94385 BONNEUIL-SUR-MARNE CEDEX - FRANCE
- BORDERS, C.L., Jr & FRIDOVICH, I. (1985) A comparison of the effects of cyanide, hydrogen peroxide, and phenylglyoxal on eucaryotic and procaryotic Cu,Zn superoxide dismutase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **241**, 472-476
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-253
- BRAY, R.C., COCKLE, S.A., FIELDEN, E.M., ROBERTS, P.B., ROTILIO, G. & CALABRESE, L. (1974) Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochemistry Journal* **139**, 43-48
- BUCKLEY, J.A. (1994) The susceptibility of superoxide dismutase in *Lemna minor* to systemic copper concentrated from wastewater. *Water Research* **12**, 2469-2476
- BURGEOT, T., BOCQUÉNÉ, G., PORTE, C., DIMEET, J., SANTELLA, R.M., GARCIA DE LA PARRA, L.M., PFHÖL-LESZKOWICZ, A., RAOUX, C. & GALGANI, F. (1996) Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series* **131**, 125-141
- BYCZKOWSKI, J.Z. & GESSNER, T. (1988) Biological role of superoxide dismutase. *International Journal of Biochemistry* **20**, 569-589
- CADENAS, E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry* **58**, 79-110
- CERUTTI, P., GHOSH, R., OYA, Y. & AMSTAD, P. (1994) The role of the cellular antioxidant defense in oxidant carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* **102**, 123-130
- CHAN, P.H., CHU, L. & FISHMAN, R.A. (1988) Reduction of activities of superoxide dismutase but not of glutathione peroxidase in rat brain regions following decapitation ischemia. *Brain Research* **439**, 388-390
- CHEN, Y., SAARI, J.T., & KANG, Y.J. (1994) Weak antioxidant defenses make the heart a target for damage in copper-deficient rats. *Free Radical Biology & Medicine* **17**, 529-536
- CHETTY, A.N. & INDIRA, K. (1995) Free radical toxicity in a freshwater bivalve, *Lamellidens marginalis* under ambient ammonia stress. *Journal of Environmental Biology* **16**, 137-142
- COMPAN, I. & TOUATI, D. (1993) Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **175**, 1687-1696
- COSSU, C. (1992) Optimisation de la mesure des activités enzymatiques de glutathion peroxydases et de catalase sur hépatopancreas de bivalves (*Mytilus edulis*, *Unio tumidus*). *Rapport de D.E.A.*, Université de Metz

- DeFREITAS, D.M. & VALENTINE, J.S. (1984) Phosphate is an inhibitor of copper-zinc superoxide dismutase. *Biochemistry* **23**, 2079-2082
- DELMAESTRO, E. & TROMBETTA, L.D. (1995) The effects of disulfiram on the hippocampus and cerebellum of the rat brain: a study on oxidative stress. *Toxicology Letters* **75**, 235-243
- DHAUNSI, G.S., SINGH, I. & HANEVOLD, C.D. (1993) Peroxisomal participation in the cellular response to the oxidative stress of endotoxin. *Molecular and Cellular Biochemistry* **126**, 25-35
- DiGIULIO, R.T., HABIG, C. & GALLAGHER E.P. (1993) Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquatic Toxicology* **26**, 1-22
- DIMITROVA, M.St., TISHINOVA, V. & VELCHEVA, V. (1994) Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **108C**, 43-46
- DJINOVIC, K., GATTI, G., CODA, A., ANTOLINI, L., PELOSI, G., DESIDERI, A., FALCONI, M., MARMOCCHI, F., ROTILIO, G. & BOLOGNESI, M. (1992) Crystal structure of yeast Cu,Zn superoxide dismutase. *Journal of Molecular Biology* **225**, 791-809
- EICKHOFF, J., POTTS, E. & VALTOS, J., NIEDERHOFFER, E.C. (1995) Heavy metal effects on *Proteus mirabilis* superoxide dismutase production. *FEMS Microbiology Letters* **132**, 271-276
- ELDER, J.F. & COLLINS, J.J. (1991) Freshwater molluscs as indicators of bioavailability and toxicity of metals in surface-water systems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **122**, 37-79
- ELDRED, G.E. & HOFFERT, R. (1981) A test for endogenous interferences in superoxide dismutase assays. *Analytical Biochemistry* **110**, 137-143
- ELSTNER, E.F. & OSSWALD, W. (1994) Mechanisms of oxygen activation during plant stress. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* **102B**, 131-154
- ENGLUND, V. & HEINO, M. (1994) Valve movement of freshwater mussel *Anodonta anatina*: a reciprocal transplant experiment between two lakes. *Annales Zoologici Fennici* **31**, 417-423
- FAZZONE, H., WANGNER, A. & CLERCH, L.B., (1993) Rat lung contains a developmentally regulated manganese superoxide dismutase mRNA-binding protein. *Journal of Clinical Investigation* **92**, 1278-1281
- FESTER, T. & SCHUSTER, W. (1995) Potato mitochondrial manganese superoxide dismutase is an RNA-binding protein. *Biochemistry and Molecular Biology International* **36**, 67-75
- GABRYELAK, T. & KLEKOT, J. (1985) The effect of paraquat on the peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology* **81C**, 415-418

- GALIAZZO, F., CIRIOLO, M.R., CARRÌ, M.T., CIVITAREALE, P., MARCOCCI, L., MARMOCCHI, F. & ROTILIO, G. (1991) Activation and induction by copper of Cu/Zn superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae*. Presence of an inactive proenzyme in anaerobic yeast. *European Journal of Biochemistry* **196**, 545-549
- GELLER, B.L. & WINGE, D.R. (1984) Subcellular distribution of superoxide dismutases in rat liver. In *Methods in enzymology* **105**, (PACKER, L. eds), 105-114, Academic Press, (London)
- GIRARDI, H. & LEDOUX, J.C. (1989) Présence d'*Anodonta woodiana* (Lea) en France (Mollusques, Lamellibranches, Unionidae). *Bulletin Mensuel de la Société Linnéenne de Lyon* **58**, 286-291
- GODIN, D.V. & GARNETT, M.E. (1992) Species-related variations in tissue antioxidant status-I. Differences in antioxidant enzyme profiles. *Comparative Biochemistry and Physiology* **103B**, 737-742
- GOLDSTEIN, B.D., ROZEN, G., QUINTAVALLA, J.C. & AMORUSO, M.A. (1979) Decrease in mouse lung and liver glutathione peroxidase activity and potentiation of the lethal effects of ozone and paraquat by the superoxide dismutase inhibitor diethyldithiocarbamate. *Biochemical Pharmacology* **28**, 27-30
- GOLDSTEIN, S., MICHEL, C., BORS, W., SARAN, M. & CZAPSKI, G. (1988) A critical reevaluation of some assay methods for superoxide dismutase activity. *Free Radical Biology & Medicine* **4**, 295-303
- GOLDSTEIN, S. & CZAPSKI, G. (1991) Comparison between different assays for superoxide dismutase-like activity. *Free Radical Research Communications* **12-13**, 5-10
- GOLDSTEIN, S., MEYERSTEIN, D. & CZAPSKI, G. (1993) The Fenton reagents. *Free Radical Biology & Medicine* **15**, 435-445
- GRAF, E., MAHONEY, J.R., BRYANT, R.G. & EATON, J.W. (1984) Iron-catalysed hydroxyl radical formation. *The Journal of Biological Chemistry* **259**, 3620-3624
- GÖTZ, F., ELSTNER, E.F., SEDEWITZ, B. & LENGERFELD, E. (1980) Oxygen utilisation by *Lactobacillus plantarum*. *Archives of Microbiology* **125**, 215-220
- GU, W., MORALES, C. & HECHT, N.B. (1995) In male mouse germ cells, Copper-Zinc superoxide dismutase utilizes alternative promoters that produce multiple transcripts with different translation potential. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 236-243
- HABER, F. & WEISS, J.J. (1934) The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London Series A* **147**, 332-351
- HALLIWELL, B., & GUTTERIDGE, J.M.C. (1989) Protection against radical damage : systems with problems. In *Free Radicals in Biology and Medicine* (HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C., eds), 277-298, Clarendon Press (Oxford)
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease : an overview. In *Methods in Enzymology* **186** (PACKER, L. & GLAZER, A.N., eds.), 1-85, Academic Press (London)
- HARRIS, E.D. (1992) Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB Journal* **6**, 2675-2683

- HEIKKILA, R.E. (1985) Autoxidation of 6-Hydroxydopamine. In *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. (GREENWALD, R.A. eds), 233-235, CRC Press (Boca Raton)
- HIDALGO, E., NUNOSHIBA, T. & DEMPLER, B. (1994) *soxRS* oxidative stress regulon of *Escherichia coli*. *Methods in Molecular Genetics* **3**, 325-340
- HIDALGO, E., BOLLINGER, J.M. Jr, BRADLEY, T.M., WALSH, C.T. & DEMPLER, B. (1995) Binuclear [2Fe-2S] clusters in the *Escherichia coli* SoxR protein and role of the metal centers in transcription. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 20908-20914
- HO, Y.S., HOWARD, A.J. & CRAPO, J.D. (1991) Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **4**, 278-286
- HOPKIN, K.A., PAPAZIAN, M.A. & STEINMAN, H.M. (1992) Functional differences between manganese and iron superoxide dismutases in *Escherichia coli* K-12. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 24253-24258
- ICHIKAWA, I., KIYAMA, S. & YOSHIOKA, T. (1994) Renal antioxidant enzymes: Their regulation and function. *Kidney International* **45**, 1-9
- IZAWA, O., KATO, T., TAGAMI, H., AKAMATSU, H. & NIWA, Y. (1994) Long-term follow-up study of changes in lipid peroxide levels and the activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in mouse skin after acute and chronic UV irradiation. *Archives of Dermatological Research* **286**, 47-52
- JEFFREE, R.A., MARKICH, S.J. & BROWN, P.L. (1993) The uses of bivalves in freshwater pollution studies. *Proceedings of the 2nd National Convention of the Malacological Society of the Philippines, U.P. Diliman, Quezon City, Philippines, December 3-4, 1993*
- JEWETT, S.L. & ROCKLIN, A.M. (1993) Variation of one unit of activity with oxidation rate of organic substrate in indirect superoxide dismutase assays. *Analytical Biochemistry* **212**, 555-559
- KAIM, W., & RALL, J. (1996) Copper - a "Modern" bioelement. *Angewandte Chemie International Edition in English* **35**, 43-60
- KARLIN, K.D. (1993) Metalloenzymes, structural motifs, and inorganic models. *Science* **261**, 701-708
- KEHRER, J.P. (1993) Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology* **23**, 21-48
- KELLER, A.E. & ZAM, S.G. (1991) The acute toxicity of selected metals to the freshwater mussel, *Anodonta imbecilis*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **10**, 539-546
- KELNER, M.J., BAGNELL, R., HALE, B. & ALEXANDER, N.M. (1989) Inactivation of intracellular copper-zinc superoxide dismutase by copper chelating agents without glutathione depletion and methemoglobin formation. *Free Radical Biology & Medicine* **6**, 355-360
- KHAN, A.U. & KASHA, A. (1994) Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**, 12365-12367

- KHAN, A.U. & WILSON, T. (1995) Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chemistry & Biology* **2**, 437-445
- KILK, A., LAAN, M. & TORP, A. (1995) Human CuZn superoxide dismutase enzymatic activity in cells is regulated by the length of the mRNA. *FEBS Letters* **362**, 323-327
- KIM, Y.H., YOO, H.Y., JUNG, G., KIM, J.Y. & RHO, H.M. (1993) Isolation and analysis of the rat genomic sequence encoding Cu/Zn superoxide dismutase. *Gene* **133**, 267-271
- KIM, S.J., HAN, D., MOON, K.D. & RHEE, J.S. (1995) Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidant. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **59**, 822-826
- KOHEN, R., MISGAV, R. & GINSBURG, I. (1991) The SOD like activity of copper:carnosine, copper:anserine and copper:homocarnosine complexes. *Free Radical Communications* **12-13**, 179-185
- KROLL, J.S., LANGFORD, P.R., WILKS, K.E. & KEIL, A.D. (1995) Bacterial [Cu,Zn]-superoxide dismutase: phylogenetically distinct from the eukaryotic enzyme, and not so rare after all ! *Microbiology* **141**, 2271-2279
- L'ABBÉ, M.R. & FISCHER, P.W.F. (1990) Automated assay of superoxide dismutase in blood. In *Methods in Enzymology* **186** (PACKER, L. & GLAZER, A.N., eds.), 232-237, Academic Press (London)
- LAIHIA, J.K., JANSÉN, C.T. & AHOTUPA, M. (1993) Lucigenin and linoleate enhanced chemiluminescent assay for superoxide dismutase activity. *Free Radical Biology & Medicine* **14**, 457-461
- LEGUILLE-COSSU, C. (1996) Activités de systèmes antioxydants chez *Unio tumidus*, bivalve dulçaquicole en conditions physiologiques et de stress chimique. *Rapport de Thèse*, Université de Metz
- LEMAIRE, P. & LIVINGSTONE, D.R. (1993) Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology* **1**, 1119-1150
- LI, Z., & DEMPLE, B. (1994) SoxS, an activator of superoxide stress genes in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 18371-18377
- LIVINGSTONE, D.R., GARCIA MARTINEZ, P., MICHEL, X., NARBONNE, J.F., O'HARA, S., RIBERA, D. & WINSTON, G.W. (1990) Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. *Functional Ecology* **4**, 415-424
- LIVINGSTONE, D.R., LEMAIER, P., MATTHEWS, A., PETERS, L., BUCKE, D. & LAW, R.J. (1993) Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin o-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. *Marine Pollution Bulletin* **26**, 602-606
- LIVINGSTONE, D.R., LEMAIER, P., MATTHEWS, A., PETERS, L.D., PORTE, C., FITZPATRICK, P.J., FÖRLIN, L., NASCI, C., FOSSATO, V., WOOTTON, N. & GOLDFARB, P. (1995) Assessment of the impact of organic pollutants on goby (*Zosterisessor*

- ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice lagoon, Italy : biochemical studies. *Marine Environmental Research* **39**, 235-240
- LOPEZ-TORRES, M., PEREZ-CAMPO, R., ROJAS, C., CADENAS, S. & BARJA, G. (1993) Maximum life span in vertebrates: relationship with liver antioxidant enzymes, glutathione system, ascorbate, urate, sensitivity to peroxidation, true malondialdehyde, in vivo  $H_2O_2$ , and basal and maximum aerobic capacity. *Mechanisms of Ageing and Development* **70**, 177-199
- MAAß, S. (1987) Untersuchungen zur Fortpflanzungsbiologie einheimischer Süßwaßermuscheln der Gattung *Unio*. *PhD thesis*, Tierärztliche Hochschule HANNOVER
- MÄKELÄ, P. (1995) Freshwater mussel monitoring: the duck mussel *Anodonta anatina* in water quality assessment. *Joensuu Yliopiston Luonnontieteellisiä Julkaisuja* **34**, 1-47
- MANKHETKORN, S., ABEDINZADEH, Z. & HOUEE-LEVIN, C. (1994) Antioxidant action of sodium diethyldithiocarbamate: reaction with hydrogen peroxide and superoxide radical. *Free Radical Biology & Medicine* **17**, 517-527
- MANTOVANI, B. (1995) Homeostasis perturbation (physiological stress) and the mechanism of biological evolution - the possible role of active oxygen species. *Journal of theoretical Biology* **176**, 193-194
- MARKLUND, S. & MARKLUND, G. (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry* **47**, 469-474
- MARKLUND, S.L., HOLME, E. & HELLNER, L. (1982) Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clinica Chimica Acta* **126**, 41-51
- MARKLUND, S.L. (1990) Analysis of extracellular superoxide dismutase in tissue homogenates and extracellular fluids. In *Methods in Enzymology*, (PACKER, L. & GLAZER, A.N., eds.), 260-265, Academic Press (London)
- MARTIN, J.P. Jr. (1990) Assays for superoxide dismutase based on autoxidation of hematoxylin. In *Methods in Enzymology* **186** (PACKER, L. & GLAZER, A.N., eds.), 220-227, Academic Press (London)
- MATHER-MIHAICH, E. & DiGIULIO, R.T. (1986) Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde, glutathione and methemoglobin concentrations in channel catfish exposed to DEF and n-butyl mercaptan. *Comparative Biochemistry and Physiology* **85C**, 427-432
- McCORD, J.M. & FRIDOVICH, I. (1969) Superoxide dismutase : an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry* **244**, 6049-6055
- MICHAELIDIS, B. & ATHANASIADOU, P. (1994) Effect of reduced oxygen tension on the heart rate and the kinetic properties of glycolytic key enzymes PFK, PK and glycogen phosphorylase from the freshwater mussel *Anodonta cygnea* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology* **108B**, 165-172
- MIESEL, R. & HASS, R. (1993) Reactivity of an active center analog of  $Cu_2Zn_2$  superoxide dismutase in murine model of acute and chronic inflammation. *Inflammation* **17**, 595-611

- MILLER, D.M., BUETTNER, G.R. & AUST, S.D. (1990) Transition metals as catalysts of "Autoxidation" reactions. *Free Radical Biology & Medicine* **8**, 95-108
- MINAMI, M. & YOSHIKAWA, H. (1979) A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clinica Chimica Acta* **92**, 337-342
- MISRA, H.P. & FRIDOVICH, I. (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry* **247**, 3170-3175
- MISRA, H.P. & FRIDOVICH, I. (1977) Superoxide dismutase: a photochemical augmentation assay. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **181**, 308-312
- MORADAS-FERREIRA, P., COSTA, V., PIPER, P. & MAGER, W. (1996) MicroReview : The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology* **19**, 651-658
- MORITA, J., SUZUKI, T., KIMURA, S., HARA, A. & TAKAMA, K. (1995) Effect of low level ozone exposure on the serum TBA-reactive substance (TBA-RS) level and gill superoxide dismutase and catalase activities in rainbow trout. *Fisheries Science* **61**, 890-891
- MOUThON, J. (1996) Molluscs and biodegradable pollution in rivers: proposal for a scale of sensitivity of species. *Hydrobiologia* **317**, 221-229
- NAGANO, T., HIRANO, T. & HIROBE, M. (1989) Superoxide dismutase mimics based on iron *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry* **264**, 9243-9249
- NAGEL, K.O. (1988) Anatomische, morphologische und biochemische untersuchungen zur taxonomie und systematik der europäischen Unionacea (Mollusca : bivalvia). *PhD thesis*, Gesamthochschule KASSEL
- NAGELE, A., FELIX, K. & LENGFELDER, E. (1994) Induction of oxidative stress and protection against hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity by the superoxide dismutase-mimetic complex copper-putrescine-pyridine. *Biochemical Pharmacology* **47**, 555-562
- NAKANO, M. (1990) Assay for superoxide dismutase based on chemiluminescence of luciferin analog. In *Methods in Enzymology* **186** (PACKER, L. & GLAZER, A.N. eds.), 227-232, Academic Press (London)
- NEBOT, C., MOUTET, M., HUET, P., XU, J.Z., YADAN, J.C. & CHAUDIERE, J. (1993) Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autoxidation of a tetracyclic catechol. *Analytical Biochemistry* **214**, 442-451
- NISHIDA, A., MISAKI, Y., KURUTA, H., TAKASHIMA, S. (1994) Developmental expression of copper,zinc-superoxide dismutase in human brain by chemiluminescence. *Brain & Development* **16**, 40-43
- OGAWA, N., ASANUMA, M., KONDO, Y., HIRATA, H., NISHIBAYASHI, S. & MORI, A. (1994) Changes in lipid peroxidation, Cu/Zn-superoxide dismutase and its mRNA following an intracerebroventricular injection of 6-hydroxydopamine in mice. *Brain Research* **646**, 337-340
- PAHL, H.L. & BAEUERLE, P.A. (1994) Oxygen and the control of gene expression. *BioEssays* **16**, 497-502

- PAOLETTI, F., ALDINUCCI, D., MOCALI, A. & CAPARRINI, A. (1986) A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry* **154**, 536-541
- PAOLETTI, F. & MOCALI, A. (1990) Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. In *Methods in Enzymology* **186** (PACKER, L. & GLAZER, A.N. eds.), 209-219, Academic Press (London)
- PARDINI, R.S. (1995) Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **29**, 101-118
- PARKE, D.V. (1987) The role of enzymes in protection mechanisms for human health. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **7**, 222-235
- PEDRAJAS, J.R., PEINADO, J. & LÓPEZ-BAREA, J. (1995) Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chemico-Biological Interactions* **98**, 267-282
- PÉRÈS, G. & ROCHE, H. (1989) Effet d'une diminution expérimentale de la salinité aquatique sur les activités superoxyde dismutase, catalase et peroxydase de l'hématie d'un poisson euryhalin, le Loup (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comptes Rendus de la Société de Biologie de Lyon* **183**, 247-255
- PHYLACTOS, A.C., HARBIGE, L.S. & CRAWFORD, M.A. (1994) Essential fatty acids alter the activity of manganese-superoxide dismutase in rat heart. *Lipids* **29**, 111-115
- POTTS, W.T.W. (1954) The inorganic composition of the blood of *Mytilus edulis* and *Anodonta cygnea*. *Journal of Experimental Biology* **31**, 376-385
- PYNNÖNEN, K.S. & HUEBNER, J. (1995) Effect of episodic low pH exposure on the valve movements of the freshwater bivalve. *Water Research* **29**, 2579-2582
- RADI, A.A.R. & MATKOVICS, B. (1988) Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology* **90C**, 69-72
- REGOLI, F. & PRINCIPATO, G. (1995) Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions : implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology* **31**, 143-164
- RICE-EVANS, C.A. (1994) Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological states. In *Free Radical Damage and its Control* (RICE-EVANS, C.A. & BURDON, R.H., eds), 131-153, (Amsterdam)
- RIGO, A. & ROTILIO, G. (1985) Quantitation of superoxide dismutase: electrochemical assay. In *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. (GREENWALD, R.A. eds), 221-226, CRC Press (Boca Raton)
- RIJSTENBIL, J.W., DERKSEN, J.W.M., GERRINGA, L.J.A., POORTVLIET, T.C.W., SANDEE, A., VAN DEN BERG, M., VAN DRIE, J. & WIJNHOLDS, J.A. (1994) Oxidative stress induced by copper: defense and damage in the marine planktonic diatom

- Ditylum brightwellii*, grown in continuous cultures with high and low zinc levels. *Marine Biology* **119**, 583-590
- RILEY, D.P. & WEISS, R.H. (1994) Manganese macrocyclic ligand complexes as mimics of superoxide dismutase. *Journal of American Chemical Society* **116**, 387-388
- ROBERTS, M.H. Jr. & SVED, D.W. (1987) Temporal changes in AHH and SOD activities in Feral Spot from the Elizabeth River, a polluted sub-estuary. *Marine Environmental Research* **23**, 89-101
- ROCHE, H., BOGÉ, G. & HOUVET, D. (1992) Incidence de quatre composés phénoliques sur les enzymes de détoxification des radicaux libres chez *Dicentrarchus labrax*. *Ichthyophysiologica Acta* **15**, 225-240
- RODRÍGUEZ-ARIZA, A., PEINADO, J., PUEYO, C. & LÓPEZ-BAREA, J. (1993) Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **50**, 2568-2573
- SALÁNKI, J. & V.-BALOGH, K. (1989) Physiological background for using freshwater mussels in monitoring copper and lead pollution. *Hydrobiologia* **188/189**, 445-454
- SALIN, M.L. (1987) Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiologia Plantarum* **72**, 681-689
- SOHAL, R.S. (1988) Effect of hydrogen peroxide administration on life span, superoxide dismutase, catalase, and glutathione in the adult housefly, *Musca domestica*. *Experimental Gerontology* **23**, 211-216
- SOHAL, R.S. & ORR, W.C. (1993) Oxidative stress and aging. *Biologie prospective. Comptes rendus du 8<sup>e</sup> Colloque de Pont-à-Mousson*. (GALTEAU, M.M., SIES, G., HENNY, J; LIBBEY, J. Eds.), 513-518, Eurotext (PARIS)
- SOHAL, R.S., AGARWAL, A., AGARWAL, S. & ORR, W.C. (1995) Simultaneous overexpression of copper- and zinc-containing superoxide dismutase and catalase retards age-related oxidative damage and increases metabolic potential in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 15671-15674
- SOLÉ, M., PORTE, C. & ALBAIGÉS, J. (1995a) The use of biomarkers for assessing the effects of organic pollution in mussels. *The Science of the Total Environment* **159**, 147-153
- SOLÉ, M., PORTE, C. & ALBAIGÉS, J. (1995b) Seasonal variation in the mixed-function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **14**, 157-164
- SOLÉ, M., PORTE, C., BIOSCA, X., MITCHELMORE, C.L., CHIPMAN, J.K., LIVINGSTONE, D.R. & 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.). *Comparative Biochemistry and Physiology* **113C**, 257-265
- ST. CLAIR, D.K., OBERLEY, T.D., MUSE, K.E. & ST. CLAIR, W.H. (1994) Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation. *Free Radical Biology & Medicine* **16**, 275-282

- STEINMAN, H.M. (1985) Superoxide dismutases: protein chemistry and structure-function relationships. In *Superoxide Dismutase 1*, (OBERLEY, L.W. eds), 11-68, CRC Press (Boca Raton)
- STEINMAN, H.M., WEINSTEIN, L. & BRENOWITZ, M. (1994) The manganese superoxide dismutase of *Escherichia coli* K-12 associates with DNA. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 28629-28634
- SUN, Y., COLBURN, N.H. & OBERLEY, L.W. (1993) Decreased expression of manganese superoxide dismutase mRNA and protein after immortalization and transformation of mouse liver cells. *Oncology Research* **5**, 127-132
- SUTHERLAND, J. & MAJOR, C.W. (1981) Internal heavy metal changes as a consequence of exposure of *Mytilus edulis*, the blue mussel, to elevated external copper(II) levels. *Comparative Biochemistry and Physiology* **68C**, 63-67
- VASSEUR, P., DIVE, D., SOKAR, Z. & BONNEMAIN, H. (1988) Interactions between copper and some carbamates used in phytosanitary treatments. *Chemosphere* **17**, 767-782
- VIARENGO, A., CANESI, L., PERTICA, M., LIVINGSTONE, D.R., & ORUNESU, M. (1991a) Age-related lipid peroxidation in the digestive gland of mussels: the role of the antioxidant defence systems. *Experientia* **47**, 454-457
- VIARENGO, A., CANESI, L., PERTICA, M. & LIVINGSTONE, D.R. (1991b) Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology* **100C**, 187-190
- WAN, X.S., DEVALARAJA, M.N. & ST. CLAIR, D.K. (1994) Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA and Cell Biology* **13**, 1127-1136
- WDZIECZAK, J., ZALESNA, G., WUJEC, E. & PÉRÈS, G. (1982) Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology* **73B**, 361-365
- WEISIGER, R.A. & FRIDOVICH, I. (1973) Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *The Journal of Biological Chemistry* **248**, 4793-4796
- WENNING, R.J. DiGIULIO, R.T. & GALLAGHER, E.P. (1988) Oxidant-mediated biochemical effects of paraquat in the ribbed mussel, *Geukensia demissa*. *Aquatic Toxicology* **12**, 157-170
- WILHELM FILHO, D. & BOVERIS, A. (1993) Antioxidant defences in marine fish-II. Elasmobranchs. *Comparative Biochemistry and Physiology* **106C**, 415-418
- YIM, M.B., CHOCK, P.B. & STADTMAN, E.R. (1990) Copper,zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The USA* **87**, 5006-5010
- YOSHIOKA, T., HOMMA, T., MEYRICK, B., TAKEDA, M., MOORE-JARRET, T., KON, V. & ICHIKAWA, I. (1994) Oxidants induce transcriptional activation of manganese superoxide dismutase in glomerular cells. *Kidney International* **46**, 405-413

ZAMAN, K., MacGILL, R.S., JOHNSON, J.E., AHMAD, S. & PARDINI, R.S. (1994) An insect model for assessing mercury toxicity: effect of mercury on antioxidant enzyme activities of the housefly (*Musca domestica*) and the cabbage looper moth (*Trichoplusia ni*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **26**, 114-118

# **ANNEXES**

## Annexe n° 1 : Dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976)

Coomassie Brilliant Blue G-250 : 100 mg dans 50 ml d'éthanol à 95 %  
+ 100 ml d'acide phosphorique à 85 % (poids/volume)  
+ H<sub>2</sub>O q.s.p. 1 litre.

La préparation est filtrée sur 0,45 $\mu$ m.

Cette solution sera ajoutée à raison de 5 ml pour 100  $\mu$ l de solution étalon (SAB) ou d'échantillon dilué à doser. La gamme étalon de sérum albumine bovine va de 10 à 100  $\mu$ g dans 100 $\mu$ l.

Les mesures de densités optiques sont réalisées après dix minutes d'incubation du mélange et à 595 nm.

Annexe n° 2 : Compositions des solutions nécessaires à la coloration du gel

Révélation des protéines : laisser 30 min. dans la solution suivante

Bleu de Coomassie 0,02 %

Acide acétique 10 %

Isopropanol 25 %

puis rincer avec acide acétique 10 %

Tampon -TEMED- riboflavine

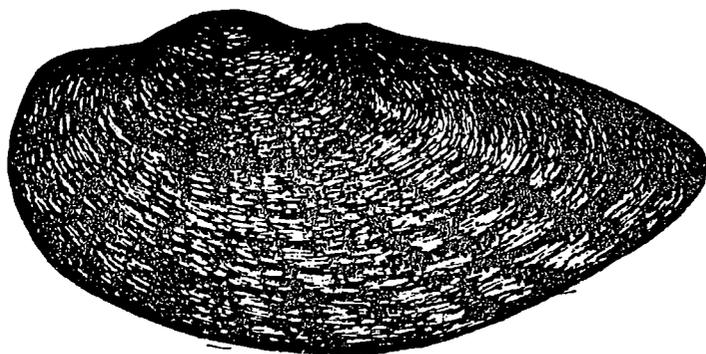
Tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7,8

TEMED 28 mM

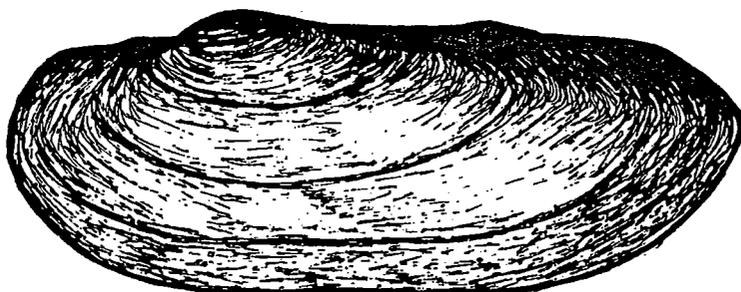
Riboflavine  $28 \times 10^{-3}$  mM

La solution de nitro bleu de tétrazolium (25 mg/100 ml) est préparée dans de l'eau distillée (préparation extemporanée, maintenir à l'obscurité).

Annexe n° 3 : Représentations de trois espèces d'Unio (Maaß, 1987)



*Unio tumidus* (longueur = 8 cm)



*Unio pictorum* (longueur = 9 cm)



*Unio crassus* (longueur = 6,5 cm)

Annexe n° 4 : Analyses réalisées sur la fraction inférieure à 1 mm des sédiments des deux sites témoins. Dans les deux sédiments, les pesticides organochlorés et les chlorophénols sont présents en quantités inférieures aux limites de détections.

	Site	Témoin 1	Témoin 2
<b>Paramètres physicochimiques</b>			
Matières sèches (%)		46,8	41,8
Carbone organique total (C) (g/kg M.S.)		31,3	35,8
<b>Hydrocarbures polycycliques aromatiques (µg/kg)</b>			
Fluoranthène		137	676
Benzo(b)fluoranthène		60	337
Benzo(k)fluoranthène		31	192
Benzo(a)pyrène		51	336
Benzo(ghi)pérylène		46	503
Indénopyrène		59	433
<b>Polychlorobiphenyls (PCB) (µg/kg M.S.)</b>			
PCB 28		< 0,15	< 0,15
PCB 52		< 0,25	< 0,25
PCB 101		< 0,15	< 0,15
PCB 118		< 0,15	< 0,15
PCB 138		0,69	< 0,10
PCB 153		0,47	< 0,10
PCB 180		< 0,05	< 0,05
<b>Métaux (mg/kg M.S.)</b>			
Arsenic (As)		1,7	12
Chrome total (Cr)		28,1	58,5
Cuivre (Cu)		6,7	16
Cadmium (Cd)		0,4	0,14
Plomb (Pb)		13,4	21,3
Mercure (Hg)		0,02	< 0,01
Nickel (Ni)		26,7	29,8
<b>Pesticides organochlorés (µg/kg M.S.)</b>			
Hexachlorobutadiène	< 0,05		
Hexachlorobenzène	< 0,05		
Aldrine	< 0,25		
Dieldrine	< 0,25		
Endrine	< 0,25		
OP' DDD	< 0,25		
PP' DDD	< 0,25		
OP' DDE	< 0,25		
PP' DDE	< 0,25		
OP' DDT	< 0,25		
PP' DDT	< 0,25		
1,2 Dichlorobenzène	< 0,5		
1,3 Dichlorobenzène	< 0,5		
1,4 Dichlorobenzène	< 0,5		
1,2,3 Trichlorobenzène	< 0,2		
1,2,4 Trichlorobenzène	< 0,2		
1,3,5 Trichlorobenzène	< 0,2		
<b>Chlorophénols (µg/kg M.S.)</b>			
2,3-Dichlorophénol		< 5	
2,4-Dichlorophénol		< 5	
2,5-Dichlorophénol		< 5	
2,6-Chlorophénol		< 5	
3,4-Dichlorophénol		< 5	
3,5-Dichlorophénol		< 5	
2,4,5-Trichlorophénol		< 10	
2,4,6-Trichlorophénol		< 5	
Pentachlorophénol		< 5	

Annexe n° 5 : Composition du milieu LC (Lefevre-Czarda) d'après la norme AFNOR  
T 90304, (1980)

Eléments	Concentrations (mg/l)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$	40
$\text{KNO}_3$	100
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	30
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	40
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,015
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$	0,03
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,03
$\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	0,03
$\text{Mn}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$	0,03
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2, \text{H}_2\text{O}$	0,03
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,03
$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7, 5\text{H}_2\text{O}$	0,8125
$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,3125
$\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$	0,3125

Annexe n° 6 : Activités spécifiques et totales de moules originaires du site témoin 2 restées libres, encagées sur place ou encagées et transférées pendant quinze jours dans le site témoin 1.

Libres Site témoin 2	Activités spécifiques						Activités totales		
	S12000			C12000					
	m	±	s	m	±	s	m	±	s
F+	133	±	11	130	±	23	3509	±	112
F+	78	±	8	90	±	5	3843	±	132
F+	102	±	11	96	±	12	3287	±	55
F+	92	±	7	50	±	5	1752	±	25
F+	190	±	10	131	±	10	5864	±	165
F+	108	±	12	99	±	8	2808	±	176
F+	115	±	6	91	±	14	2466	±	20
F+	126	±	17	96	±	6	3131	±	178
M	132	±	10	85	±	2	3365	±	81
M	141	±	11	108	±	7	6243	±	346
M	140	±	10	105	±	7	3573	±	376
M	143	±	12	102	±	12	5132	±	340
M	109	±	4	116	±	27	3666	±	113
M	105	±	1	81	±	2	3103	±	149
M	109	±	7	95	±	5	4081	±	199
M	100	±	8	84	±	5	3302	±	97
<b>m ± s</b>	<b>120</b>	<b>±</b>	<b>27</b>	<b>97</b>	<b>±</b>	<b>21</b>	<b>3695</b>	<b>±</b>	<b>1009</b>

Encagées Site témoin 2	Activités spécifiques						Activités totales		
	S12000			C12000					
	m	±	s	m	±	s	m	±	s
F+	115	±	11	93	±	6	4197	±	482
F+	137	±	30	95	±	7	3834	±	934
F+	110	±	5	76	±	4	3039	±	145
F+	83	±	4	84	±	8	1764	±	36
F+	106	±	18	116	±	5	2448	±	384
F+	82	±	6	72	±	6	2475	±	208
F+	81	±	12	80	±	8	1961	±	129
F+	92	±	5	63	±	1	2955	±	127
F+	126	±	8	88	±	6	2585	±	39
F+	95	±	10	84	±	5	3478	±	348
F+	97	±	7	59	±	5	3025	±	49
M	129	±	6	105	±	7	2969	±	117
M	107	±	11	118	±	12	4129	±	163
M	158	±	10	99	±	0	4652	±	264
M	97	±	8	84	±	8	2609	±	216
M	103	±	11	83	±	5	2895	±	158
<b>m ± s</b>	<b>108</b>	<b>±</b>	<b>23</b>	<b>87</b>	<b>±</b>	<b>17</b>	<b>3064</b>	<b>±</b>	<b>768</b>

Encagées transférées site témoin 1	Activités spécifiques						Activités totales		
	S12000			C12000					
	m	±	s	m	±	s	m	±	s
F+	83	±	1	159	±	25	2204	±	191
F+	86	±	7	107	±	6	2732	±	162
F+	70	±	1	63	±	2	1393	±	55
F+	104	±	8	89	±	8	2478	±	230
F+	128	±	11	70	±	11	2333	±	53
F+	144	±	11	96	±	8	2049	±	231
F+	72	±	6	69	±	3	1151	±	22
F+	86	±	3	82	±	3	2188	±	64
F+	106	±	5	89	±	9	2118	±	26
F+	127	±	12	102	±	4	2379	±	90
F+	97	±	9	104	±	6	2362	±	105
M	147	±	17	109	±	13	4075	±	247
M	88	±	15	61	±	2	1447	±	93
M	92	±	2	63	±	1	3955	±	112
M	134	±	3	127	±	6	3872	±	48
M	98	±	4	102	±	9	3584	±	174
<b>m ± s</b>	<b>104</b>	<b>±</b>	<b>25</b>	<b>93</b>	<b>±</b>	<b>27</b>	<b>2520</b>	<b>±</b>	<b>819</b>

Activités spécifiques (U/mg protéine)

Activités totales (U/g poids frais)

m = moyenne

s = écart type

Les moyennes et écartypes sont calculés à partir de trois mesures pour chaque individus ou de 3 x 16 mesures par condition

Annexe n° 7 : Valeurs des activités spécifiques et totales obtenues sur *Unio tumidus* après intoxication au laboratoire pendant trois jours avec du cuivre (30 µg/l), du thiram (100 µg/l) ou un mélange des deux produits. Les mesures ont été effectuées sur les glandes digestives et sur les branchies. Les moyennes et écart-types sont calculés à partir de trois mesures pour chaque individu ou de quinze mesures par condition.

	Activités spécifiques (U/mg protéines)				Activités totales U/g poids frais	
	Glandes digestives		Branchies		Glandes digestives	Branchies
	S12000	C12000	S12000	C12000		
Témoins	m ± s	m ± s	m ± s	m ± s	m ± s	m ± s
	87 ± 11	92 ± 4	93 ± 6	108 ± 15	1894 ± 79	
	92 ± 5	95 ± 3	76 ± 4	61 ± 6	1566 ± 328	942 ± 219
	57 ± 5	47 ± 3	73 ± 18	66 ± 8	1416 ± 433	694 ± 285
	67 ± 4	81 ± 8	110 ± 13	68 ± 8	1975 ± 139	1081 ± 83
	86 ± 11	78 ± 8	84 ± 11	65 ± 7	1817 ± 137	892 ± 101
<i>m ± s</i>	<b>79 ± 15</b>	<b>79 ± 18</b>	<b>87 ± 17</b>	<b>73 ± 20</b>	<b>1734 ± 307</b>	<b>902 ± 190</b>
Témoins DMSO	77 ± 3	84 ± 8	102 ± 6	86 ± 13	2020 ± 220	1342 ± 255
	103 ± 22	96 ± 11	88 ± 8	67 ± 5	1825 ± 201	857 ± 22
	71 ± 6	78 ± 11	91 ± 6	81 ± 2	1871 ± 218	897 ± 109
	97 ± 16	63 ± 13	63 ± 6	73 ± 19	1465 ± 185	677 ± 207
	71 ± 4	77 ± 8	128 ± 36	42 ± 6	1378 ± 123	1220 ± 246
<i>m ± s</i>	<b>84 ± 17</b>	<b>80 ± 14</b>	<b>94 ± 26</b>	<b>70 ± 18</b>	<b>1712 ± 267</b>	<b>999 ± 260</b>
Cuivre 30 µg/l	53 ± 2	48 ± 1	80 ± 6	71 ± 3	1107 ± 288	712 ± 108
	77 ± 7	95 ± 5	114 ± 17	89 ± 24	1746 ± 204	851 ± 137
	105 ± 31	82 ± 7	99 ± 9	64 ± 6	1465 ± 304	1147 ± 143
	85 ± 12	95 ± 11	142 ± 3	83 ± 7	2138 ± 148	1367 ± 209
	94 ± 5	68 ± 4	68 ± 11	47 ± 2	2191 ± 92	1028 ± 162
<i>m ± s</i>	<b>83 ± 22</b>	<b>78 ± 19</b>	<b>101 ± 28</b>	<b>71 ± 18</b>	<b>1730 ± 370</b>	<b>1021 ± 235</b>
Thiram 100 µg/l	114 ± 6	109 ± 7	134 ± 4	91 ± 9	2096 ± 164	1370 ± 238
	70 ± 5	72 ± 7	93 ± 5	59 ± 9	1837 ± 261	910 ± 138
	68 ± 4	77 ± 12	51 ± 5	44 ± 11	1273 ± 408	609 ± 130
	96 ± 12	60 ± 4	77 ± 3	72 ± 4	1975 ± 564	836 ± 183
	51 ± 3	49 ± 3	63 ± 3	41 ± 1	983 ± 95	1084 ± 112
<i>m ± s</i>	<b>80 ± 24</b>	<b>74 ± 22</b>	<b>84 ± 30</b>	<b>61 ± 20</b>	<b>1633 ± 409</b>	<b>962 ± 254</b>
Cuivre + Thiram	84 ± 13	80 ± 10	143 ± 5	50 ± 10	2011 ± 368	1575 ± 180
	81 ± 5	78 ± 1	99 ± 10	91 ± 15	1391 ± 190	1156 ± 159
	141 ± 21	83 ± 6	95 ± 2	76 ± 5	1024 ± 266	896 ± 30
	86 ± 6	65 ± 6	73 ± 3	64 ± 16	1513 ± 113	898 ± 266
	86 ± 4	64 ± 4	120 ± 21	67 ± 9	1722 ± 81	1233 ± 226
<i>m ± s</i>	<b>95 ± 26</b>	<b>74 ± 9</b>	<b>106 ± 26</b>	<b>69 ± 17</b>	<b>1532 ± 325</b>	<b>1152 ± 254</b>

Annexe n° 8 : Activités spécifiques et activités totales mesurées sur glandes digestives et branchies d'*Unio tumidus*. Les moules ont été encagées et transférées en amont et en aval d'une cokerie. Trois individus qui provenaient du site témoin 1 ont été laissés sur place. La moyenne (m) et l'écart type (s) de trois dosages d'activité sont données pour chaque animal. Les moyennes et écart-types pour chaque condition sont calculés à

	Activités spécifiques (U/mg protéine)				Activités totales (U/g poids frais)			
	Glandes digestives		Branchies		Glandes digestives		Branchies	
	S12000	C12000	S12000	C12000				
	m ± s	m ± s	m ± s	m ± s	m ± s	s	m ± s	s
Site témoin 1	64 ± 5	72 ± 7	62 ± 3	90 ± 5	896 ± 45		599 ± 59	
	62 ± 6	74 ± 8	77 ± 7	78 ± 6	1911 ± 136		713 ± 58	
	78 ± 8	67 ± 6	72 ± 4	83 ± 9	880 ± 56		805 ± 58	
	<b>68 ± 9</b>	<b>71 ± 7</b>	<b>70 ± 8</b>	<b>84 ± 8</b>	<b>1229 ± 458</b>		<b>706 ± 94</b>	
Amont	67 ± 4	71 ± 3	82 ± 7	75 ± 2	1265 ± 87		1072 ± 61	
	63 ± 6	66 ± 4	103 ± 10	83 ± 4	1437 ± 84		996 ± 19	
	79 ± 10	70 ± 3	95 ± 20	59 ± 10	1343 ± 173		923 ± 114	
	<b>70 ± 10</b>	<b>69 ± 3</b>	<b>93 ± 15</b>	<b>72 ± 13</b>	<b>1348 ± 126</b>		<b>997 ± 86</b>	
Aval1	65 ± 7	67 ± 3	64 ± 6	70 ± 14	864 ± 37		623 ± 39	
	89 ± 10	73 ± 7	87 ± 10	78 ± 4	1421 ± 195		622 ± 62	
	62 ± 1	77 ± 9	100 ± 12	88 ± 12	1340 ± 133		1006 ± 82	
	<b>72 ± 14</b>	<b>72 ± 6</b>	<b>84 ± 18</b>	<b>79 ± 12</b>	<b>1208 ± 279</b>		<b>750 ± 186</b>	
Aval2	72 ± 3	75 ± 10	84 ± 10	71 ± 9	1492 ± 67		1085 ± 113	
	68 ± 4	78 ± 3	101 ± 7	64 ± 5	1637 ± 88		1070 ± 82	
	85 ± 5	62 ± 5	75 ± 10	76 ± 7	1710 ± 51		869 ± 84	
	<b>75 ± 8</b>	<b>72 ± 9</b>	<b>87 ± 13</b>	<b>70 ± 8</b>	<b>1613 ± 130</b>		<b>1008 ± 126</b>	

Annexe n° 9 : Activités spécifiques de la SOD mesurées dans les glandes digestives et branchies d'*Unio t.* exposés dans un cours d'eau pendant quinze jours ou un mois à des métaux, HAP et PCB . Les moyennes et écart-types sont calculés à partir de trois mesures par individu ou de 3 x n mesures pour chaque condition (avec n représentant le nombre d'individus étudiés).

Site	Activités spécifiques (U/mg protéines)							
	Glandes digestives				Branchies			
	S12000		C12000		S12000		C12000	
m ± s	m ± s	m ± s	m ± s	m ± s	m ± s	m ± s	m ± s	
Témoins 1 J0	82 ± 6	88 ± 4	100 ± 2	116 ± 6	86 ± 12	89 ± 7	60 ± 9	102 ± 18
	67 ± 4	77 ± 4	60 ± 9	102 ± 18	90 ± 13	101 ± 11	79 ± 16	134 ± 0
	58 ± 11	161 ± 16	90 ± 13	101 ± 11	79 ± 16	134 ± 0		
	67 ± 1	124 ± 5	79 ± 16	134 ± 0				
	<b>m ± s</b>	<b>68 ± 11</b>	<b>112 ± 35</b>	<b>83 ± 17</b>	<b>108 ± 18</b>			
Témoins 1 J15	79 ± 7	82 ± 1	81 ± 5	89 ± 2	86 ± 7	110 ± 4	72 ± 6	100 ± 11
	101 ± 2	115 ± 9	86 ± 7	110 ± 4	72 ± 6	100 ± 11	84 ± 4	102 ± 9
	83 ± 13	99 ± 8	84 ± 4	102 ± 9	91 ± 6	134 ± 14		
	82 ± 3	88 ± 10	91 ± 6	134 ± 14				
	<b>m ± s</b>	<b>86 ± 11</b>	<b>96 ± 15</b>	<b>83 ± 8</b>	<b>107 ± 18</b>			
Témoins 1 J30	87 ± 11	76 ± 7	63 ± 1	109 ± 12	77 ± 6	88 ± 8	74 ± 4	114 ± 5
	85 ± 12	80 ± 5	77 ± 6	88 ± 8	74 ± 4	114 ± 5	63 ± 12	91 ± 3
	81 ± 5	76 ± 9	82 ± 3	98 ± 15	82 ± 3	98 ± 15		
	83 ± 3	98 ± 17	82 ± 3	98 ± 15				
	<b>m ± s</b>	<b>84 ± 8</b>	<b>83 ± 13</b>	<b>72 ± 10</b>	<b>99 ± 13</b>			
Témoins 2 J30	84 ± 5	102 ± 8	78 ± 10	112 ± 5	82 ± 7	83 ± 3	89 ± 14	120 ± 14
	63 ± 8	61 ± 6	82 ± 7	83 ± 3	89 ± 14	120 ± 14	70 ± 6	88 ± 13
	91 ± 1	98 ± 4	89 ± 14	120 ± 14	70 ± 6	88 ± 13	86 ± 12	98 ± 14
	71 ± 4	74 ± 7	86 ± 12	98 ± 14	73 ± 3	83 ± 8		
	69 ± 4	104 ± 7	73 ± 3	83 ± 8				
<b>m ± s</b>	<b>76 ± 11</b>	<b>88 ± 19</b>	<b>80 ± 10</b>	<b>97 ± 17</b>				
Amont J15	95 ± 7	81 ± 5	87 ± 2	91 ± 7	63 ± 15	84 ± 4	102 ± 5	131 ± 15
	66 ± 5	89 ± 3	63 ± 15	84 ± 4	77 ± 5	135 ± 37	83 ± 8	75 ± 10
	70 ± 4	72 ± 4	102 ± 5	131 ± 15				
	66 ± 5	93 ± 16	83 ± 8	75 ± 10				
	<b>m ± s</b>	<b>74 ± 14</b>	<b>84 ± 11</b>	<b>82 ± 15</b>	<b>103 ± 30</b>			

Site	Activités spécifiques (U/mg protéines)							
	Glandes digestives				Branchies			
	S12000		C12000		S12000		C12000	
m ± s	m ± s	m ± s	m ± s	m ± s	m ± s	m ± s	m ± s	
Amont J30	78 ± 3	110 ± 3	67 ± 4	81 ± 1	63 ± 5	89 ± 15	94 ± 6	94 ± 4
	63 ± 5	89 ± 15	88 ± 5	141 ± 9	82 ± 15	148 ± 4	81 ± 17	108 ± 13
	82 ± 15	148 ± 4	81 ± 17	108 ± 13	76 ± 11	77 ± 6	82 ± 1	73 ± 3
	76 ± 11	77 ± 6	82 ± 1	73 ± 3				
	<b>m ± s</b>	<b>75 ± 11</b>	<b>106 ± 29</b>	<b>82 ± 12</b>	<b>100 ± 26</b>			
Amont J'15	86 ± 11	86 ± 3	82 ± 7	74 ± 5	93 ± 15	77 ± 6	69 ± 3	87 ± 7
	93 ± 15	77 ± 6	84 ± 6	46 ± 1	72 ± 6	70 ± 3	63 ± 5	88 ± 1
	72 ± 6	70 ± 3	63 ± 5	88 ± 1	58 ± 8	85 ± 8	87 ± 10	118 ± 7
	58 ± 8	85 ± 8	87 ± 10	118 ± 7				
	<b>m ± s</b>	<b>77 ± 17</b>	<b>79 ± 8</b>	<b>77 ± 11</b>	<b>83 ± 24</b>			
Aval 1 J15	100 ± 15	77 ± 3	95 ± 16	99 ± 8	82 ± 10	88 ± 3	92 ± 4	100 ± 5
	82 ± 10	88 ± 3	92 ± 4	100 ± 5	65 ± 4	75 ± 4	101 ± 7	99 ± 6
	65 ± 4	75 ± 4	101 ± 7	99 ± 6	88 ± 12	90 ± 4	86 ± 5	75 ± 1
	88 ± 12	90 ± 4	86 ± 5	75 ± 1				
	<b>m ± s</b>	<b>84 ± 16</b>	<b>82 ± 7</b>	<b>93 ± 9</b>	<b>111 ± 40</b>			
Aval 1 J30	90 ± 9	87 ± 8	88 ± 8	91 ± 8	66 ± 2	83 ± 5	103 ± 17	90 ± 6
	66 ± 2	83 ± 5	103 ± 17	90 ± 6	64 ± 3	72 ± 2	77 ± 3	75 ± 4
	64 ± 3	72 ± 2	77 ± 3	75 ± 4	65 ± 4	77 ± 8	75 ± 9	96 ± 5
	65 ± 4	77 ± 8	75 ± 9	96 ± 5				
	<b>m ± s</b>	<b>71 ± 12</b>	<b>80 ± 8</b>	<b>92 ± 19</b>	<b>98 ± 23</b>			
Aval 2 J'15	44 ± 4	46 ± 4	40 ± 1	40 ± 4	58 ± 15	58 ± 1	60 ± 14	59 ± 8
	58 ± 15	58 ± 1	48 ± 9	54 ± 7	44 ± 3	48 ± 5	48 ± 2	83 ± 5
	44 ± 3	48 ± 5	48 ± 2	83 ± 5	42 ± 4	44 ± 1	64 ± 10	73 ± 3
	42 ± 4	44 ± 1	64 ± 10	73 ± 3				
	<b>m ± s</b>	<b>47 ± 10</b>	<b>49 ± 7</b>	<b>52 ± 12</b>	<b>62 ± 16</b>			

Annexe n° 10 : Analyses réalisées sur la fraction inférieure à 1 mm des sédiments des cinq sites étudiés. Pour tous les sédiments, les pesticides organochlorés et les chlorophénols sont présents en quantités inférieures aux limites de détection.

Sites	Témoïn 1	Témoïn 2	Amont	Aval 1	Aval 2
<b>Paramètres physicochimiques</b>					
Matières sèches (%)	68,3	76,7	50,6	61,8	74,6
Carbone organique total (C) (g/kg M.S.)	18	12,4	93,1	44,9	40
<b>Hydrocarbures polycycliques aromatiques (µg/kg)</b>					
Fluoranthène	21,1	214	5781	5761	22882
Benzo(b)fluoranthène	2,49	97,5	2735	1990	11418
Benzo(k)fluoranthène	2,59	84,8	2587	536	383
Benzo(a)pyrène	6,79	272	7625	2774	3954
Benzo(ghi)pérylène	2,4	73,2	3072	2368	2115
Indénopyrène	2,4	80,5	2207	2322	1509
<b>Polychlorobiphenyls (PCB) (µg/kg M.S.)</b>					
PCB 28	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15
PCB 52	< 0,25	< 0,25	< 0,25	< 0,25	< 0,25
PCB 101	< 0,15	5,57	205	207	165
PCB 118	< 0,15	2,59	307	149	254
PCB 138	< 0,31	2,33	569	280	357
PCB 153	< 0,51	2,7	558	311	288
PCB 180	< 0,29	1,92	420	298	229
<b>Métaux (mg/kg M.S.)</b>					
Arsenic (As)	9,9	12,7	39,3	28,6	32,6
Chrome total (Cr)	11	17,5	34,4	77,8	73,6
Cuivre (Cu)	7,9	9,4	89,3	93,5	92,6
Cadmium (Cd)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Plomb (Pb)	8	11,2	254	198	163
Mercure (Hg)	< 0,05	< 0,05	0,96	18,4	0,52
Nickel (Ni)	16,4	19	40,6	56,3	70,8

<b>Pesticides organochlorés (µg/kg M.S.)</b>		<b>Chlorophénols (µg/kg M.S.)</b>	
Hexachlorobutadiène	<0,05	2,3-Dichlorophénol	< 5
Hexachlorobenzène	<0,05	2,4-Dichlorophénol	< 5
Aldrine	< 0,25	2,5-Dichlorophénol	< 5
Dieldrine	< 0,25	2,6-Chlorophénol	< 5
Endrine	< 0,25	3,4-Dichlorophénol	< 5
OP' DDD	< 0,25	3,5-Dichlorophénol	< 5
PP' DDD	< 0,25	2,4,5-Trichlorophénol	< 10
OP' DDE	< 0,25	2,4,6-Trichlorophénol	< 5
PP' DDE	< 0,25	Pentachlorophénol	< 5
OP' DDT	< 0,25		
PP' DDT	< 0,25		
1,2 Dichlorobenzène	< 0,5		
1,3 Dichlorobenzène	< 0,5		
1,4 Dichlorobenzène	< 0,5		
1,2,3 Trichlorobenzène	< 0,2		
1,2,4 Trichlorobenzène	< 0,2		
1,3,5 Trichlorobenzène	< 0,2		

**Biomarqueurs de stress oxydant chez les organismes aquatiques**

COSSU, C., DOYOTTE, A., JACQUIN, M.C. et VASSEUR, P.

Article accepté dans « Utilisation de Biomarqueurs en Ecotoxicologie », sous presse chez MASSON.

# **BIOMARQUEURS DE STRESS OXYDANT CHEZ LES ORGANISMES AQUATIQUES**

Carole Cossu,  
Aurélie Doyotte,  
Marie-Cécile Jacquin,  
Paule Vasseur

Centre des Sciences de l'Environnement, BP 4025, 57040 Metz. Cédex.

## **INTRODUCTION**

### **1ère partie**

#### **I. MECANISMES DE FORMATION ET EFFETS DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE**

- I.1 PRINCIPALES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE (ROS)
- I.2 SOURCES DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE
- I.3 SYSTEMES DE DEFENSE ANTIOXYDANTS
- I.4 EFFETS BIOLOGIQUES DES ESPECES REACTIVES
- I.5 DETECTION DES ESPECES REACTIVES ET DE LEURS EFFETS

### **2ème partie**

#### **II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE DES TRAVAUX RELATIFS AU STRESS OXYDANT CHEZ LES ORGANISMES AQUATIQUES.**

- II.1. FORMATION DES ESPECES REACTIVES ET EFFETS CHEZ LES ORGANISMES AQUATIQUES
- II.2. ACTIVITES ANTIOXYDANTES ENDOGENES CHEZ LES ORGANISMES AQUATIQUES
- II.3. REPONSE DES ORGANISMES AQUATIQUES AU STRESS OXYDANT INDUITS PAR LES POLLUANTS
- II.4. INTERET DES BIOMARQUEURS DE STRESS OXYDANT EN ECOTOXICOLOGIE. PERSPECTIVES DE RECHERCHE.

## **CONCLUSION**

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## INTRODUCTION

Le stress oxydant a été défini par Sies (1991) comme un *déséquilibre entre les systèmes prooxydants et antioxydants en faveur des premiers, et source d'effets toxiques potentiels*. Pour Halliwell (1987), le *stress oxydant implique la production d'espèces réactives de l'oxygène et est synonyme de dommages*.

Le terme d'"espèces réactives de l'oxygène" (communément appelées ROS) inclut les différentes formes actives de l'oxygène et les hydroperoxydes ainsi que les espèces radicalaires qui peuvent en être les initiateurs. Leur réactivité peut être à l'origine d'effets biologiques néfastes, inflammation, cancérogénèse et vieillissement cellulaire. Toutefois, la relation *réactivité - toxicité* n'est pas aussi simpliste. Comme Sies l'a sous-entendu par la notion de *potentialité des effets*, l'intervention d'espèces réactives ne s'accompagne pas systématiquement de toxicité. D'une part, certaines espèces réactives sont des intermédiaires de processus physiologiques normaux. D'autre part en cas de dysfonctionnement et de surproduction de ces espèces, celles-ci peuvent être neutralisées et les lésions initiales réparées et compensées. Ce n'est que lorsque ces systèmes de défense sont débordés que la toxicité se manifeste avec passage d'un état d'adaptation à un état de perturbation installé.

Le caractère ubiquitaire des processus oxydants et leur implication possible en tant que facteurs de toxicité ont suscité les recherches dans le domaine de l'écotoxicologie, d'abord dans les milieux aquatiques. Il s'agissait dans un premier temps d'étudier la nature des mécanismes oxydants et antioxydants chez les vertébrés et invertébrés aquatiques en établissant les analogies avec les systèmes trouvés chez les mammifères. Dans un deuxième temps, les objectifs ont été d'étudier la réponse de ces espèces à un stress oxydant ; puis d'étudier comment les systèmes antioxydants peuvent être affectés en milieux pollués.

La formation d'oxydants et le déficit en antioxydants étant des initiateurs potentiels de toxicité sont par principe des indicateurs précoces d'une agression toxique. La question posée actuellement est double : est-ce que les composantes des systèmes oxydants et celle des systèmes antioxydants peuvent constituer des biomarqueurs intéressants et utiles pour le contrôle des espèces aquatiques exposées aux polluants ? jusqu'à quel niveau leur variation peut-elle être compensée, à partir de quel stade celle-ci est-elle synonyme de toxicité ?

Cette étude bibliographique sur les travaux relatifs aux effets du stress oxydant chez les organismes aquatiques marins et dulçaquicoles permettra de faire le point sur l'état des connaissances encore embryonnaires sur le sujet et de discuter de ces questions, à défaut de pouvoir aujourd'hui apporter les réponses. Cette étude est précédée d'un rappel sur les mécanismes du stress oxydant, ses effets et les stratégies de défense développées par les organismes vivants, qui explique la finalité des recherches réalisées.

## 1ère PARTIE

### I. MECANISMES DE FORMATION ET EFFET DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE

#### I.1. ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE (ROS).

La notion d'espèces réactives est souvent associée à celle d'espèces radicalaires. Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules présentant un ou plusieurs électrons célibataires. Ces électrons sont facteurs d'instabilité et de réactivité, l'espèce radicalaire ayant tendance soit à capter un électron d'une autre molécule pour appairier son électron célibataire, soit à le céder. Des réactions d'oxydoréduction ou la formation de nouveaux radicaux dans le cadre de réaction en chaîne amplifiant le phénomène initial sont donc consécutifs à cette réactivité. En milieu aérobie, il peut se former des oxyradicaux et autres espèces réactives de l'oxygène.

En fait, la notion de réactivité dépasse le cadre des formes radicalaires : (i) des molécules excitées par absorption d'énergie pouvant présenter d'autres états que celui de radical libre, (ii) par ailleurs, toutes les espèces radicalaires ne sont pas systématiquement réactives, on distingue ainsi les radicaux fugaces ou réactifs des radicaux stables, selon que leur temps de demi-vie est inférieur ou supérieur à  $10^{-3}$ s . La nature de l'atome sur lequel est centré l'électron célibataire, la délocalisation de ce dernier et l'encombrement stérique autour du centre radicalaire sont les facteurs influençant la stabilité.

Dans les milieux biologiques, les molécules réactives peuvent attaquer les constituants cellulaires, protéines, lipides, polysaccharides, acides nucléiques et entraîner une destructuration et un dysfonctionnement des systèmes au niveau desquels ils interviennent.

La diffusibilité d'une espèce réactive est une notion également importante : une espèce extrêmement instable aura des effets qui seront localisés aux sites même de sa formation. Une espèce moins réactive aura un rayon de diffusion plus étendu et sera capable d'endommager des constituants cellulaires éloignés de l'environnement où elle a été formée.

L'**oxygène moléculaire**,  $O_2$ , est lui même un biradical avec deux électrons non appariés sur ses orbitales externes. Mais ces électrons célibataires à spin parallèles ont un nombre quantique de spin identique ce qui confère à la molécule sa stabilité et sa faible réactivité. En effet la réduction complète de  $O_2$  qui mobilise 4 électrons, ne peut se faire en une seule étape qui nécessiterait l'apport d'une paire d'électrons eux aussi à spin parallèles. Compte tenu de cette "restriction de spin", la réduction de l'oxygène se fait plus facilement un électron à la fois (figure I.1). La capacité des métaux de transition à céder ou à accepter un électron explique leur présence sur le site actif de beaucoup d'oxydases et de monooxygénases et aussi leur implication dans les dommages oxydatifs en catalysant la formation des intermédiaires réactifs dans la réduction de l'oxygène.

L'oxygène existe sous des formes beaucoup plus réactives :

- l'**oxygène singulet**  $^1O_2$ , formé lors de réactions photochimiques et de thermolyse des endoperoxydes. L'énergie absorbée permet l'inversion de spin de l'un des électrons célibataires et leur recombinaison. Deux états d'excitation existent : (1) l'état delta ( $O_2^1\Delta_g$ ) qui n'a pas d'électrons impairs et n'est pas un radical. Par sa durée de vie relativement longue et son caractère diffusible, cet oxygène singulet peut être responsable de graves dommages cellulaires, à l'ADN en particulier (2) l'état sigma ( $O_2^1\sigma_g$ ), radicalaire, qui se dégrade rapidement en la forme delta. L'oxygène singulet est formé au niveau des pigments

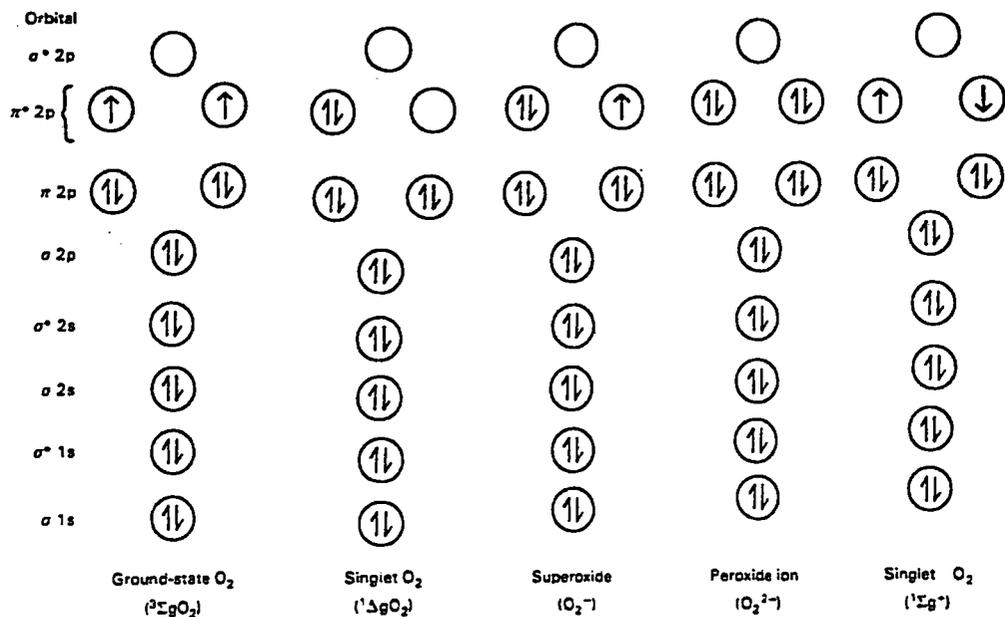


Fig. 1. Bonding in the diatomic oxygen molecule

Figure 1: Configuration des orbitales de la molécule d'oxygène diatomique (d'après Halliwell et Gutteridge, 1984)

→ Barry Halliwell, Department of Biochemistry  
University of London King's College  
Strand, London WC2R 2LS, UK.

→ John M.C Gutteridge, National Institute of Biological Standards  
Holly Hill, Hampstead, London NW3 5RB, UK.

biologiques, chlorophylles, rétinol, flavines et porphyrines lors de leur illumination en présence d'O<sub>2</sub>.

- l'**anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup>** qui résulte de la capture d'un électron par la molécule O<sub>2</sub> lors de réactions endergoniques. O<sub>2</sub><sup>-</sup> est formé physiologiquement par les cellules phagocytaires pour la destruction des particules étrangères et des complexes immuns (Babior, 1978). Il peut aussi être produit lors de réactions d'oxydations enzymatiques ou spontanées. Il est formé essentiellement au niveau des membranes biologiques, compte tenu de la solubilité beaucoup plus élevée de l'oxygène en milieu hydrophobe qu'en milieu aqueux. (Gutteridge et Halliwell, 1993)

O<sub>2</sub><sup>-</sup> n'est pas la plus réactive des formes activées de l'oxygène. Il l'est suffisamment cependant pour endommager les cibles cellulaires, directement ou par l'intermédiaire des autres formes radicalaires qu'il engendre. Très stable en milieu hydrophobe, il contribue à la destruction des phospholipides membranaires par attaque nucléophile des liaisons esters entre les acides gras et le glycérol.

Il se dismute en donnant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais la réaction de dismutation est fortement accélérée en présence d'enzymes appelées superoxydes dismutases (Fridovich, 1975).

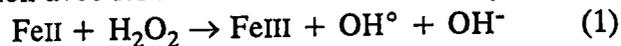
O<sub>2</sub><sup>-</sup> peut se comporter comme un *oxydant* en particulier en présence de centres cationiques tels que (1) protons qui produisent HO<sub>2</sub><sup>-</sup> catalyseur de l'oxydation des acides gras polyinsaturés (Bielski *et al.* 1983) ou (2) métaux de type Mn ou V, qui catalysent des réactions d'oxydation radicalaires en chaîne conduisant par exemple à l'oxydation de nombreuses molécules de NAD(P)H (Liochev et Fridovitch, 1989).

O<sub>2</sub><sup>-</sup> peut aussi être *réducteur*, comme dans le cas des métaux de transition FeIII ou CuII, même insérés dans le site actif des enzymes.

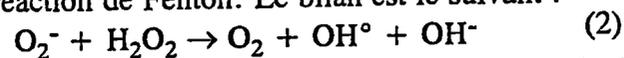
- Le **peroxyde d'hydrogène, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**, formé par dismutation de l'anion superoxyde et par addition d'un second électron sur l'anion superoxyde en donnant l'ion peroxyde O<sub>2</sub><sup>2-</sup>. Cet ion qui n'est pas un radical, est protoné immédiatement en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au pH physiologique, compte tenu du pKa très élevé de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est modérément réactif mais il est très diffusible et franchit les barrières membranaires. Sa concentration intracellulaire est très faible entre 0,001 et 0,1 μM (Sies, 1981), mais peut atteindre des taux très supérieurs localement, dans les mitochondries et les peroxyosomes (Boveris *et al.* 1972).

- le **radical hydroxyle OH°**, résultant de la fission homolytique de la liaison O-O dans la molécule H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Il est produit par réaction thermique, radiations ionisantes ou par réaction de type Fenton (1894) *in vitro* en présence de métaux de transition sous forme réduite. L'équation de la réaction avec les ions ferreux comme catalyseur est la suivante :



La mise en jeu *in vivo* de la réaction de Fenton a longtemps fait l'objet de controverse. Actuellement, la production du radical hydroxyle *in vivo* à partir de O<sub>2</sub><sup>-</sup> et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selon la réaction d'Haber Weiss catalysée par des métaux de transition (2) est quasiment admise. La première étape est la réduction du métal par l'anion superoxyde ; la deuxième étape fait intervenir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par réaction de Fenton. Le bilan est le suivant :



Cette réaction est inhibée par chélation du métal, notamment par la desferrioxamine dans le cas du ferIII. Mais elle peut avoir lieu en présence de Fe(III)-EDTA (McCord et Day, 1978) et d'autres chélateurs physiologiques comme l'ATP, l'ADP, même s'ils n'apparaissent pas indispensables à la réaction aux concentrations physiologiques des sels de fer (μM) (Gutteridge et Halliwell, 1993).

$\text{OH}^\circ$  est extrêmement réactif et réagit avec les premières cibles rencontrées. Sa diffusion très faible l'a fait considérer comme peu dangereux par certains auteurs. A tort, puisqu'il peut être généré dans différents sites cellulaires à partir d' $\text{O}_2^-$  et de  $\text{H}_2\text{O}_2$  qui sont des espèces plus diffusibles car moins réactives.

Le radical hydroxyl peut attaquer tous types de constituants cellulaires (1) par addition sur la molécule cible, comme dans le cas des bases puriques et pyridiques des acides nucléiques, (2) par arrachage d'un atome d'hydrogène, ce qui peut initier la lipoperoxydation des acides gras insaturés et la dégradation des acides aminés et (3) par transfert d'électrons.

- **hydroperoxy radicaux**, produits lors de la lipoperoxydation.

La peroxydation des lipides membranaires peut être initiée par l'attaque des acides gras insaturés des phospholipides (figure I.2) par toute molécule suffisamment réactive pour leur arracher un atome d'hydrogène en  $\alpha$  d'une double liaison (allylique). Le départ de l'hydrogène, entité à un électron, laisse un carbone avec un électron impair. Ce radical carboné des acides gras polyinsaturés tend à se stabiliser par réarrangement interne en donnant un diène conjugué qui réagira avec  $\text{O}_2$  pour donner un radical hydroperoxyl. Ces radicaux hydroperoxyl pourront eux-mêmes arracher l'hydrogène d'autres molécules lipidiques, qui, radicalisées à leur tour, réagiront de proche en proche et propageront le processus de la lipoperoxydation. Le processus peut être amplifié par les complexes organiques du ferII qui décomposent les lipides hydroperoxydés ( $\text{L-O}_2\text{H}$ ) en radicaux alkoxy ( $\text{L-O}^\circ$ ). Les complexes de FeII avec l'ADP et les phosphates tout comme les protéines hémiques (hème, méthémoglobine, peroxydase, cyt P450) et les protéines à fer non hémique (Halliwell et Gutteridge, 1984) peuvent ainsi propager la lipoperoxydation *in vivo*. Les protéines qui séquestrent le fer comme la transferrine et la ferritine ne participent pas au processus tant que leur capacité de fixation du fer n'est pas dépassée.

La lipoperoxydation est initiée principalement par les radicaux hydroxyls  $\text{OH}^\circ$  (Fong *et al.*, 1973). L'anion superoxyde n'est pas suffisamment réactif pour initier le processus, mais y participe indirectement avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  en tant que précurseur de  $\text{OH}^\circ$ .

## I.2. SOURCES DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE.

Les réactions radicalaires jouent un rôle important dans les systèmes biologiques car elles interviennent dans les réactions métaboliques normales et la production d'énergie. Les espèces réactives sont des intermédiaires clés dans la respiration cellulaire, la photosynthèse, la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes, et l'activité phagocytaire. Les enzymes comme la xanthine oxydase et la tryptophane dioxygénase sont reconnues pour produire  $\text{O}_2^-$ , la prostaglandine synthétase, la guanylcyclase et la glucose oxydase pour former  $\text{OH}^\circ$ . Le système des monooxygénases associées au cytochrome P450 présente aussi un puissant potentiel de production d'espèces réactives, en particulier par autooxydation de l'oxycytochrome P450 réduit. La production d'oxyradicaux peut être augmentée par l'induction des cytochromes P450.

Dans d'autres cas, la formation d'espèces réactives est consécutive à la métabolisation de substances exogènes et à l'autooxydation spontanée des métabolites réduits. Les substances se comportant comme des systèmes redox, réduites par voie enzymatique par réduction à 1 électron peuvent ensuite transférer cet électron à l'oxygène moléculaire en l'activant sous forme de radical superoxyde. Les dérivés de structure quinonique, les dérivés aromatiques,

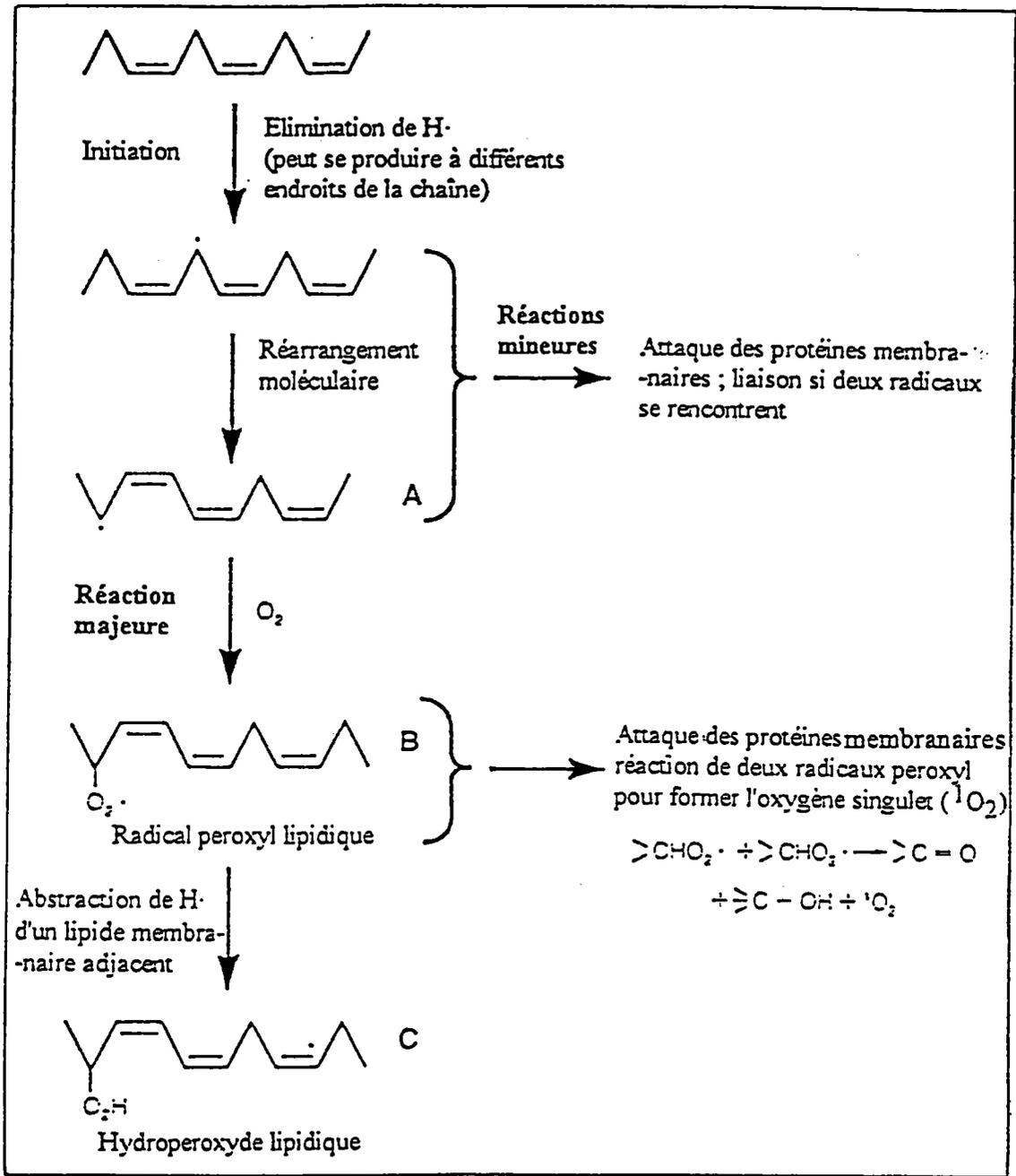


Figure 12: Mécanisme de la lipoperoxydation. (Gutteridge & Halliwell, 1990)

nitroaromatiques et hydroxylaminés, les diazoïques et les métaux de transition rentrent dans cette catégorie (Kappus, 1987).

Par un mécanisme de deshalogénéation réductrice catalysée par le cytochrome P450, les dérivés halogénés peuvent aussi générer des métabolites radicalaires, à l'origine de la peroxydation lipidique, soit directement, soit après réaction avec l'oxygène.

Qu'ils soient physiologiquement utiles ou fortuits, ces processus doivent être étroitement contrôlés ; la production des intermédiaires physiologiques est étroitement réglée en fonction des besoins et canalisée pour éviter tout dommage cellulaire. Ainsi, la formation d'anions superoxydes lors du transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale ne dépasserait pas 1 à 2 % du processus global de réduction (Mc Cord, 1983).

Toutefois, les dommages oxydatifs sont inévitables dans un environnement oxygéné où la vie n'est possible qu'avec la protection d'antioxydants situés en des points stratégiques et celle des systèmes de réparation et de remplacement des cibles endommagées.

De sorte qu'un dysfonctionnement des mécanismes de contrôle des réactions physiologiques ou la surproduction d'espèces réactives ne présentera des effets néfastes que lorsque les capacités antioxydantes sont dépassées et les systèmes de réparation et de compensation devenus inopérants.

### I.3. SYSTEMES DE DEFENSE ANTIOXYDANTS.

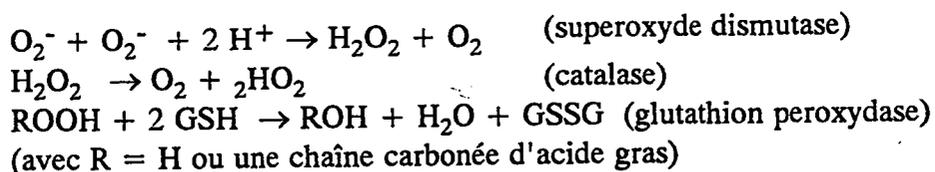
Les trois principaux mécanismes d'action antioxydante développés par les organismes vivants visent à (1) éliminer les espèces réactives et les catalyseurs de leur formation, (2) induire la synthèse des antioxydants, (3) augmenter l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées.

La formation des ROS peut être inhibée par quatre moyens différents visant à :

- éliminer les métaux catalyseurs de la formation de  $\text{OH}^\circ$  en les séquestrant par des métalloprotéines. La transferrine au niveau extracellulaire et la ferritine intracellulaire jouent ce rôle pour le fer chez les mammifères, ainsi que la céruléoplasmine et les "cupréines" pour le cuivre.

- inactiver les intermédiaires clés  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  à l'aide d'enzymes.
- capter les radicaux initiateurs de dommages cellulaires à l'aide de molécules pièges.
- casser la propagation des réactions en chaîne.

\* Trois types d'enzymes antioxydantes majeures sont mises en oeuvre pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène : superoxydes dismutases (SOD), glutathion peroxydases et catalase ; ces enzymes agissent de manière coordonnée et selon les réactions suivantes :



Les superoxydes dismutases (SOD) comprennent un métal de transition (Fe, Mn, ou Cu) au niveau de leur site actif. Dans la réaction de dismutation, l'ion métallique capte un électron de l'anion superoxyde et le transfère au noyau imidazole de l'une des histidine du site actif.

CuZnSOD a été la première de ces enzymes isolée en 1968 par Mc Cord et Fridovitch dans les érythrocytes de bovins. MnSOD et FeSOD ont été découvertes ensuite .

Mn SOD est présente chez les bactéries et chez les eucaryotes au niveau de la matrice mitochondriale. Fe SOD est trouvée chez les bactéries mais aussi chez certaines plantes.

MnSOD et FeSOD présentent d'étroites analogies structurales. Cependant MnSOD est inductible par l'anion superoxyde à la différence de FeSOD. L'induction de MnSOD chez les procaryotes met en jeu un locus appelé *soxR* régulon (réponse superoxyde) qui contrôle la transcription de neuf gènes impliqués dans la synthèse d'enzymes pour la production de NADPH, la réparation de l'ADN, la synthèse protéique et la perméabilité membranaire (Harris, 1992).

CuZnSOD constitue un groupe d'enzymes structurellement très différent. Le zinc n'a pas d'activité catalytique et sert à stabiliser le site actif. Ces enzymes sont présentes dans le compartiment cytosolique et ont été détectées dans les peroxyosomes, les lysosomes et le noyau des cellules eucaryotes (Beyer *et al.*, 1991). Elles ont été trouvées dans les organismes animaux, vertébrés, invertébrés aquatiques et terrestres ainsi que chez les plantes au niveau chloroplastique et cytosolique. Leur présence chez les bactéries (photobacterium...) est exceptionnelle.

Une CuZnSOD extracellulaire a été identifiée récemment (Marklund, 1982). Son rôle serait de protéger les parois endothéliales vis à vis de  $O_2^-$  et  $H_2O_2$  émis par les phagocytes.

Ces superoxydes dismutases sont toutes inactivées réversiblement par élimination du métal du site actif, sous l'influence de chélateurs par exemple. FeSOD et CuZnSOD sont inhibées par  $H_2O_2$  (Yim *et al.* 1990). CuZnSOD est également inhibée par les cyanures à la différence de Mn SOD. L'activité de la MnSOD sera perturbée à pH 9 tandis que la stabilité de CuZnSOD est indépendante du pH (Beyer *et al.*, 1991).

L'inhibition ou la déficience génétique des activités superoxydes dismutases se traduit toujours par une sensibilité accrue aux oxydants. Cela s'accompagne chez certains mutants bactériens par une croissance réduite et un taux de mutagenèse élevé. Chez les organismes supérieurs, la viabilité et la reproduction sont perturbés (Beyer *et al.*, 1991 ; Harris, 1992).

La **glutathion peroxydase sélénium-dépendante** (SeGPx), découverte par Mills en 1957 dans les érythrocytes bovins, catalyse la réduction glutathion-dépendante de nombreux peroxydes allant du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) aux peroxydes organiques (ROOH).

La SeGPx est une métalloenzyme tétramérique (80000 daltons) dont chaque sous unité contient 1 atome de sélénium sous forme d'un résidu sélélocystéine. Le sélénium d'origine exogène serait incorporé dans le site actif de l'enzyme par un ARN de transfert sélélocystéine spécifique (Spallholz et Boylan, 1991). L'enzyme est localisée dans le cytosol et dans la matrice mitochondriale.

Un déficit en sélénium entraîne une diminution d'activité qui est associée à l'apparition de nécroses et de réactions inflammatoires.

Les inhibiteurs les plus connus de l'activité enzymatique de la SeGPx sont d'une part les thioloxydes tels que le cadmium, le plomb, des composés organiques comme la N-éthylmaléimide ou le Triton X d'autre part.

Il existe une autre séléno-glutathion peroxydase découverte par Ursini *et al.* en 1982 dans le foie de porc : la phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase (PLGPx). Le rôle principal de cette enzyme cytosolique monomérique (22000 daltons) est la protection des liposomes et des biomembranes contre les dommages peroxydatifs. Elle diffère de l'enzyme précédente par son exigence moins stricte en sélénium et son inhibition spécifique par l'iodacétate (Spallholz et Boylan, 1991).

En 1976, Lawrence et Burk ont découvert l'existence d'une **glutathion peroxydase sélénium indépendante** qui ne peut réduire que les peroxydes organiques. Cette enzyme serait en fait une glutathion transférase ayant une activité peroxydasique qui présente la particularité d'être activée en présence de N-éthylmaléimide à la différence de SeGPx. C'est un dimère de 50000 daltons localisé majoritairement dans les microsomes.

Le maintien d'une activité glutathion peroxydasique implique le recyclage NADPH-dépendant du glutathion réduit (GSH) par une **glutathion réductase** ; le NADPH étant produit par la voie des pentoses phosphates. Cette enzyme est une flavoprotéine dimérique. Elle est contrôlée par le régulon *oxy R* au niveau bactérien. Chez les eucaryotes, l'enzyme peut être autorégulée par modification covalente contrôlée par des espèces redox comme le NADPH ; la glutathion réductase est alors sous forme réduite inactive (Lopez-Barea *et al.*, 1991).

La **catalase** est une hémoprotéine tétramérique (240000 daltons) avec un atome de fer par sous-unité. Cette enzyme catalyse la réduction d' $H_2O_2$  en eau et en oxygène moléculaire. Sa localisation peroxysomale en fait une enzyme antioxydante complémentaire de la SeGPx contre la peroxydation induite par le peroxyde d'hydrogène.

L'activité catalasique est présente chez les mammifères, les vertébrés et invertébrés aquatiques et les procaryotes. Au niveau bactérien, elle est contrôlée par le régulon *oxy R* qui est inductible par  $H_2O_2$  et contrôle simultanément des arylperoxydases et la glutathion réductase (Harris, 1992).

\* Des **antioxydants non enzymatiques**, agissant comme réducteurs ou capteurs de radicaux, viennent renforcer l'action des enzymes précédentes.

Parmi les réducteurs à fonction thiol libre, deux substances jouent un rôle important :

- le **glutathion** (tripeptide  $\gamma$  glutamyl-cystéinyl-glycine) est le thiol non protéique le plus abondant dans les organismes vivants. Il est présent majoritairement à l'état réduit (GSH) dans les cellules ; une augmentation de la forme oxydée (GSSG) traduit un stress oxydant. Il agit comme donneur d'électrons permettant de désactiver les espèces réactives comme  $OH^\circ$  et les radicaux phénoxy, mais surtout comme substrat des glutathion peroxydases pour la réduction des peroxydes. Il intervient aussi dans la conjugaison des substances électrophiles catalysée par des glutathion-transférases.

- l'**acide lipoïque**, impliqué dans la formation de l'acétyl coenzyme A à partir du pyruvate est sous sa forme réduite un réducteur puissant, capable de réduire le glutathion et les radicaux peroxydes, et de désactiver l'oxygène singulet.

Des capteurs d'oxyradicaux existent au sein des membranes biologiques pour piéger les espèces radicalaires dès leur formation, interrompre les réactions en chaîne et empêcher la lipoperoxydation. Ainsi,  $O_2^-$  et  $OH^\circ$  peuvent être piégés par les dérivés suivants :

-  **$\alpha$  tocophérol** (vitamine E), antioxydant puissant qui fournit un atome d'hydrogène aux espèces radicalaires et se retrouve lui-même sous forme d'un radical moins instable ; il est régénéré à l'interface membrane/cytosol par l'**ascorbate** (vitamine C) qui est le relais de l' **$\alpha$  tocophérol** au niveau cytosolique,

-  **$\beta$  carotène** (vitamine A) et les **caroténoïdes** en général, dont l'intérêt supplémentaire est de désactiver l'oxygène singulet,

- **ubiquinol** au niveau des membranes mitochondriales.

D'autres dérivés naturels comme les **flavonoïdes** sont également des capteurs de radicaux ; ajoutons aussi l'**urée**, la **thiourée**, le **mannitol**, le **DMSO** qui sont surtout utilisés *in vitro*.

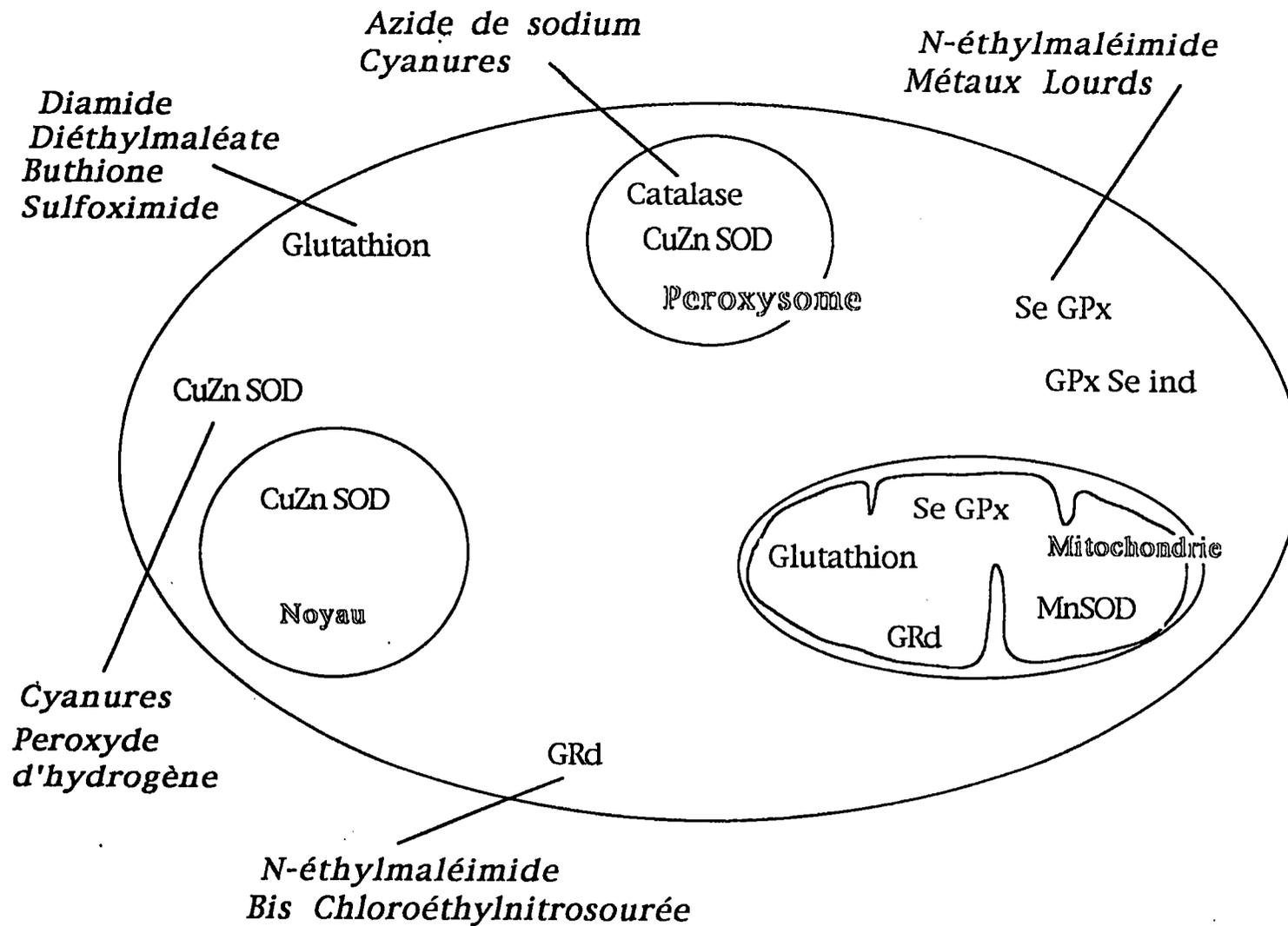
En résumé, un stress oxydant pourra être induit lors de la surproduction d'espèces réactives et/ou par suite de l'inhibition des systèmes antioxydants qui peuvent être inactivés soit directement soit par défaut de synthèse. Par exemple les thioloprives comme le diéthylmaléate (DEM), le diamide en bloquant la fonction thiol libre du glutathion inhibent son activité ; la buthionine sulfoximide (BSO) en inactivant la glutathion synthétase est aussi à l'origine de stress oxydant par déficit en glutathion (figure I.3).

#### I.4. EFFETS BIOLOGIQUES DES ESPECES REACTIVES.

Les espèces réactives lorsqu'elles sont générées en quantités importantes débordant les systèmes de protection et de réparation, peuvent exercer leur toxicité sur l'ensemble des constituants cellulaires, lipides, protéines, acides nucléiques et polysaccharides (figure I.4). La peroxydation des acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires entraîne un déficit des fonctions membranaires, avec diminution de la fluidité des membranes, inactivation des récepteurs et des enzymes situés à leur niveau (Snell et Mullock, 1991), augmentation de la perméabilité, aux ions calciques en particulier (Gutteridge et Halliwell, 1990). Dans les mitochondries, la lipoperoxydation se traduit par un gonflement puis une lyse de ces organites ; il en est de même pour les lysosomes dont la rupture peut s'accompagner de la libération d'enzymes catalysant l'hydrolyse des protéines, des acides nucléiques et des polysaccharides cellulaires (Horton et Fairhurst, 1987 ; Snell et Mullock, 1991; Pré, 1991).

Les intermédiaires radicalaires avec les aldéhydes issus de la décomposition des hydroperoxydes lipidiques sont responsables de la cytotoxicité liée à la lipoperoxydation. Les aldéhydes en raison de leur extrême réactivité, de leur longue durée de vie et de leur capacité de diffusion, doivent être considérés en fait comme des "messagers toxiques secondaires" plutôt que de simples produits terminaux du processus de lipoperoxydation. Le 4-hydroxynonanal et le malondialdéhyde en sont les représentants les plus réactifs et les plus abondants des aldéhydes formés *in vivo* : puissants alkylants, ils réagissent spontanément en formant des composés d'addition avec les résidus cystéinyl des protéines et du glutathion, ainsi que des bases de Schiff avec les groupements aminés des protéines. Le 4-hydroxynonanal est capable d'inhiber la synthèse des acides nucléiques et des protéines, et de bloquer la prolifération cellulaire (Benedetti *et al.*, 1982 ; Benedetti *et al.*, 1986 ; Esterbauer et Cheeseman, 1990 ; Esterbauer, 1993).

Les protéines peuvent être affectées par les espèces réactives sur plusieurs sites simultanément par suite de la vulnérabilité de certains groupes aminoacyles, méthionine et tryptophane, ou par suite de transferts radicalaires. Les protéines membranaires sont particulièrement sensibles aux radicaux alcoyle (RO·) et peroxy (ROO·) générés lors de la lipoperoxydation. Les conséquences de telles lésions peuvent être des agrégations, des pontages ou des fragmentations protéiques, se traduisant par la perturbation des transports ioniques, des activités enzymatiques et de l'homéostasie calcique. L'oxydation rendrait les protéines plus sensibles à la protéolyse enzymatique : il s'ensuivrait une hydrolyse accélérée des protéines endommagées, conduisant à la destruction de la molécule, voire à la dégradation tissulaire (Rice-Evans *et al.*, 1991). La présence de pigments fluorescents intracellulaires, *lipofuschine* ou *ceroid*, qui sont des concrétions de phospholipides, de triglycérides, de protéines, de polymères aldéhydiques et de métaux, zinc, cuivre et fer, serait aussi l'expression de processus de dégradation oxydative, intensifiés lors de la lipoperoxydation.



**Figure I.3 :** Répartition subcellulaire du glutathion et des enzymes antioxydantes avec leurs inhibiteurs

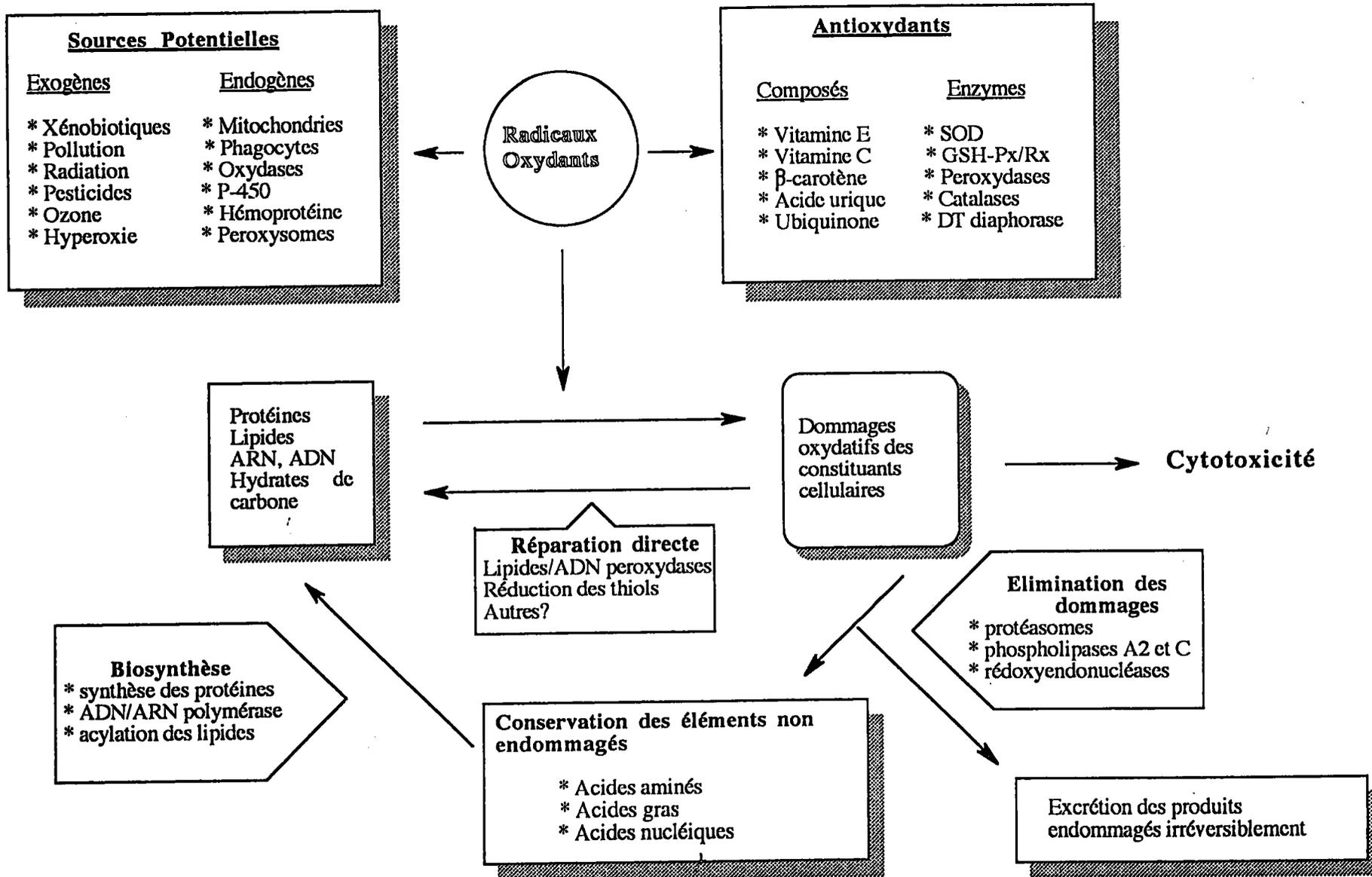


Figure I 4 : Principaux effets biologiques des espèces réactives et systèmes de défense antioxydants.

Les acides nucléiques sont également la cible des espèces réactives. Il est établi que les dommages à l'ADN résultant du stress oxydant sont impliqués dans le vieillissement, la cancérogénèse et les processus dégénératifs. L'anion superoxyde peut provoquer des coupures des brins d'ADN et des lésions des bases (figure I.5). Néanmoins, les formes réactives les plus génotoxiques sont le radical hydroxyl et l'oxygène singulet. Ces deux formes génèrent la oxo<sup>8</sup>dG (8-OHdG ou 7,8-dihydro-8oxo-2'deoxyguanosine) produite soit par dégradation d'un endoperoxyde instable formé par <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, soit à partir d'un adduit radicalaire résultant de la fixation de OH° en C8 de la guanine. La oxo<sup>8</sup>dG peut donner, après ouverture du cycle imidazole du noyau purine, le FapyGua (2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine). Oxo<sup>8</sup>dG et FapyGua constituent les empreintes spécifiques d'un stress oxydant sur l'ADN. Si la guanine est la cible majoritaire, les autres bases de l'ADN peuvent aussi être altérées et donner toute une variété de produits de dégradation. L'adénine comme la guanine peut être attaquée en C5, C4 et C8. La thymine peut former des thymines glycols et la 5-(hydroxyméthyl)uracil (Halliwell et Dizdaroglu, 1992). Une attaque radicalaire du déoxyribose par OH° peut aussi avoir lieu et conduire à l'élimination de la base qui lui est reliée avec formation d'un site abasique (apurinique ou apyrimidinique) ainsi qu'à des cassures de l'ADN.

Il existe des SYSTEMES DE REPARATION capables de reconnaître les cibles cellulaires endommagées. Par exemple les résidus méthionine des protéines, oxydés au niveau du soufre, peuvent être réparés par une méthionine sulfoxide réductase. Par contre, dans le cas d'autres acides aminés lésés par attaque radicalaire, les protéines apparaissent irréversiblement endommagées et doivent être éliminées de la cellule.

Des systèmes protéolytiques reconnaissent les protéines modifiées par les oxydants ; ils sont présents chez *E. coli*, dans le cytosol et dans les mitochondries des cellules mammifères (Kehrer, 1993). Cette capacité des cellules à dégrader les protéines anormales décroît avec l'âge.

Les systèmes impliqués dans la réparation des lésions oxydatives à l'ADN agiraient par un mécanisme classique d'excision-resynthèse, faisant intervenir successivement des ADN glycosylases qui existent les bases modifiées, des ADN endonucléases et exonucléases qui reconnaissent les sites abasiques et coupent le squelette de l'ADN à leur niveau, l'ADN polymérase et l'ADN ligase qui restituent une molécule d'ADN identique à son état initial. Il a été identifié récemment une formamidopyrimidine-ADN glycosylase (FPG) qui reconnaît oxo<sup>8</sup>dG, FapyGua et les sites abasiques. Oxo<sup>8</sup>dG étant mutagène et responsable de transversions G--T, il est important que cette lésion soit rapidement éliminée.

Le glutathion pourrait aussi intervenir pour corriger l'attaque radicalaire de OH° sur les bases de l'ADN.

Les effets pathologiques sont loin d'être clairs et dépendent beaucoup des tissus cibles et des espèces concernées (Stegeman *et al.*, 1992). Le rôle joué par les réactions radicalaires, l'oxydation des protéines, les dommages à l'ADN et la lipoperoxydation en pathologie fait l'objet d'un vif débat. S'il est établi que les radicaux libres sont impliqués dans de nombreux états pathologiques (figure I.4), la question est de savoir s'ils sont la cause majeure des atteintes tissulaires ou s'ils en sont la conséquence (Gutteridge et Halliwell, 1990 ; Rice-Evans *et al.*, 1991).

## I.5. DETECTION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE ET DE LEURS EFFETS BIOLOGIQUES

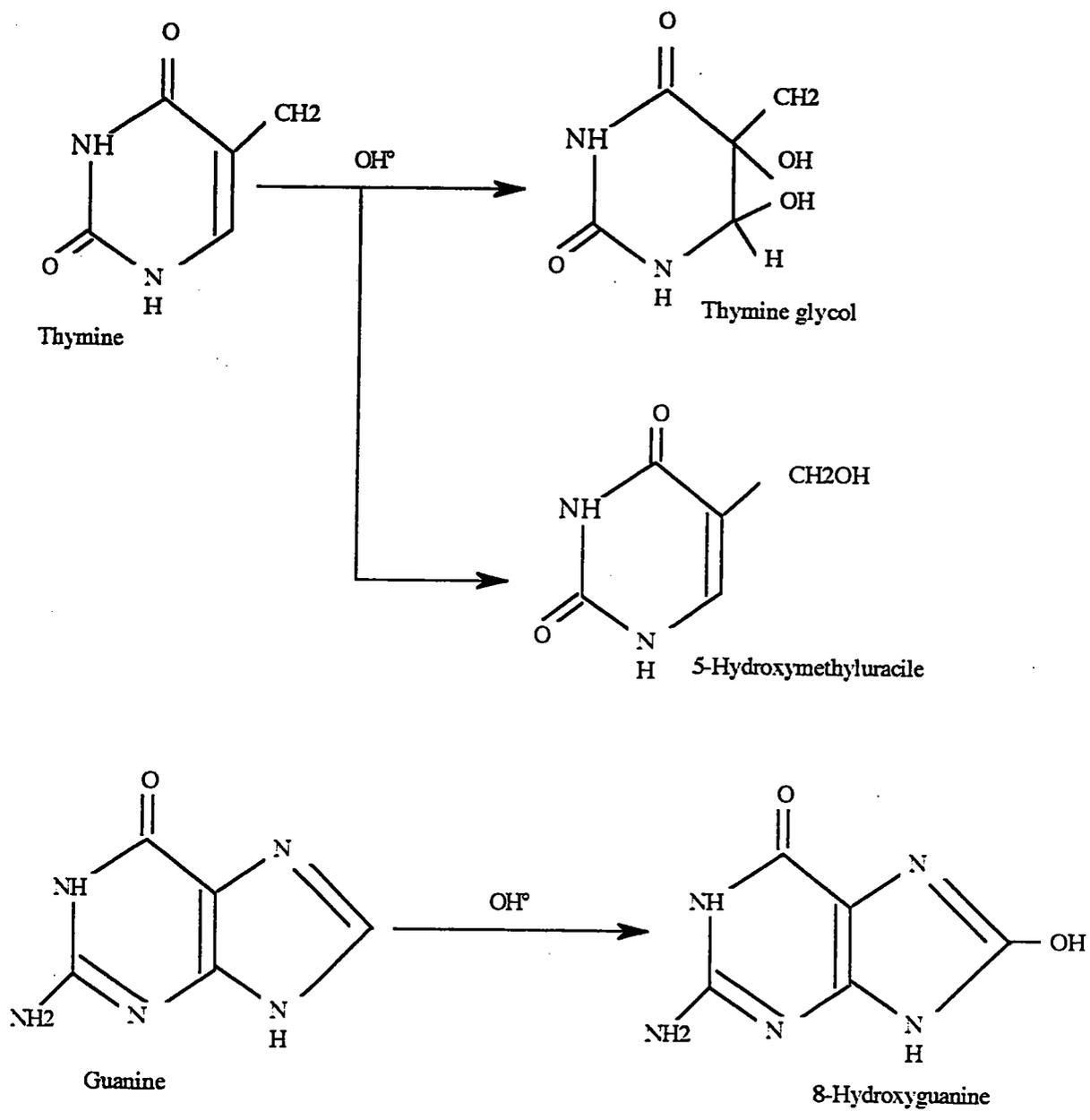
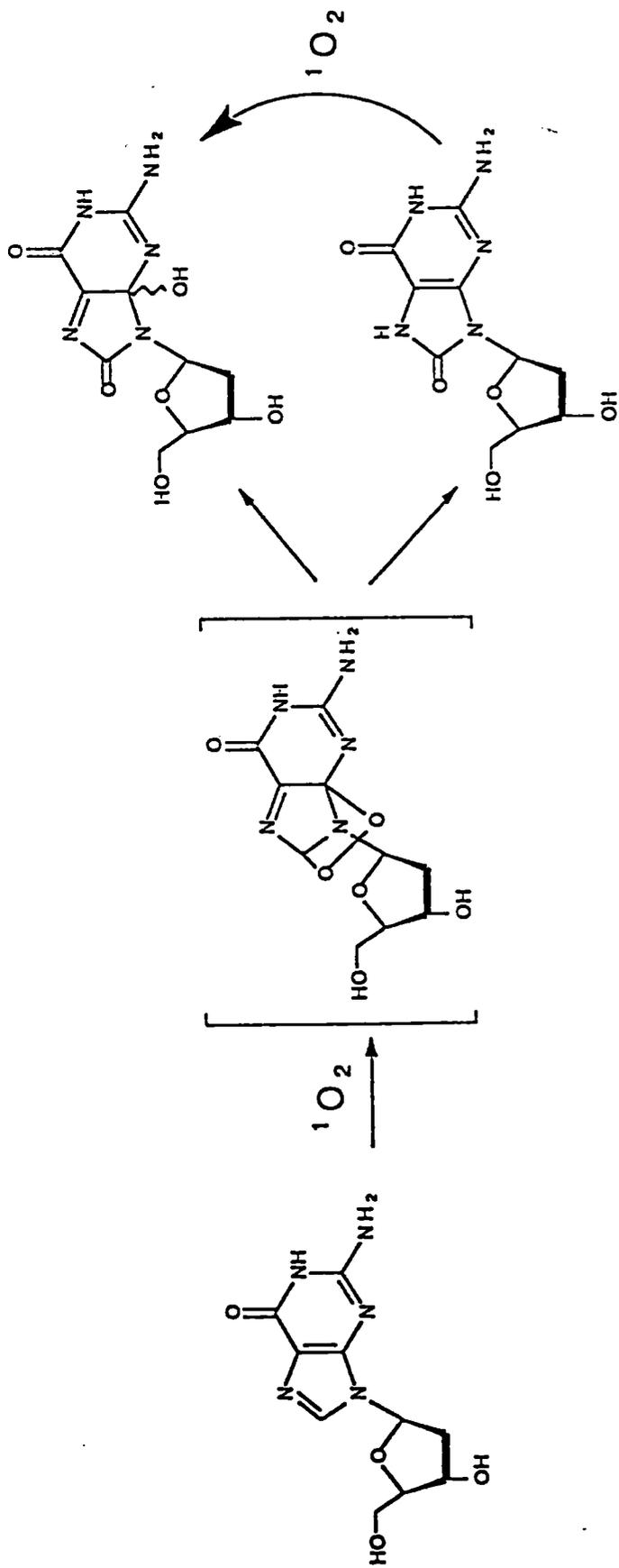


Figure I.5a : Exemple de deux produits formés par l'attaque du radical hydroxyl ( $\text{OH}^\bullet$ ) sur l'ADN



**Figure 1.5b** : Principaux produits d'oxydation de la 2'-déoxoguanosine par l'oxygène singulet ( $1O_2$ ), incluant la 7,8-dihydro-8-oxo-2'-déoxyguanosine et le diastéréoisomères de la 7,8-dihydro-4-hydroxy-8-oxo-2'-déoxyguanosine.

La détection des espèces radicalaires mises en jeu dans le stress oxydant fait appel aux techniques spectroscopiques de résonance paramagnétique électronique (RPE). Cette technique est basée sur la résonance de spin électronique et permet d'étudier la nature et la structure des espèces comportant un ou plusieurs électrons célibataires. S'agissant des espèces réactives de l'oxygène, extrêmement fugaces et présentes à concentrations très faibles, il est nécessaire de les piéger préalablement (techniques de spin-trapping) à l'aide de réactifs nitrosé ou nitronne comme le DMPO (5-5-diméthylpyrrolidine-oxyde) afin de former un complexe radicalaire plus stable pour l'étude spectrale.

Ces techniques ne peuvent toutefois être mises en oeuvre qu'*in vitro* sur des systèmes réactionnels simplifiés, biomolécules, fractions subcellulaires ou cellules. *In vivo*, la réactivité extrêmement élevée de ces espèces radicalaires avec leur environnement biologique empêche leur détection. Les études *in vivo* consisteront à évaluer leurs effets cellulaires et subcellulaires, qui témoignent indirectement de l'implication d'un stress oxydant postulé à partir de mécanismes élucidés *in vitro*.

Les principales investigations réalisées chez les organismes soumis expérimentalement et *in situ* à des conditions de stress oxydantes concernent la lipoperoxydation des membranes biologiques et l'activité des systèmes antioxydants.

La lipoperoxydation est communément mise en évidence par la mesure du malondialdéhyde (MDA), produit terminal de la dégradation des lipides, par HPLC ou par spectrophotométrie du complexe coloré formé avec le TBA ; les autres produits de dégradation des acides gras polyinsaturés comme les diènes conjugués, les aldéhydes et leurs produits de condensation avec les constituants cellulaires sont plus utilisés comme indicateurs en recherche qu'en routine.

Les systèmes antioxydants étudiés sont principalement (i) l'activité des superoxydes dismutases, glutathion peroxydases, glutathion réductase et catalase, et (ii) les teneurs en glutathion réduit et oxydé, vitamine E, vitamine C et caroténoïdes éventuellement.

L'ensemble de ces paramètres est souvent mesuré simultanément, compte tenu des relations complexes existant entre ces différents systèmes. Les méthodes de référence pour l'analyse des paramètres mesurés classiquement sont données dans le tableau I.1.

PARAMETRE ETUDIE	PRINCIPES DES METHODES	AUTEURS
Superoxyde dismutase (SOD)	réduction du cytochrome c par $O_2^-$ générés par le système xanthine / xanthine oxydase	Mc Cord et Fridovich, 1969
	oxydation du NADH par $O_2^-$ générés par le mélange EDTA/MnCl <sub>2</sub> + $\beta$ mercaptoéthanol	Paoletti <i>et al.</i> , 1986
	autooxydation du pyrogallol en milieu basique	Marklund et Marklund, 1974
Glutathion peroxydase (GPx)	suivi de la consommation d'un des deux substrats (GSH ou peroxyde)	Wendel, 1981 Flohé et Gunzler, 1984
	suivi de l'oxydation du NADPH couplée à l'activité peroxydasique	Paglia et Valentine, 1967
Catalase	cinétique de réduction d' $H_2O_2$	Beers et Sizer, 1952
	mesure de l' $O_2$ dégagé au cours de la réduction d' $H_2O_2$	Del Maestro et Mc Donald, 1987
Glutathion réductase (GRd)	suivi de l'oxydation du NADPH en présence de glutathion oxydé	Carlberg et Mannervik, 1985
Glutathion (GSH)	réaction cyclique où la réduction du DTNB est suivie, en présence de glutathion réductase	Akerboom et Sies, 1981
	méthodes HPLC après dérivation du glutathion avec un réactif fluorescent	Leroy <i>et al.</i> , 1993 Martin et White, 1991 Neuschwander-Terri et Roll, 1989
Malonaldéhyde (MDA)	test à l'acide thiobarbiturique (TBA)	Buege et Aust, 1978
	méthodes HPLC	Csallany <i>et al.</i> , 1984 Mannwaring <i>et al.</i> , 1988 Esterbauer <i>et al.</i> , 1984 Behrens et Madere, 1991
4-hydroxynonéal	méthodes HPLC	Esterbauer et Zollner, 1989
	méthode GC-spectrométrie de masse	Rice-Evans <i>et al.</i> , 1991
ensemble du spectre des aldéhydes formés au cours de la lipoperoxydation	méthode à la 2,4 dinitrophénylhydrazine	Esterbauer et Zollner, 1989
	méthode à la 1,3 cyclohexanedione	Rice-Evans <i>et al.</i> , 1991

Tableau I.1 : Principales méthodes analytiques de mesure des indicateurs de stress oxydant.

## 2ème PARTIE

### II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE DES TRAVAUX RELATIFS AU STRESS OXYDANT CHEZ LES ORGANISMES AQUATIQUES

L'étude du stress oxydant et de ses implications toxicologiques chez les organismes aquatiques a réellement commencé il y a une dizaine d'années, après la mise en évidence d'activités enzymatiques antioxydantes chez les poissons dans les années 70-80. Ces résultats ont tout naturellement conduit les écotoxicologistes à étudier les mécanismes de production des espèces réactives chez ces organismes et ses conséquences en terme de lipoperoxydation. Les équipes de Livingstone en Grande Bretagne, de Di Giulio, de Winston aux USA et de Narbonne en France ont été les pilotes de ces recherches.

Parallèlement étaient poursuivies les études sur la distribution des systèmes antioxydants chez les poissons, les crustacés et les bivalves ainsi que sur la comparaison entre invertébrés et vertébrés aquatiques et terrestres.

Le rôle de la pollution en tant que facteur de stress oxydant a commencé à être étudié tout récemment.

#### II.1. FORMATION DES ESPÈCES REACTIVES ET EFFETS CHEZ LES ORGANISMES AQUATIQUES.

La formation d'oxyradicaux chez les espèces aquatiques a été mise en évidence *in vitro* à l'aide de fractions microsomiales isolées de foie de poissons, d'hépatopancreas de crustacés et de glande digestive de bivalves.

La formation d' $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  et d'oxyradicaux a été montrée en présence de :

- xénobiotiques se comportant comme des systèmes rédox. Ces molécules sont des découplants du transfert d'électrons microsomial : elles captent un électron du NAD(P)H et peuvent le transférer à la molécule d'oxygène en formant  $O_2^{\cdot-}$  lors de réactions d'oxydoréductions cycliques. Les dérivés nitroaromatiques (type méta-dinitrobenzène, acide paranitrobenzoïque, nitrofurantoïne), les quinones (type ménadione), les dérivés du bipyridinium (type paraquat), sont des systèmes rédox qui ont été très utilisés *in vitro* pour démontrer la production d'oxyradicaux chez les espèces aquatiques comme chez les mammifères
- complexes fer-EDTA et fer-ADP, de lindane, d'inducteurs des cytochromes P450 1A1, d'hydrocarbures comme le BaP perturbant le transfert des électrons au niveau des membranes microsomiales .

Les mécanismes du stress oxydant chez les organismes aquatiques sont dans leur ensemble similaire à ceux des mammifères. Il existe cependant des différences liées à des spécificités physiologiques. Chez les invertébrés aquatiques par exemple, la production d'oxyradicaux serait favorisée (i) par des traces de fer libéré par l'hémoglobine. La liaison du fer à l'hémoprotéine serait plus labile chez les mollusques et les crustacés que chez les mammifères. Le fer catalyserait la formation du radical  $OH^\circ$  à partir de  $O_2^{\cdot-}$  et de  $H_2O_2$  par une réaction de type Haber-Weiss ; (ii) lors de la biotransformation des xénobiotiques par les monooxygénases. L'affinité entre les enzymes du système des monooxygénases serait insuffisante, ce qui entraîne une fuite des électrons sur l'oxygène et la formation de  $O_2^{\cdot-}$ .

La formation d'anions superoxyde a été observée aussi dans d'autres compartiments cellulaires que le réticulum endoplasmique : (i) dans des fractions cytosoliques de foie de poissons exposés à des dérivés nitroaromatiques, (ii) dans les lysosomes de la glande

digestive des bivalves : les espèces radicalaires générées à l'intérieur des lysosomes pourraient être neutralisées par une Cu Zn superoxyde dismutase intralysosomiale présente toutefois en quantités assez faibles (Winston *et al.*, 1991).

Les effets du stress oxydant ont été étudiés *in vitro* pour ce qui concerne la mutagénicité et la lipoperoxydation.

Michel *et al.*, (1992) ont comparé les effets résultant de la biotransformation du B(a)P chez la moule (*M. edulis*) et le poisson (*Dicentrarchus labrax*) : ils ont montré à l'aide de fractions microsomiales et de surnageants post-mitochondriaux de tissus hépatiques que les réactions de métabolisation du BaP sont plus importantes chez le poisson et conduisent aussi à une activité mutagène plus élevée. La génotoxicité résulterait de la formation des intermédiaires époxydés qui sont les précurseurs des diols et des phénols formés en majorité chez *D. labrax* ; les quinones par contre constitueraient l'essentiel des métabolites chez *M. edulis*.

La lipoperoxydation chez les organismes aquatiques semble procéder de mécanismes similaires à ceux des mammifères. Wofford et Thomas (1988) ont comparé la susceptibilité de préparations hépatiques de rat et de poisson (*Mugil cephalus*) à la lipoperoxydation. Les auteurs montrent que la lipoperoxydation *in vitro* est stimulée par NADH et NADPH, par le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) et le diéthylmaléate, inhibiteur du glutathion réduit, et par le fer ajouté au milieu d'essai. Les poissons seraient mieux protégés de la lipoperoxydation que les mammifères, bien qu'ils présentent un taux de lipides insaturés nettement plus élevé. Singh *et al.* (1989) ont montré que les lipides de microsomes hépatiques sont 30 fois moins peroxydés chez la truite que chez le rat, après incubation en présence de prooxydants. Ceci s'expliquerait par une concentration en vitamine E dans les microsomes de truite 43 fois supérieure à celle du rat.

## II.2. ACTIVITES ANTIOXYDANTES ENDOGENES CHEZ LES ORGANISMES AQUATIQUES

Les taux élevés en acides gras polyinsaturés chez les poissons, les teneurs élevées en oxygène dans les branchies et la vessie gazeuse chez les poissons osseux, les variations intertidales de pression en oxygène chez les invertébrés des zones côtières marines, sont autant de facteurs susceptibles d'entraîner un stress oxydant. Les particularités de ces organismes aquatiques ont suscité l'étude des mécanismes de protection tissulaire vis à vis de ces facteurs.

Qualitativement les organismes aquatiques apparaissent dotés des mêmes systèmes antioxydants que les mammifères.

Chez les poissons, les enzymes antioxydantes, SOD, catalase et glutathion peroxydase sont distribuées dans tous les tissus avec une prédominance au niveau sanguin et hépatique. La vessie gazeuse, les branchies, le muscle rouge, le coeur, la rate présentent également des activités notables (Asknes et Njaa, 1981 ; Wilhelm-Filho *et al.*, 1993). La vessie gazeuse est caractérisée par sa richesse en vitamine E et une activité superoxyde dismutase élevée : chez la morue, l'activité spécifique SOD est 2 à 9 fois plus élevée que dans le foie et les branchies respectivement. Les branchies présentent des activités catalasiques et glutathion peroxydasique importantes, alors que l'activité SOD est plus faible (Lemaire *et al.*, 1993).

Les activités antioxydantes sont plus élevées chez les poissons très actifs (thon, espadon et maquereau) que chez les poissons peu mobiles (Wilhelm-Filho *et al.*, 1993).

Les activités varient cependant avec l'espèce. L'activité catalasique tissulaire peut varier d'un facteur 4 entre différentes espèces d'une même famille (Asknes et Njaa, 1981).

Dans l'ensemble, les activités antioxydantes chez les espèces aquatiques sont inférieures à celles des mammifères ; à l'exception des activités peroxydasiques au niveau sanguin, qui sont très supérieures chez les poissons comparativement aux autres vertébrés. (Mazeaud *et al.*, 1979). L'activité de la SOD hépatique peut aussi voisiner celle des mammifères dans certains cas (Wilhelm-Filho *et al.*, 1993).

Les activités et les teneurs en antioxydants chez le xénope, la grenouille et la truite sont 5 à 10 fois plus faibles que chez les mammifères (rat et cochon d'Inde) selon les paramètres (SOD, catalase, glutathion peroxydases, glutathion réduit et oxydé, acide ascorbique, acide urique) et selon les tissus (foie, poumon ou branchies et cerveau) (Lopez-Torres *et al.*, 1993 ; Perez-Campo *et al.*, 1993).

Les mollusques bivalves et les poissons ont des activités du même ordre de grandeur dans la glande digestive et le foie. Chez *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*, les activités dans la glande digestive sont influencées par la teneur en oxygène, les facteurs climatiques et physiologiques :

- . l'anaérobiose diminue les activités antioxydantes et la lipoperoxydation, lesquelles retrouvent leurs valeurs lorsque les conditions d'oxygénation sont rétablies, simulant ainsi les effets en zone intertidale (Viarengo *et al.*, 1989)
- . la ponte chez *M. galloprovincialis* entraîne une augmentation des activités antioxydantes en mars-avril, suivie d'une diminution progressive au printemps alors que les conditions nutritionnelles et la température augmentent (Solé *et al.*, 1995)
- . l'âge sensibilise aux effets oxydants : ainsi chez *M. edulis*, les individus âgés de plus de 10 ans ont des capacités antioxydantes significativement plus faibles (catalase, glutathion peroxydase, glutathion réduit, caroténoïdes et vitamine E), ce qui explique un taux de lipoperoxydation plus élevé (Viarengo *et al.*, 1991).

### II.3. REPONSE DES ORGANISMES AQUATIQUES AU STRESS OXYDANT AUX POLLUANTS

La réponse des systèmes antioxydants des organismes aquatiques aux polluants a été étudiée expérimentalement et *in situ*. L'approche expérimentale permet de mieux corrélérer les résultats avec l'exposition des organismes que les études de terrain ; mais les conditions expérimentales font souvent appel à des concentrations élevées de polluants et des durées d'exposition courtes (24 heures à 6 jours), simulant plus des conditions d'intoxication aiguë que des situations réelles. Les études *in situ* sont plus intéressantes de ce point de vue, mais les problèmes tiennent dans l'identification des polluants qui est loin d'être exhaustive. Les principales études sur ce thème sont répertoriées dans les tableaux II.1, II.2 et II.3, avec un rappel des conditions d'exposition, des paramètres contrôlés et des réponses qualitatives obtenues : les tableaux II.1 et II.2 correspondent aux essais réalisés respectivement avec des substances organiques et minérales, et le tableau II.3 aux études *in situ* ou effectuées avec des sédiments provenant de sites naturels contaminés.

De l'ensemble de ces travaux, il ressort que les activités antioxydantes sont en général augmentées en présence de polluants. Les modifications d'activité peuvent être transitoires, accompagnées ou non d'effets de lipoperoxydation et sont variables selon les espèces.

Les réponses des activités enzymatiques, **catalase** et **superoxyde dismutases**, présentent souvent un profil parallèle. Les augmentations d'activité catalasique sont cependant plus marquées, plus nettes et plus précoces que celles de la SOD (Di Giulio *et al.*, 1993). Elles sont observées en présence de sédiments contaminés par des HAPs et des PCBs (Livingstone *et al.*, 1993 ; Rodriguez-Ariza *et al.*, 1993) ou lors d'exposition au paraquat

SUBSTANCE ETUDIEE <i>espèce</i>	CONC. (mg/l)	DUREE D'EXPOSITION	SOD	GPxtot	CAT	MDA	GSH +GSSG	GCS	DT diaphorase	AUTEURS
<b>Aroclor 1254</b> Poisson/marin <i>Micropogonias undulatus</i>	0,5mg/g nourriture	17 jours		+ (f, o)		= (f) ++ (o)	= (b)			Thomas et Wofford, 1993
<b>BaP</b> Bivalve/marin <i>Mytilus edulis</i>	0,05	6 jours	=	=	=	=			++	Livingstone <i>et al.</i> , 1990
<b>CCl4</b> Bivalve/marin <i>Mytilus edulis</i>	1	6 jours				++	=			Ribera <i>et al.</i> , 1991
<b>Chlorothalonil</b> Poisson/eau douce <i>Ictalurus punctatus</i>	0,042	0 24 72 144 heures					= (f, b) ++ (f, b) + (f) ++ (b)	= (f, b) = (f, b)		Gallagher <i>et al.</i> , 1992
<b>DEF<sup>a</sup></b> <b>n-butylmercaptan (nBM)</b> Poisson/eau douce <i>Ictalurus punctatus</i>	DEF: 1 à 40% de la CL <sub>50</sub> nBM: 7 à 45% de la CL <sub>50</sub>	21 jours	=	=	=	=	=			Mather- Mihaich et Di Giulio, 1986
<b>Ménadione</b> Bivalve/marin <i>Mytilus edulis</i>	1	6 jours	=	=	=	=			++	Livingstone <i>et al.</i> , 1990
Bivalve/marin <i>Mytilus edulis</i>	1	6 jours				+ <sub>1</sub>	-			Ribera <i>et al.</i> , 1991
Poisson/eau douce <i>Ictalurus punctatus</i> <i>Ameriurus nebulosus</i>	40 injection i.p	2 jours					+ <sub>1</sub> + <sub>1</sub>			Hasspieler <i>et al.</i> , 1994
<b>Paraquat</b> Bivalve/marin <i>Geukensia demissa</i>	?	6 à 36 heures	++ <sub>1</sub>		++ <sub>1</sub>	++ <sub>1</sub>	> contrôle			Wenning <i>et al.</i> , 1988
Poissons/eau douce <i>Cyprinus carpio</i> <i>Carassius carassius</i> <i>Tinca tinca</i>	10	96 heures	- <sub>1</sub> = - <sub>1</sub>	++ ++ =	- ++ =	++ <sub>1</sub> + <sub>1</sub> =				Gabrielak et Klekot, 1985

<b>t-butyl hydroperoxyde</b> Poisson/eau douce <i>Ictalurus punctatus</i> <i>Ameriurus nebulosus</i>	125 injection i.p	8 heures							+++ -t	Iasspieler <i>et al.</i> , 1994
<b>Effluent d'usine de pâte à papier</b> Poisson/eau douce <i>Ictalurus punctatus</i>	10-20-40%		=	=	+	=	=			Mather- Mihaiç et Di Giulio, 1991

(b) : branchies, (l) : foie, (o) : ovaires.

t : indique que la variation est transitoire.

<sup>a</sup> DEF : S,S,S-tri-n-butyl phosphotriothioate (herbicide organophosphoré) : CL50 entre 5,6 et 18,8 mg/l.

n-butylmercaptan : métabolite du DEF : CL50 entre 1100 et 3600 mg/l

**TABLEAU II.1 : MODIFICATIONS D' ACTIVITES OU DE CONCENTRATIONS DES PARAMETRES ANTIOXYDANTS ET DU MALONALDEHYDE DE POISSONS OU DE BIVALVES EXPOSES A DES COMPOSES ORGANIQUES LORS D' EXPERIMENTATIONS AU LABORATOIRE :** augmentation (+), diminution (-) par rapport aux témoins.  
SOD (superoxyde dismutase) ; GPx tot. (glutathion peroxydase totale) ; CAT (catalase) ; MDA (malonaldéhyde) ; GSH+GSSG (glutathion total) ; GCS (gammaglutamylcystéine synthétase).

SUBSTANCE ETUDIEE <i>espèce</i>	CONC. (mg/l)	DUREE D'EXPOSITION	SOD	GPxtot	GRd	CAT	MDA	GSH+GSSG	AUTEURS
<b>Cadmium</b>  Poisson/eau douce <i>Scorpaena guttata</i>	10 et 20	4 semaines	-- (i)						Bay <i>et al.</i> , 1989
Poisson/marin <i>Micropogonias undulatus</i>	5 puis 1	6 jours  33 jours		- (f,o)			= (f,o)	= (f,o)	Wofford et Thomas, 1993
<b>Cuivre</b> <b>Zinc</b> <b>Cadmium</b>  Bivalve/marin <i>Mytilus edulis</i>	Cu:0,04  Zn:0,08  Cd:40	6 jours					-  +  -	-  =  =	Viarengo <i>et al.</i> , 1988
<b>Mercure</b>  Poisson/eau douce <i>Heteropneustes fossilis</i>	0,2 (1HgCl <sub>2</sub> )	30 jours					++ t (c) + t (o) -- t (r) +++ t (m)		Bano et Hassan, 1989
<b>Mercure</b> <b>Sélénium</b>  Bivalve/marin <i>Anadra granosa</i>	Hg:0,1  Se:1	4 jours			-  +  - Se +Hg			+  =  +Se +Hg	Patel <i>et al.</i> , 1990
<b>Plomb</b> <b>Zinc</b>  Poisson/eau douce <i>Cyprinus carpio</i>	Zn15+Pb5 Zn20+Pb8  Zn1,5+Pb0,5 Zn 3+Pb1 Zn 5+Pb1,5	24 heures  5 jours	++ =  -- = -			++  ++  - = --			Dimitrova <i>et al.</i> , 1994

(c) : cerveau, (f) : foie, (i) : intestins, (m) : muscle, (o) : ovaires, (r) : reins.  
t : indique que la variation est transitoire.

**TABLEAU II.2 : MODIFICATIONS D' ACTIVITES OU DE CONCENTRATIONS DES PARAMETRES ANTIOXYDANTS ET DU MALONALDEHYDE DE POISSONS OU DE BIVALVES EXPOSES A DES METAUX LORS D' EXPERIMENTATIONS AU LABORATOIRE :** augmentation (+), diminution (-) par rapport aux témoins.  
SOD (superoxyde dismutase) ; GPx tot.(glutathion peroxydase totale) ; SeGPx (glutathion peroxydase sélénium-dépendante) ; GRd (glutathion réductase) ; CAT (catalase) ; MDA (malonaldéhyde) ; GSH+GSSG (glutathion total).

TYPE D' ETUDE <i>espèce</i>	en µg/g de poids sec DUREE D' EXPOSITION	SOD	GPx tot.	SeGPx	GRd	GST	CAT	GSH + GSSG	MDA	G6PD	AUTEURS
Etude <i>in situ</i> Poisson/eau douce <i>Mugil sp.</i>	HAPs = 44 PCBs = 2,3 DTTs = 7,1	+	++	++	+	++	+	(+ GSSG)	--	+	Rodriguez-Ariza <i>et al.</i> , 1993
Bivalve/marin <i>Mytilus galloprovincialis</i>	HAPs = 0,1 à 0,4 PCBs = 0,004 à 0,007	+ j + m - ju		= j + m			- j ++ m = ju				Solé <i>et al.</i> , 1995
Etude au laboratoire Poisson/eau douce <i>Ictalurus punctatus</i>	HAPs = 90 PCBs = 7 2-7-14-28 jours d' exposition	+				+	+	+	++		Di Giulio <i>et al.</i> , 1993
Poisson/marin <i>Limanda limanda</i>	HAPs = 300 PCBs = 0,015 20-80-144 jours d' exposition	= J25 ++ J80 = J144		= J25 - J80 = J144			= J25 + J80 = J144		- J25 ++ J80 ++ J144		Livingstone <i>et al.</i> , 1993
Etude de transfert Bivalve/marin <i>Mytilus galloprovincialis</i>	Métaux lourds Plomb transfert de témoins 6 mois dans site contaminé	mesures de paramètres biologiques : • stabilité membrane lysosomiale : diminution chez individus transférés sur sites contaminés • rapport poids glande digestive / poids coquille : diminution corrélée taux élevés de plomb taux de plomb accumulé dans les glandes digestives : • 50 à 100 µg/g pour les individus <i>in situ</i> • 30 à 60 µg/g pour les individus transférés pendant 6 mois									Régoli et Orlando, 1993

j : Janvier ; m : Mars ; ju : Juin.

**TABLEAU II.3 : MODIFICATIONS D' ACTIVITES OU DE CONCENTRATIONS DES PARAMETRES ANTIOXYDANTS, DU MALONALDEHYDE ET DE LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE DE POISSONS OU DE BIVALVES PRELEVES *IN SITU* OU EXPOSES AU LABORATOIRE A DES SEDIMENTS PROVENANT DE SITES CONTAMINES OU NON : augmentation (+), diminution (-) par rapport aux témoins.**  
SOD (superoxyde dismutase) ; GPx tot. (glutathion peroxydase totale) ; SeGPx (glutathion peroxydase sélénium-dépendante) ; GRd (glutathion réductase) ; GST (glutathion -S-transférases) ; CAT (catalase) ; GSH+GSSG (glutathion total) ; GSSG (glutathion oxydé) ; MDA (malonaldéhyde) ; G6PD (glucose-6-phosphate déshydrogénase).

(Gabrielak et Klekot, 1985 ; Wenning *et al.*, 1988). Les relations doses-effets sont cependant loin d'être évidentes en milieu naturel et les réponses paraissent influencées par d'autres facteurs que les polluants identifiés (Livingstone *et al.*, 1995). Au cours d'études portant sur plusieurs mois, une augmentation des activités SOD notamment, a été notée chez les poissons des sites "de référence" ; cette augmentation n'était pas négligeable en regard de celle résultant de la pollution (Roberts *et al.*, 1987 ; Livingstone *et al.* 1993).

L'augmentation d'activité n'est cependant pas la règle, une inhibition a été enregistrée chez les limandes prélevées en mer du Nord au niveau de sites pollués de Dogger Bank (Livingstone *et al.*, 1992), ainsi qu'expérimentalement chez des carpes exposées à des teneurs élevées de cuivre (25 ppm) et de zinc (10 ppm) (Radi et Matkovic, 1988). Dans les deux cas, l'activité de la glutathion peroxydase était augmentée ; la lipoperoxydation était très élevée dans les intoxications au cuivre.

Ces résultats peuvent s'expliquer par une production importante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> capable de stimuler la glutathion peroxydase mais aussi d'inhiber la SOD et la catalase.

Ces résultats indiquent aussi que (i) la réponse des activités **glutathion peroxydasiques** ne va pas toujours dans le même sens que celles des deux enzymes précédentes (ii) et que l'activation de la glutathion peroxydase ne suffit pas à empêcher la lipoperoxydation. Ceci a été confirmé chez la carpe exposée à 10 ppm de paraquat (Gabrielak et Klekot, 1985).

Cependant, l'augmentation des activités glutathion peroxydasiques peut être parallèle à celle de la catalase et de la SOD, comme cela a été noté chez des mullets d'un estuaire contaminé par des HAPs, des PCBs et des pesticides au Sud de l'Espagne (Rodriguez-Ariza *et al.*, 1993).

Des cas où l'activité des glutathion peroxydases a été trouvée à un niveau inférieur à celui des témoins, ont aussi été observés :

- chez des limandes exposées à un sédiment fortement contaminé par les HAPs et les PCBs, alors que la SOD, la catalase et la lipoperoxydation étaient activées simultanément (Livingstone *et al.*, 1993)
- et chez *Atlantic croacker* lors d'une exposition à long terme au cadmium (Thomas et Wofford, 1993).

Hasspieler *et al.*, (1994) ont montré que la sensibilité aux polluants cancérigènes des poissons tête boule (*Brown bullhead*) était en liaison avec des activités très élevées en glutathion peroxidases, des activités glutathion réductase et glutathion synthétase au contraire très faibles. Cette sensibilité était expliquée par un état de déplétion en **glutathion réduit** (GSH) engendré à la suite de l'exposition à des polluants organiques ou un stress oxydant ; le déficit en GSH ne pouvait être rapidement comblé du fait de l'activité trop faible des enzymes catalysant sa synthèse ou sa régénération.

Viarengo *et al.*, (1988) ont rapporté que l'inhibition des teneurs en glutathion réduit était associée à des effets de lipoperoxydation importants chez la moule marine exposée au cuivre (40 mg/l), alors que le cadmium et le zinc étaient sans effet.

Une augmentation des teneurs en GSH a été observée dans des sites pollués ou en réponse à des contaminations expérimentales. Elle peut résulter d'une augmentation de l'activité de la gammaglutamylcystéine synthétase : comme dans le cas de poisson-chats (*Channel catfish*) exposés au chlorothalonil, un biocide cancérigène éliminé sous forme de conjugué aux glutathion transférases (Gallagher *et al.*, 1992). L'augmentation des taux de glutathion n'est cependant pas toujours expliquée par l'activation de la synthétase : Nishimoto *et al.*, (1995) n'ont pas d'explications aux teneurs hépatiques de GSH, triples de celles de soles témoins (*Pleuronectes vetulus*) chez les individus prélevés dans le Puget Sound sur le site de Duwamish Waterway connu pour la pollution importante de ses sédiments. Les auteurs

concluent à la nécessité d'études plus approfondies sur le métabolisme du glutathion chez les organismes aquatiques.

L'activité de la **glutathion réductase** serait un paramètre intéressant à suivre dans ce contexte. Patel *et al.*, (1990) ont montré une inhibition importante de l'activité sanguine chez les clams exposés à 100 µg/l de mercure, accompagnée de l'augmentation du glutathion réduit. En l'absence d'informations sur l'activité des autres enzymes impliquées dans le métabolisme du glutathion, il est difficile d'expliquer l'augmentation du tripeptide.

Les teneurs en **malonalaldéhyde (MDA)** constituent un marqueur très intéressant de la lipoperoxydation consécutive à un stress chimique oxydant. Un taux en MDA élevé a été observé fréquemment chez le poisson et la moule lors d'expositions au paraquat, au cuivre, au mercure (Bano et Hasan, 1989) et à des sédiments contaminés (Livingstone *et al.*, 1993 ; Di Giulio *et al.*, 1993). La formation de MDA n'a pas été observée chez les poissons exposés au zinc et au cadmium expérimentalement.

La lipoperoxydation traduit l'inefficacité des systèmes antioxydants à enrayer une agression toxique. Elle peut avoir lieu même en présence d'activités antioxydantes augmentées, l'induction pouvant être insuffisante pour faire face au stress.

#### II.4. INTERÊT DES BIOMARQUEURS DE STRESS OXYDANT EN ECOTOXICOLOGIE. PERSPECTIVES DE RECHERCHE.

L'intérêt des paramètres antioxydants réside dans le caractère aspécifique de leur réponse ; ce qui est un avantage dans le contexte de contamination multiple des écosystèmes. La réponse des systèmes antioxydants aux polluants se traduit en général par une augmentation d'activité dans une première phase. Ce phénomène traduit l'adaptation des individus à un nouvel environnement. L'induction d'activité est en général transitoire, relativement modérée et aspécifique, en comparaison de l'induction des cytochromes P450 :

- un retour des activités à leur niveau initial a été observé expérimentalement, alors que les conditions d'exposition ne semblent pas avoir été modifiées. Les travaux de Solé *et al.*, (1995) sur bivalves étudiés *in situ* de janvier à juin et ceux de Livingstone *et al.*, (1993) sur poissons exposés à des sédiments contaminés par des HAP et des PCB pendant 144 jours en laboratoire illustrent bien le caractère biphasique de ces réponses.

- elle n'intéresse pas systématiquement tous les paramètres antioxydants. L'induction d'un paramètre peut d'ailleurs résulter d'un phénomène de compensation permettant de pallier le déficit d'autres antioxydants,

- elle peut résulter aussi de phénomènes physiologiques comme la reproduction, ou de facteurs climatiques et environnementaux sans rapport avec la pollution.

- l'activation des systèmes antioxydants peut suffire dans un premier temps à limiter la production de substances réactives et à empêcher les effets de cytotoxicité. Mais ce n'est pas toujours le cas.

L'inhibition de certaines composantes des systèmes antioxydants a été notée dans les cas d'intoxications aiguës. Elle serait en liaison avec l'altération de l'état des individus et la perte de l'homéostasie cellulaire. Ce phénomène d'inhibition a souvent été trouvé associé à des effets de lipoperoxydation : il exprimerait alors des effets de toxicité, un état de non-compensation des lésions cellulaires initiales.

Il semble donc que les systèmes antioxydants pourraient être plus que de simples indicateurs de contamination du milieu. Leur inhibition ou leur déplétion serait la traduction des effets de toxicité induits par la contamination.

Actuellement nos connaissances sont encore insuffisantes pour être en mesure de recommander l'un ou l'autre des paramètres classiquement étudiés, en tant que biomarqueur pour le contrôle de l'exposition aux polluants.

Même s'il apparaît qu'une déplétion en glutathion réduit serait un élément de diagnostic de l'état précaire des individus, ce paramètre ne peut être interprété intrinsèquement. En effet un taux faible de GSH peut résulter d'une mobilisation du cofacteur par les glutathion transférases impliquées dans l'élimination de métabolites de produits endogènes et de xénobiotiques. Cette déplétion n'aura pas de conséquences graves si elle peut être rapidement compensée par une synthèse accrue de glutathion. De sorte que, tant que la glutathion synthétase et la glutathion réductase restent actives, les potentialités antioxydantes de la cellule seront préservées. Au contraire la déficience de l'une ou l'autre de ces deux enzymes s'accompagnera à court terme de dommages cellulaires pouvant conduire à la mort de la cellule.

La connaissance de l'ensemble de l'activité des enzymes qui participent à la synthèse, l'utilisation et la régénération du glutathion est donc indispensable pour interpréter une variation des concentrations de ce substrat. Les deux enzymes, glutathion réductase et synthétase, sont rarement étudiées en tant qu'antioxydants, mais mériteraient d'être intégrées aux études du stress oxydant.

Par ailleurs, il est difficile d'expliquer des fluctuations d'activité observées au cours du temps pour l'un ou l'autre des paramètres antioxydants. Elles résultent vraisemblablement d'effets de compensation du fait de la redondance des systèmes biologiques. *Tant que ces mécanismes ne sont pas mieux compris, il est préférable de suivre plusieurs paramètres simultanément afin d'avoir un reflet plus exact de l'état biologique des individus.*

Il est essentiel aussi d'associer à l'étude des paramètres antioxydants des indicateurs de toxicité cellulaire, comme la lipoperoxydation ou des marqueurs de l'altération des structures cellulaires afin d'avoir la signification de leur variation en terme de toxicité. La mesure des teneurs en glycogène associée à celle du glucose sanguin et de l'acide lactique a été proposée par Hemelraad *et al.*, (1990) comme indicateur du métabolisme énergétique des bivalves (*Anodonta cygnea*). La diminution de la stabilité des membranes lysosomiales traduit également la sensibilité cellulaire aux toxiques et constitue un élément de pronostic intéressant de la cytotoxicité (Régoli et Orlando, 1993).

La variabilité interespèces et l'influence des conditions physiologiques sur l'activité des systèmes antioxydants, impliquent d'avoir de bonnes connaissances des effets potentiels de ces facteurs, avant d'incriminer le facteur pollution comme responsable des effets enregistrés.

En d'autres termes, l'utilisation des biomarqueurs de stress oxydant pour l'étude d'organismes prélevés *in situ* devrait se limiter à des espèces bien connues au plan des activités antioxydantes, afin de pouvoir exclure tout facteur physiologique dans les réponses enregistrées ; ou alors, réserver l'utilisation *in situ* de ces biomarqueurs à des opérations de transfert, amont-aval par rapport à une source de pollution, les effets des facteurs interférants, biologiques ou non, étant minimisées dans ces conditions.

D'un point de vue fondamental, il serait utile d'approfondir au niveau génique, l'étude de la réponse des systèmes antioxydants afin de déterminer si une modification d'activité résulte d'un effet sur la transcription des gènes correspondants ou d'une action directe sur la molécule elle-même. Les études de la régulation de ces gènes seraient nécessaires pour élucider les phénomènes de compensation possibles.

L'étude du stress oxydant n'est pas aisée, du fait de la complexité des mécanismes certes, mais aussi de la diversité des protocoles expérimentaux utilisés par les chercheurs. Quantitativement les comparaisons entre études sont rendues difficiles par la variété des méthodes analytiques, des fractions subcellulaires analysées et des modes d'expression des activités mesurées (en unités, concentrations molaires ou pondérales exprimées par mg de protéines, g de tissus ou g d'hémoglobine pour les mesures sanguines). L'établissement des correspondances entre les différentes unités serait nécessaire pour tirer tout le parti des recherches réalisées dans ce domaine.

Il est utile de rappeler que l'interprétation des résultats ne peut être dissociée du contexte expérimental, - qualité des fractions analysées, sensibilité et spécificité des techniques mises en oeuvre, analyse statistique des résultats-. La validation des protocoles expérimentaux est essentielle pour ce qui concerne : les procédés de conservation des échantillons, les techniques de fractionnement subcellulaire associées à l'utilisation d'inhibiteurs de protéases adéquats, et l'élimination ou le contrôle des interférences

## CONCLUSION

L'intérêt des paramètres antioxydants en tant que biomarqueurs réside dans le caractère aspécifique de leur réponse ; ce qui est un avantage dans le contexte de contamination multiple des écosystèmes. Toutefois, la complexité des systèmes antioxydants et leur redondance ne facilitent pas l'interprétation des résultats. Les mécanismes de réponse de ces systèmes demandent à être mieux compris avant de définir les paramètres les plus pertinents en terme de biomarqueurs pour l'étude des organismes aquatiques dans les milieux naturels.

L'induction d'activité consécutive à l'exposition à des substances toxiques en première étape est une réponse logique d'adaptation ; tout comme le retour des activités à leur niveau basal en deuxième étape. Mais la diminution qui suit le pic d'induction peut aussi être le reflet d'un état précaire, en particulier si la diminution est rapide, importante et persistante. Il faut donc pouvoir discriminer entre adaptation et état de perturbation irréversible : l'intensité des phénomènes, leur cinétique et leur évolution dans le temps sont des données indispensables dans cet objectif. Les protocoles expérimentaux et la conception des études de biomonitoring doivent intégrer ces impératifs pour ce qui concerne les biomarqueurs de stress oxydant.

Il est essentiel aussi d'associer à l'étude des paramètres antioxydants des indicateurs de toxicité cellulaire, comme la lipoperoxydation ou des marqueurs de l'altération des structures cellulaires afin d'être en mesure de juger de la signification des réponses enregistrées.

L'étude des relations entre niveaux de contaminations, réponses des systèmes antioxydants et effets sur les organismes au cours du temps doit être poursuivie afin connaître la signification d'une augmentation ou d'une inhibition d'activité en terme de toxicité à plus ou moins long terme. C'est à ce prix que l'on pourra déterminer les paramètres les plus intéressants en terme de contrôle de l'exposition des organismes aquatiques. Une déplétion persistante des antioxydants est le reflet de l'état précaire des organismes et de la toxicité induite par la contamination. De sorte que les biomarqueurs de stress oxydant permettraient d'évaluer l'impact des polluants sur les populations peuplant les écosystèmes contaminés. Dans ce contexte prometteur, la validation de ces biomarqueurs impliquera la réalisation de programmes de recherches écotoxicologiques à long terme où seront étudiées les relations entre la réponse des systèmes antioxydants et les effets démoécologiques dans des écosystèmes naturels contaminés à des degrés divers.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AKERBOOM, T.P.M. & SIES, H., 1981, Assay of Glutathione, Glutathione Disulfide, and Glutathion Mixed Disulfides in Biological Samples in *Methods in Enzymology*, 77, 373-382.
- AKNES, A. & NJAA, L.R., 1981, Catalase, Glutathione Peroxydase and Superoxide Dismutase in Different Fish Species, *Comp. Biochem. Physiol.*, 69B, 893-896.
- BABIOR, B.M, 1978, Oxygen dependent microbial killing by phagocytes, *N. Engl. J. Med.*, 298, 659-668, 721-725
- BANO, Y. & HASAN, M., 1989, Mercury induced time-dependent alterations in lipid profiles and lipid peroxidation in different body organs of cat-fish *Heteropneustes fossilis*, *J. Environ. Sci. Health*, B24(2), 145-166.
- BAY, S.M., GREENSTEIN, D.J., SZALAY, P. & BROWN, D.A., 1990, Exposure of scorpionfish (*Scorpaena guttata*) to cadmium : biochemical effects of chronic exposure, *Aquat. Toxicol.*, 16, 311-320.
- BEERS, R.F. & SIZER, I.W., 1952, A Spectrophotometric Method for Measuring the Breakdown of Hydrogen Peroxide by Catalase, *J. Biol. Chem.*, 195, 133-190.
- BEHRENS, W.A. & MADERE, R., 1991, Malonaldehyde determination in tissues and biological fluids by ion-pairing high-performance liquid chromatography, *Lipids*, 26, n°3, 232-236.
- BENEDETTI, A., FULCERI, R., FERRALI, M., CICCOLI, L., ESTERBAUER, H. & COMPORTI, M., 1982, Detection of carbonyl functions in phospholipids of liver microsomes in  $\text{CCl}_4^-$  and  $\text{BrCCl}_3^-$  poisoned rats, *Bioch. Biophys. Acta*, 712, 628-638.
- BENEDETTI, A., POMPELLA, A., FULCERI, R., ROMANI, A. & COMPORTI, C., 1986, Detection of 4-hydroxynonenal and other lipid peroxidation products in the liver of bromobenzene-poisoned mice, *Bioch. Biophys. Acta*, 876, 658-666.
- BEYER W., IMLAY, J. & FRIDOVICH I., 1991, Superoxide dismutases, *Prog. Nucl. Ac. Res. Mol. Biol.*, 40, 221-253
- BIELSKI, B., ARUDI, R. & SUTHERLAND, M., 1983, A study of the reactivity of  $\text{HO}_2/\text{O}_2$  with unsaturated fatty acids, *J. Biol. Chem.*, 258, 4759-4761.
- BUEGE, J.A. & AUST, S.D., 1978, Microsomal lipid peroxidation, *Methods in Enzymology*, Vol. 52, 302- 310.
- BOVERIS, OSHINO, CHANCE, 1972, *Biochem. J.*, 128, 617-630.
- CARLBERG, I. & MANNERVIK, B., 1985, Glutathione Reductase in *Methods in Enzymology*, vol.113, 484-489.
- CSALLANY, A.S., GUAN, D.M., MANWARING, J.D. & ADDIS, P.B., 1984, Free malonaldehyde determination in tissues by high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.*, 42, 277-283.
- DEL MAESTRO, R. & MC DONALD, W., 1987, Distribution of Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Catalase in Developing Rat Brain, *Mech. Age. Develop.*, 41, 29-38.
- DI GIULIO, R.T., HABIG, C. & GALLAGHER, E.P., 1993, Effects of black rock harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish, *Aquat. Toxicol.*, 26, 1-22.
- DIMITROVA, M.S., TISHINOVA, V. & VELCHEVA, V., 1994, Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*), *Comp. Biochem. Physiol.*, 108C, n°1, 43-46.
- ESTERBAUER, H., 1993, Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products, *Amer J..Clin.Nutr.*, 57 (suppl.), 779S-786S.

- ESTERBAUER, H. & CHEESEMAN, K.H., 1990, Determination of aldehydic lipid peroxidation products : malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, in *Methods in Enzymology*, 186, 407-421.
- ESTERBAUER, H., LANG, J., ZADRAVEC, S. & SLATER, T.F., 1984, Detection of malonaldehyde by High-Performance Liquid Chromatography, in *Methods in Enzymology*, 105, 319-328.
- ESTERBAUER, H. & ZOLLNER, H., 1989, Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products, *Free Rad. Biol.Med.*, 7, 197-203.
- FENTON, H.J.H., 1894, Oxidation of tartaric acid in the presence of iron, *J. Chem. Soc.*, 65, 899-910.
- FLOHE, L. & GUNZLER, W.A., 1984, Assays of Glutathione Peroxidase in *Methods in Enzymology*, 105, 114-121.
- FONG, K., McCAY, P., POYER, J. KEELE, B. & MISRA, H., 1973, Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavine enzyme activity, *J. Biol. Chem.*, 7792-7796.
- FRIDOVICH, I., 1975, Superoxide dismutases, *Ann. Rev. Biochem.*, 44, 147-159.
- GABRYELAK, T. & KLEKOT, J., 1985, The effect of paraquat on the peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 81C,2, 415-418.
- GALLAGHER, E.P., CANADA, A.T. & DI GIULIO, R.T., 1992, The protective role of glutathione in chlorothalonil-induced toxicity to channel catfish, *Aquat. Toxicol.*, 23, 155-168.
- GUTTERIDGE, J.M.C. & HALLIWELL, B., 1990, The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems, *TIBS*, 15, 129-135.
- GUTTERIDGE, J.M.C. & HALLIWELL, B., 1993, Transition metal ions and antioxidant proteins in extracellular fluids, in *Atmospheric oxidation and antioxidants*, 3, SCOTT, G., ed, , Elsevier Publisher, UK.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C., 1984, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem. J.*, 219, 1-14.
- HALLIWELL, B., 1987, Oxidants and human disease : some new concepts, *FASEB J.*, 1, 358.
- HALLIWELL, B. & DIZDAROGLU, M., 1992, The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques, *Free Rad. Res. Comms.*, 16, 75-87.
- HARRIS, E.D., 1992, Regulation of antioxidant enzymes, *FASEB J.*, 6, 2675-2682.
- HASSPIELER, B.M., BEHAR, J.V., CARLSON, D.B., WATSON, D.E. & DI GIULIO, R.T., 1994, Susceptibility of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) to oxidative stress : a comparative study, *Aquat. Toxicol.*, 28, 53-64.
- HASSPIELER, B.M., BEHAR, J.V. & DI GIULIO, R.T., 1994, Glutathione-dependent defense in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*), *Ecotox. Environ. Saf.*, 28, 82-90.
- HEMELRAAD, J., HOLWERDA, D.A., HERWIG, H.J. and ZANDEE, D.I., 1990, Effects of cadmium in freshwater clams. III. Interaction with energy metabolism in *Anodonta cygnea*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 19, 699-703.
- HORTON, A.A. & FAIRHURST, S., 1987, Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 18, 17-79.
- KAPPUS, H., 1987, Oxidative stress in chemical toxicity, *Arch. Toxicol.*, 60, 144-149.
- KEHRER, J.P., 1993, Free radicals as mediators of tissue injury and disease, *Crit. Rev. Toxicol.*, 23, 1, 21-48.

- LAWRENCE, R.A., & BURK, R.F., 1976, Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71, 952-958.
- LEMAIRE, P., VIARENGO, A., CANESI, L. & LIVINGSTONE, D.R., 1993, Prooxidant and antioxidant processes in gas gland and other tissues of cod (*Gadus morhua*), *J. Comp. Physiol. B*, 163, 477-486.
- LEMAIRE, P., DEN BESTEN, P.J., O'HARA, S.C.M. & LIVINGSTONE, D.R., 1993, Comparative metabolism of benzo[a]pyrene by microsomes of hepatopancreas of the shore crab *Carcinus maenas* L. and digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis* L., *Polycyclic Aromatic Compounds*, 3, 1133-1140.
- LEROY, P., NICOLAS, A., WELLMANN, M., OSTER, T. & SIEST, G., 1993a, Evaluation of o-Phthalaldehyde as Bifunctional Fluorogenic Post-Column Reagent for Glutathione in LC, *Chromatographia*, 36, 130-134.
- LEROY, P., NICOLAS, N., THIOUDELLET, C., OSTER, T., WELLMANN, M. & SIEST, G., 1993b, Rapid Liquid Chromatographic Assay of Glutathione in Cultured Cells, *Biomed. Chrom.*, 7, 86-89.
- LIOCHEV, S.I. & FRIDOVICH I., 1994, The role of  $O_2^{\cdot -}$  in the production of  $HO^{\cdot}$  in vitro and in vivo, *Free Rad. Biol. Med.*, 16, 29-33
- LIVINGSTONE, D.R., GARCIA MARTINEZ, P., MICHEL, X., NARBONNE, J.F., O'HARA, S., RIBERA, D. & WINSTON, G.W., 1990, Oxiradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs, *Funct. Ecology*, 4, 415-424.
- LIVINGSTONE, D.R., ARCHIBALD, S., CHIPMAN, J.K. & MARSH J.W., 1992, Antioxidant enzymes in liver of dab *Limanda limanda* from the North Sea, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 91, 97-104.
- LIVINGSTONE, D.R., LEMAIER, P., MATTHEWS, A., PETERS, L., BUCKE, D. & LAW, R.J., 1993, Prooxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses in livers of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals, *Mar. Poll. Bull.*, 26(11), 602-606.
- LIVINGSTONE, D.R., LEMAIER, P., MATTHEWS, A., PETERS, L.D., PORTE, C. FITZPATRICK, P.J., FORLIN, L., NASCI, C. FOSSATO, V., WOOTTON, N. & GOLDFARB P., 1995, Assessment of the impact of organic pollutants on goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon, Italy : biochemical studies, *Mar. Environ. Res.*, 39, 235-240.
- MCCORD, J.M. & DAY, E.D., 1978, Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex, *FEBS Lett.*, 86, 139-142.
- MCCORD, J.M. & FRIDOVICH, I., 1969, Superoxide Dismutase : an enzymic function for erythrocyte, *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055.
- MCCORD, J.M., 1983, The superoxide free radical in biochemistry and pathophysiology, *Surgery*, 412-414.
- MARKLUND S.L., HOLME, E. & HELLNER, L. 1982, Superoxide dismutase in extracellular fluids, *Clin. Chim. Acta*, 126, 41-51
- MARKLUND, S. & MARKLUND, G., 1974, Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur. J. Biochem.*, 47, 469-474.
- MARTIN, J. & WHITE, I.N.H., 1991, fluorimetric determination of oxidised and reduced glutathione in cells and tissues by high performance liquid chromatography following derivatization with dansyl chloride, *J. Chrom. Biomed. Appl.* 568, 219-225.
- MATHER-MIHAICH E. & DI GIULIO R.T., 1986. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde, glutathione and methemoglobin concentrations in channel catfish exposed to def and n-butyl mercaptan. *Comp. Biochem. Physiol.*, 85C(2), 427-432.

- MAZEAUD, F., MARAL, J. & MICHELSON, A.M., 1979, Distribution of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the carp : erythrocyte manganese SOD, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 86, 1161-1168.
- MICHEL, X.R., CASSAND, P.M., RIBERA, D.G. & NARBONNE, J.F., 1992, Metabolism and mutagenic activation of benzo(a)pyrene by subcellular fractions from mussel (*Mytilus galloprovincialis*) digestive gland and sea bass (*Discentrarcus labrax*) liver, *Comp. Biochem. Physiol.*, 103C, 1, 43-51.
- NISHIMOTO, M., Le EBERHART, B-T., SANBORN, H.R., KRONE, C., VARANASI, U. & STEIN, J.E., 1995, Effects of a complex mixture of chemical contaminants on hepatic glutathione, L-cysteine and  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase in English sole (*Pleuronectes vetulus*), *Envir. Toxicol. Chem.*, 14, 461-469.
- PAGLIA, D.E. & VALENTINE, W.N., 1967, Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase, *J. Lab. Clin. Med.*, 70, 158-169.
- PAOLETTI, F., ALDINUCCI, D., MOCALI, A. & CAPARRINI, A., 1986, A Sensitive Spectrophotometric Method for the Determination of Superoxide Dismutase Activity in Tissue Extracts, *Anal. Biochem.*, 154, 536-541.
- PATEL, B., CHANDY, J.P. & PATEL, S., 1990, Effect of mercury, selenium and glutathione on sulphhydryl levels and glutathion reductase in blood clam *Anadara granosa* (L), *Ind. J. Mar. Sc.*, 19, 187-190.
- PEREZ-CAMPO, R., LOPEZ-TORRES, M., CADENAS, S. & BARJA, G., 1993, A comparative study of free radicals in vertebrates-I. Antioxydant enzymes, *Comp. Biochem. Physiol.*, 105B, 749-755.
- LOPEZ-TORRES, M., PEREZ-CAMPO, R., CADENAS, S., ROJAS, C. & BARJA, G., 1993, A comparative study of free radicals in vertebrates-II. Non enzymatic antioxydants and oxidative stress, *Comp. Biochem. Physiol.*, 105B, 757-763.
- PRE, J., 1991, La lipoperoxydation, *Pathol. Biol.*, 39, 716-736.
- RADI A.A.R. & MATKOVICS, B., 1988, Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues, *Comp. Biochem. Physiol.*, 90C, 69-72.
- REGOLI, F. & ORLANDO, E., 1993, *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator of lead pollution : biological variables and cellular responses, *Sci. Tot. Environ.*, Supplement 1993.
- RIBERA, D., NARBONNE, J.F., MICHEL, X., LIVINGSTONE, D.R. & O'HARA, S., 1991, Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure, *Comp. Bioch. Physiol.*, 100C, 177-181.
- RICE-EVANS, C.A., DIPLOCK, A.T. & SYMONS, M.C.R., 1991, Techniques in free radical research, in *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, BURTON, R.H. & van KNIPPENBERG, P.H., Eds, Elsevier Science Publishers B.V., The Netherlands.
- ROBERTS M.H., SVED D.W. & FELTON, S.P., 1987, Temporal changes in AHH and SOD activities in feral spot from the Elisabeth river, a polluted sub-estuary, *Mar. Environ. Res.*, 23, 89-101.
- RODRIGUEZ-ARIZA, A., PEINADO, J., PUEYO, C. and LOPEZ-BAREA, J., 1993, Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas, *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 50, 2568-2573.
- SIES, H., 1981, Measurement of hydrogen peroxide formation *in situ* in *Methods in Enzymology*, 77, 15-20.
- SIES, H., 1991, Oxidative stress : introduction, in *Oxidative stress, oxidants, and antioxidants*, Sies, H. Ed, Acad. Press, San Diego, XV.
- SINGH, Y, HALL, G. & MILLER M.G., 1989, Mechanisms of lipid peroxidation in the rat and trout, *Toxicologist*, 9, 219 (abstr.)
- SNELL, K. & MULLOCK, B., 1987, *Biochemical toxicology a practical approach*, IRL Press, England.

- SOLE, M., PORTE, C. & ALBAIGES, J., 1995, Seasonal variation in the mixed-function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Envir. Toxicol. Chem.*, 14(1), 157-164.
- SPALLHOLZ, J.E. & BOYLAN, L.M., 1991, Glutathione Peroxidase : the Two Selenium Enzymes in Peroxidases in Chemistry and Biology, 1, 259-272.
- STEGEMAN, J.J., BROUWER, M., DI GIULIO, R.T., FÖRLIN, L., FOWLER, B.A., SANDERS, B.M. & VAN VELD, P.A., 1992, Molecular responses to environmental contamination : enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect, in *Biomarkers, biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*, HUGGETT, R.J., KIMERLE, R.A., MEHRLE, P.M. & BERGMAN, H.L., Eds, Lewis Publishers, USA.
- THOMAS, P. & WOFFORD, H.W., 1993, Effects of cadmium and Aroclor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues, *Aquat. Toxicol.*, 27, 159-178.
- VIARENGO, A., PERTICA, M., CANESI, L., BIASI, F., CECCHINI, J. & ORUNESU, M., 1988, Effects of heavy metals on lipid peroxidation in mussel tissues, *Mar. Environ. Res.*, 24, 354.
- VIARENGO, A., PERTICA, M., CANESI, L., ACCOMANDO, R., MANCINELLI, G. & ORUNESU, M., 1989, Lipid peroxidation and level of antioxidant compounds (GSH, vitamin E) in the digestive glands of mussels of three different age groups exposed to anaerobic and aerobic conditions, *Mar. Environ. Res.*, 28, 291-295.
- VIARENGO, A., CANESI, L., PERTICA, M., LIVINGSTONE, D.R. & ORUNESU, M., 1991, Age-related lipid peroxidation in the digestive gland of mussels: the role of the antioxidant defence systems, *Experientia*, 47, 454-457.
- WENNING, R.J., DI GIULIO, R.T. & GALLAGHER, E.P., 1988, Oxidant-mediated biochemical effects of paraquat in the ribbed mussel *Geukensia demissa*, *Aquat. Toxicol.*, 12, 157-170.
- WENDEL, A., 1981, Glutathione Peroxidase in *Methods in Enzymology*, 77, 325-332.
- WILHELM FILHO, D. GIULIVI, C. & BOVERIS, A., 1993, Antioxidant defences in marine fish-I. Teleost, *Comp. Biochem. Physiol.*, 106C, 409-413.
- WINSTON G.W. & Di Giulio R.T., 1991, Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms, *Aquat. Toxicol.*, 19, 137-161.
- WOFFORD, H.W. & THOMAS, P., 1988, Peroxidation of mullet and rat liver lipids in vitro : effects of pyridine nucleotides, iron, incubation buffer, and xenobiotics, *Comp. Biochem. Physiol.*, 89C, 2, 201-205.
- YIM, M.B., CHOCK, P.B. & STADMAN, E.R., 1990, Copper zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 5006-5010.

## MOTS CLES (Stress oxydant. Cossu et al.)

La liste de ces mots clés pourra être donnée sur disquette en même temps que le texte.

Acide gras polyinsaturé  
Acide lipoïque  
Acide thiobarbiturique  
ADN, dommages  
AGPI, voir acide gras polyinsaturé  
Aldéhyde  
Anion superoxyde O<sub>2</sub>-  
Antioxydant  
Base de Schiff  
BSO, voir buthionine sulfoximide  
Buthionine sulfoximide  
Capteurs de radicaux  
β carotène  
Caroténoïdes  
Catalase  
Contaminants  
    HAP, hydrocarbures polycycliques aromatiques  
    métaux  
    ménadione  
    paraquat  
    PCB, polychlorobiphényles  
CuZnSOD  
DEM, voir diéthylmaléate  
2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine  
Diazoïque, dérivé  
Diène conjugué  
Diéthylmaléate  
5-5-diméthylpyrrolidine-oxyde  
DMPO, voir 5-5-diméthylpyrrolidine-oxyde  
DMSO, voir diméthyl sulfoxyde  
7,8-dihydro-8oxo-2'deoxyguanosine  
Espèce réactive de l'oxygène  
Espèce réactive  
Ethylmaléimide  
FapyGua, voir 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine  
FeSOD  
Fenton, réaction de  
Flavonoïdes  
Formamidopyrimidine-ADN glycosylase  
FPG, voir formamidopyrimidine-ADN glycosylase  
Glutathion  
Glutathion peroxydase sélénium-dépendante  
Glutathion peroxydase-sélénium indépendante  
Glutathion réductase  
Glutathion synthétase  
GSH, voir glutathion  
Haber Weiss, réaction d'

Hydroperoxy radicaux  
Hydroxylaminés, dérivé  
4-hydroxynonanal  
Lésions oxydatives à l'ADN  
Lipofuschine  
Lipoperoxydation  
Malondialdéhyde  
Mannitol  
MDA, voir malondialdéhyde  
Métal de transition  
Méthodes de référence, stress oxydant  
MnSOD  
N-éthylmaléimide  
Nitroaromatique, dérivé  
OH°, voir radical hydroxyl  
oxo<sup>8</sup>dG (8 OHdG ou 7,8-dihydro-8oxo-2'deoxyguanosine)  
Oxygène singulet <sup>1</sup>O<sub>2</sub>  
Peroxydation lipidique, voir lipoperoxydation  
Peroxyde d'hydrogène  
Quinone  
Radical alcoxyle (RO-)  
Radical hydroxyle  
Radical libre  
    formation, stabilité, diffusibilité  
Réaction photochimique  
Réaction radicalaire  
Résonance paramagnétique électronique  
ROS, voir espèce réactive de l'oxygène  
RPE, voir résonance paramagnétique électronique  
Sédiments,  
    milieu dulçaquicole  
    milieu marin  
SOD, voir superoxyde dismutase  
Spin-trapping  
Superoxyde dismutase  
Systèmes redox  
Système de réparation  
    protéines, ADN,  
TBA, voir acide thiobarbiturique  
Thiourée  
α tocophérol  
Transferrine  
Ubiquinol  
Urée  
Vitamine A  
Vitamine C  
Vitamine E

**Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase and glutathione levels as biomarkers of contamination in freshwater bivalves**

DOYOTTE, A., COSSU, C., JACQUIN, M.C., BABUT, M. and VASSEUR, P.

Article accepté sous réserve de modifications dans *Aquatic Toxicology*.

Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase and glutathione levels as biomarkers of contamination in freshwater bivalves.

Aurélie DOYOTTE\*, Carole COSSU\*, Marie-Cécile JACQUIN\*, Marc BABUT\* and Paule VASSEUR\*\*.

\* Centre des Sciences de l'Environnement, Université de Metz, BP 4025, F-57040 METZ Cédex.

\* Agence de l'Eau Rhin-Meuse, BP 19, Rozérieulles, F-57061 MOULINS LES METZ.

Key words: Antioxidant systems - Glutathione reductase - Glutathione peroxidases - Glutathione - Freshwater bivalves - *Unio* sp. - contaminated sediments - copper and thiram.

♦ to whom correspondence should be addressed.

## Abstract.

The aim of this work was to evaluate the potential utility of antioxidant parameters as indicators of exposure to toxicants and of toxic effects in a fresh water mussel, *Unio tumidus*. Antioxidant enzymes (glutathione peroxidases, glutathione reductase, superoxide dismutase, catalase), redox status of glutathione and lipid peroxidation were measured at first in the gills and the digestive glands of mussels after exposure to copper (30  $\mu\text{g/l}$ ) or/and thiram (100  $\mu\text{g/l}$ ) for 3 days. Effects of a complex industrial effluent on antioxidant system were investigated afterwards during a field study : mussels encaged were placed upstream and downstream the pollution source (cokery) for one week. These studies demonstrated that in both experimental exposures, the most sensitive parameters were selenium-dependent glutathione peroxidase activities, glutathione levels and especially glutathione reductase activities which were significantly decreased. In contrast, superoxide dismutase and catalase activities remained generally constant for all the treatment groups compared to controls. Lipid peroxidation, as measured by malonaldehyde contents, was slightly enhanced in some experimental conditions and this increase was concomittant most often with a depletion of antioxidant defences. Responses of antioxidant parameters were globally greater in the gills than in the digestive glands of exposed mussels. Those results suggest that among antioxidant defence system, SeGPx , GSH levels and particularly GRd could represent biomarkers of interest for the estimation of the effects of environmental contamination on freshwater invertebrates.

## INTRODUCTION

Over the past few years, increasing emphasis has been placed on the use of biomarkers as tools for monitoring environmental quality as well as the fitness of organisms inhabiting ecosystems (Stegeman *et al.*, 1992). The potential utility of oxyradical-mediated responses to provide biochemical markers for biomonitoring gave rise to studies on antioxidant defences (Di Giulio *et al.* 1989 ; Winston and Di Giulio, 1991). Antioxidant defences, present in all aerobic organisms, include antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidases and glutathione reductase) and free radical scavengers (vitamines C and E, carotenoids, glutathione). When antioxidant defences are impaired or overcome, oxidative stress can lead to biological damage affecting nucleic acids, proteins and lipids. Studies on vertebrates and invertebrates were carried out on marine species demonstrating that the antioxidant systems could be relevant indices in explaining the sensitivity of some aquatic species (Wenning *et al.*, 1988 ; Di Giulio *et al.*, 1993 ; Lemaire and Livingstone, 1993 ; Livingstone *et al.*, 1993). The goals of this study were to see if these systems could be useful indicators of exposure and of toxic effects to toxicants in freshwater bivalves. Bivalve molluscs are filtering sedentary species, especially prone to the accumulation of any kind of contaminant (Livingstone *et al.* , 1990). They can easily be transferred from control to contaminated areas, which make them quite appropriate for studying the impact of pollution sources in field studies. The freshwater bivalves, *Unio tumidus*, are autochthonous and benthic species which may be useful to monitor the quality of sediments. Antioxidant enzymatic activities (glutathione peroxidases, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase), glutathione levels and lipid peroxidation were measured in the digestive glands and the gills of *Unio tumidus*, under several conditions of exposure. At first, experimental exposure of mussels to copper or/and thiram were carried out in order to evaluate the sensitivity of antioxidant parameters. Field studies involving the exposure of transferred bivalves from a control area to a site contaminated by industrial effluents were conducted afterwards.

The results showed that in both conditions the most sensitive parameters were glutathione reductase and selenium-dependent glutathione peroxidase activities as well as reduced glutathione levels. A decrease of these parameters could be registered after a short period of exposure, suggesting the potential interest of these parameters as biomarkers of aquatic contamination. A relationship could be found between biochemical responses and the degree of pollution. Thorough physico-chemical analysis of contaminants in sediments would have

been needed in order to establish more closely the chemical factors responsible for the changes in antioxidant parameters.

## MATERIELS AND METHODS.

Mussels (*Unio tumidus*) were sampled from a control site. A chemical analysis of control site sediments was performed : total PAHs and PCBs were respectively 38 and 1.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dry weight. Chlorophenols were less than 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dry weight and organochlorinated pesticides less than 0.20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  d.w. (dry weight). Metal concentrations were the following (mg/kg dry weight) : As (10), Cr (11), Cu (8), Cd (< 1), Pb (8), Hg (< 0.05) and Ni (16). The concentrations of contaminants in sediments at the outfall of the contaminated effluent (downstream 1) were as follows : total PAHs and PCBs were respectively 15751 and 1245  $\mu\text{g}/\text{kg}$  d. w. ; chlorophenols and organochlorine pesticides were under 10 and 0.25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  d. w. respectively. Metal concentrations were the following (mg/kg dry weight) : As (29), Cr (78), Cu (93.5), Cd (< 1), Pb (198), Hg (18) and Ni (56).

### *Experimental exposure of bivalves.*

Mussels (*Unio tumidus*) were collected in October, and placed in static aquaria. Their freshwater was renewed daily. Mussels were exposed to desionized water containing copper (30  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) or/and thiram (100  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) during a 3-day period. Thiram was introduced into the test medium by means of DMSO (0.05 % in the medium). Two control media were prepared with or without DMSO. After 3 days of exposure, the digestive glands and the gills were immediately removed and kept frozen at  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  in liquid nitrogen until they were analyzed.

### *Field study.*

Mussels (*Unio tumidus*) were collected in June from the control site. They were immediately transplanted in the studied areas where they were kept in cages. The cages were placed upstream from the pollution source (complex effluent of a cokery), downstream near the outfall of the cokery (downstream 1) and further from the outfall (downstream 2). Mussels encaged at the reference site served as controls. After one week of exposure, mussels were removed from each site. Digestive glands and gills were immediately sampled and frozen in liquid nitrogen. The organs were stored in liquid nitrogen until they were analyzed

We had previously checked that caging of mussels had no effect on the biochemical parameters studied.

### *Sample preparations and biochemical assays.*

The responses of antioxidant enzymes and glutathione levels were studied in the cytosolic (S12000) and particulate (P12000) fractions. Biochemical measurements would also be performed in the whole homogenate (S500) in some samples to determine the usefulness of fractioning the tissues. Subcellular fractions for enzymatic and glutathione assays were prepared as follows. Individual digestive glands and gills were homogenized, to a  $\frac{1}{4}$  (w/v) and  $\frac{1}{2}$  (w/v) ratio respectively, in 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  buffer (pH 7.6) containing 1 mM PMSF (phenyl methyl sulfonic fluoric acid) and 1 mM L-serine borate buffer, using an Elvehjem potter. The homogenates were then centrifuged at  $500\times g$  for 15 mins. The  $500\times g$  supernatant was centrifuged at  $12000\times g$  for 30 mins. in order to separate the cytosolic (S12000) and particulate (P12000) fractions. All these steps were carried out at  $4^\circ\text{C}$ .

Catalase (CAT) activity was determined as described by Beers and Sizer (1952). Glutathione reductase (GRd) activity was measured according to Carlberg and Mannervick (1985). Selenium-dependent (SeGPx) and non selenium-dependent glutathione peroxidase activities were determined using the method of Paglia and Valentine (1967) with cumene hydroperoxide (6 mM) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3 mM) as substrates respectively. Superoxide dismutase (SOD) activity was measured according to Paoletti *et al.* (1986) ; prior to analysis, subcellular fractions were passed down Sephadex G25 columns (Pharmacia) to remove small molecules. Reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione were quantified using the HPLC technique with post-column derivatization according to Leroy *et al.* (1993) : this technique allows direct determination of GSH and GSSG, and therefore presents advantages compared to the measurement of glutathione contents with the spectrophotometric method (Anderson, 1985). Lipid peroxidation was estimated in the whole homogenate according to the measurement of malonaldehyde (MDA). MDA levels were determined with the HPLC technique adapted from Behrens and Madere (1991) with UV detection (267 nm). MDA was separated on a reverse phase C18 column and eluted with sodium phosphate buffer pH 6.5 containing 25 % ethanol and 0.5 mM tetradecyltrimethylammonium bromide.

Protein determination was carried out according to Bradford (1976).

### *Statistical analysis*

The statistical significance between the controls and the treated animals was tested with Student's *t*-test or Dunnett's *t*-test. Tests for data normality and ANOVA analysis were carried out previously.

## RESULTS.

### *Experimental exposure of bivalves to copper and thiram.*

The results showed that in all treatment groups the most significant changes in the antioxidant parameters analyzed were observed for SeGPx activities, GRd activities and GSH levels. SeGPx activities decreased compared with controls in the gills of mussels in all the contaminated media but mainly in the presence of thiram. In the digestive glands, the inhibition of SeGPx was only seen when thiram was combined with copper, which indicated synergic effects between the two compounds in this tissue (figures 1A and 1B). The decrease of total GPx activity resulted from the decrease of selenium-dependent enzyme activity (table 1).

GRd activities were also markedly lower in the gills and in the digestive glands in all the treated groups compared to the controls (figures 1C and 1D). The inhibition of GRd activities for the mixture of thiram with copper was of the same order of magnitude as for copper and thiram alone. In contrast to these changes, SOD activities remained constant under all the exposure conditions (table 1). Catalase activities were slightly diminished in the two tissues under exposure to copper or/and thiram (table 1). The decline in GSH levels for mussels exposed to copper and copper combined with thiram paralleled the decrease in SeGPx and GRd activities (figures 1E and 1F). The greatest depletions of reduced glutathione were observed in the digestive glands and the gills when copper and thiram were combined (tables 4 and 5). A 1.2 to 1.5 fold increase in GSSG levels associated with a decrease in GSH levels was seen in the digestive gland after exposure to copper (figure 1F). In the gills, a slight increase (23 %) of GSSG levels concomitant with a minor increase in MDA contents was registered when thiram and copper were combined (figure 1F). Such an increase in GSSG was not observed in the hepatic tissue where concentrations decreased by 37 to 52 % depending on the fractions (figure 1E).

The biochemical measurements were carried out on the whole homogenate (supernatant 500g) instead of the subcellular fractions in five additional animals exposed to copper mixed with thiram, compared to five additional controls. The changes in the antioxidant parameters observed in the whole homogenates (S500) of the two tissues were the same as

in the subcellular fractions (Table 2). Lipid peroxidation was more than twice compared to control values in both tissues. One of the five mussels displayed a high sensitivity to lipid peroxidation: it is worthwhile to note that this mussel (CuTh 1) with the highest MDA levels displayed in the same time the lowest values of the antioxidant parameters, and specially in the gills (figure 2). This underlines the relationship between lipid peroxidation and deficiency of antioxidant systems.

#### *Field study.*

Field studies were conducted in order to evaluate the impact of the sediments contaminated by the effluent of a cokery on benthic species. The effluent itself tested for short term toxicity could not be proved to be toxic. Mussels engaged upstream and at the reference site had similar antioxidant enzymatic activities, glutathione levels and MDA contents (figure 3). In contrast, mussels engaged downstream near the outfall of the cokery (downstream 1) had lower GRd and SeGPx activities in the digestive glands and in the gills compared to upstream values (figures 2A and 2B). GRd activities were reduced to a greater extent than SeGPx. The decrease in GRd activity could be registered in the two tissues, but specially in the digestive glands at downstream 1 and downstream 2 (figures 2C, 2D). The inhibition of GRd activity could reach 72 % at downstream 1 compared with upstream in hepatic fraction (P 12000). The nearer the site was to the outlet, the more pronounced the decrease of GRd activity was. GSH contents were lower in gill fractions by about 40 % at downstream 1 and at downstream 2 (figures 2E and 2F). In the digestive glands, only cytosolic GSH exhibited a depletion in mussels engaged at downstream 1 (29 %) and at downstream 2 (17 %). Oxidized glutathione levels had slightly increased in the gills at downstream 2 but on contrary decreased in the digestive glands at downstream 1. The other parameters, SOD and catalase activities, remained constant (table 3).

#### *DISCUSSION*

For both the experimental exposure and the field study, marked changes were observed for GRd, SeGPx activities and glutathione levels in the digestive glands and the gills of contaminated mussels. The other parameters, SOD and catalase activities, were not particularly modified in the conditions studied. Decreases among parameters of antioxidant defence reflect that mussels are under oxidative stress as the result of exposure to prooxidant chemicals. It should be pointed out that the decrease of GRd activities was observed in the two situations studied : under exposure to copper or/and thiram, as well as

to contaminated sediments. Due to the early changes in GRd activity, this enzyme may be considered as a valuable indicator of exposure. Glutathione reductase has a crucial role in cellular antioxidant protection because of its ability to regenerate reduced glutathione. Indeed, a marked reduction of GRd activity may result in GSH depletion if the synthesis of glutathione cannot be efficiently increased to maintain GSH redox status. A depletion of reduced glutathione due to low GRd and glutathione synthetase activities was shown by Hasspieler *et al.* (1994) to explain the sensitivity of *Brown bullhead* to carcinogenic pollutants. During exposure to copper or/and thiram, as well as to contaminated sediments, hepatic and gill GSH depletion was associated with a decrease in GRd activities, suggesting the bivalves were in a precarious state. GRd activity has rarely been studied by authors interested in antioxidant enzymatic activities in aquatic species. Only Patel *et al.* (1990) who carried out experiments on a marine bivalve, *Anadara granosa*, found a decreased GRd activity associated with an increased total GSH under exposure to mercury (0.1 mg/l) and to a mixture of mercury and selenium (1 mg/l) for 4 days.

In our study, though SeGPx and GRd activities generally decreased in parallel, SeGPx seemed to be a less sensitive enzyme than GRd ; indeed, changes in GRd activities alone were seen in certain exposure conditions. A slight inhibition of GPx activity had also been reported in cadmium contaminated *Micropogonias undulatus* (Thomas and Wofford, 1993) and in dabs exposed to sediments contaminated with 300 mg/kg d.w. PAHs and 15 µg/kg PCBs (Livingstone *et al.*, 1993). In fact, a depletion of antioxidant defences is not systematic under exposure to pollutants and some other authors found an induction of these systems (Gabrielak and Klekot, 1985; Di Giulio *et al.*, 1993 ; Nishimoto *et al.*, 1995). An increase in antioxidant enzymes and glutathione content could be observed in Mugil species sampled in contaminated rivers (Rodriguez-Ariza *et al.*, 1993). In the latter case, the contamination of sediments by PAHs (44 mg/kg) and PCBs (2.3 mg/kg) which was only slightly higher than in our study, cannot explain the different response profiles. Rather, an induction of antioxidant systems may reflect an adaptation of species inhabiting contaminated sites. A depletion, as observed in this study, may represent a first response to pollutants which can be followed by an induction of antioxidant systems. Indeed, transient changes with time were registered by some authors (Gabrielak and Klekot, 1985 ; Wenning *et al.*, 1988 ; Di Giulio *et al.*, 1993 ; Livingstone *et al.*, 1993). It would have been interesting to extend our field study beyond 8 days in order to follow the different phases of the response of the studied parameters.

We would expect an increase in oxidized glutathione concentrations given the depletion of reduced glutathione levels and the marked decrease in GRd activities. However, in most

cases, GSSG concentrations decreased or were unaffected. This suggests that a pathway other than the consumption of GSH by glutathione peroxidase is involved in GSH depletion. In fact GSH can be used as a substrate of glutathione-S-transferases and participates also in the conjugation and in the detoxification processes of pollutants. Considering the high levels of polycyclic aromatic hydrocarbons and of chlorinated pollutants in the sediments at downstream 1, the involvement of glutathione S-transferases in such detoxification processes must be great. It would have been useful to measure this enzyme activity in order to evaluate this pathway.

Several studies have shown enhanced lipid peroxidation in aquatic organisms exposed to high concentrations of xenobiotics (Gabrielak and Klekot, 1985 ; Bano and Hassan, 1988 ; Viarengo *et al.*, 1988 ; Wenning *et al.*, 1988 ; Ribera *et al.*, 1991 ; Thomas and Wofford, 1993) and of pollutants in contaminated sediments (Di Giulio *et al.*, 1993 ; Livingstone *et al.*, 1993). In our study, MDA was increased mainly during experimental exposure of *Unio* to copper and to copper mixed with thiram. These results obtained with low concentrations of the two compounds, expressed the high oxidative properties of copper, and specially in the presence of thiram. It should be noted that the highest concentrations of MDA were paralleled with the lowest activity of antioxidant systems. A depletion of antioxidant defences could thus be considered as a valuable biomarker of toxicity as well as exposure in contaminated species.

When compared, there was no difference in the profiles obtained between antioxidant responses in the subcellular fractions and the whole homogenates in the experiment with copper or/and thiram : it could be concluded that fractionation of the homogenates is not necessary. Yet, it seems difficult to generalize from this case. The comparison was not studied in mussels exposed to contaminated sediments. Nevertheless, it appeared that the cellular compartments presented different oxidative states : for instance, the decrease in GRd activity was more pronounced in the particulate fraction than in the supernatants ; in contrast, GSH depletion was more pronounced in the supernatants. Therefore, performing measurements in whole homogenates instead of fractions would reduce the apparent effects of the treatments and, consequently, is not advisable without further studies.

Seen as a whole, our results suggest that among parameters of antioxidant defence system SeGPx activities, GSH levels and particularly GRd activities can be useful tools for monitoring environmental pollution expressing the precarious state of organisms.

Further *in situ* studies will be needed to validate and identify the most reliable biomarkers for exposure to toxic pollutants (PAHs, PCBs and other organochlorines, trace metals).

These studies are essential in order to (i) ascertain the responsiveness and the sensitivity of SeGPx and GRd activities and GSH levels under different profiles of contamination, and (ii) confirm their interest as biomarkers for exposure to pollutants. It is also essential to integrate the time factor in *in situ* studies, in order to determine the degree of reversibility of the effects and the adaptation of species.

## CONCLUSION.

Considering the complex mixture of contaminants in aquatic ecosystems, antioxidant parameters represent biomarkers of interest due to the aspecific character of their response. Nevertheless, further research is required to clear up fundamental processes (e.g. glutathione regulation mechanism), specificity, dose-response and mechanistic studies. Transfer studies offer the advantage of being independent of natural variables (seasonal variation, temperature, salinity,....) since the organisms used come from the same sampling site. Such studies are quite appropriate for evaluating the impact of pollution on benthic species. Antioxidant enzymes such as GRd and SeGPx, as well as GSH levels may be promising indicators of an oxidant impact on aquatic organisms. GRd deserves consideration when studying antioxidant parameters due to the precocity and the sensitivity of its response, as is shown by our results. Finally biomarkers should not be applied alone, but integrated into ecotoxicological research programs including the chemical analysis of contaminants, physiological studies of animal conditions and the quality of the ecosystem.

## Acknowledgements.

The authors acknowledge the Center of analysis and research, University Louis Pasteur (Illkirch-Graffenstaden) for the chemical analysis of the sediments. This study was supported by the French Ministry of Environment, SNEA and the Comité Inter-Agences of the French Water Authorities. They would like to specially thank Pr. EXINGER for their participation in this study. Their thanks also to T. CARMONA for reading over this paper.

## References.

- Anderson, M.E. (1985) Determination of glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymol.* 113, 548-555.
- Bano, Y. and M. Hasan (1989) Mercury induced time-dependent alterations in lipid profiles and lipid peroxidation in different body organs of catfish *Heteropneustes fossilis*. *J. Environ. Sci. Health B24(2)*, 145-166.
- Beers, R.F. and I.W. Sizer (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195, 133-190.
- Behrens, W.A. and R. Madere (1991) Malonaldehyde determination in tissues and biological fluids by ion-pairing high-performance liquid chromatography. *Lipids* 26, 3, 232-236.
- Carlberg, I. and B. Mannervik (1985) Glutathione reductase. *Methods in Enzymol.* 113, 484-489.
- Di Giulio, R.T., P.C. Washburn, R.J. Wenning, G.W. Winston and C.S. Jewell (1989) Biochemical responses in aquatic animals : a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 1103-1123.
- Di Giulio, R.T., C. Habig and E.P. Gallagher (1993) Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquat. Toxicol.* 26, 1-22.
- Gabryelak, T. and J. Klekot (1985) The effect of paraquat on the peroxide metabolism in erythrocytes of freshwater fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 81C, 2, 415-418.
- Hasspieler, B.M., J.V. Behar, D.B. Carlson, D.E. Watson and R.T. Di Giulio (1994) Susceptibility of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) to oxidative stress : a comparative study. *Aquat. Toxicol.* 28, 53-64.

Lemaire, P. and D.R. Livingstone (1993) 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. Physiol. 1, 1119-1150.

Livingstone, D.R., P. Garcia Martinez, X. Michel, J.F.Narbonne, S. O'Hara, D. Ribera and G.W. Winston (1990) Oxyradical production as pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and others bivalves. Funct. Ecol. 4, 415-424.

Livingstone, D.R., P. Lemaire, A. Matthews, L. Peters, D.Bucke and R.J. Law (1993) Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and others chemicals. Mar. Poll. Bull. 26, 11, 602-606.

Leroy, P., A. Nicolas, C. Thioudulet, T. Oster, M. Wellmann and G. Siest (1993) Rapid liquid chromatography assay of glutathione in cultured cells. Biomed. Chrom. 7, 86-89.

Nishimoto, M., B.T. Le Eberhart, H.R. Sanborn, C. Krone, U. Varanasi and J.E. Stein, J.E. (1995) Effects of a complex mixture of chemical contaminants on hepatic glutathione, L-cysteine and  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase in English sole (*Pleuronectes vetulus*). Environ. Toxicol. Chem. 14, 3, 461-469.

Paglia, D.E. and W.N. Valentine, (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J. Lab. Clin. Med. 70, 158-169.

Paoletti, F., D. Aldinucci, A. Mocali and A.Caparrini (1986) A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. Anal. Biochem. 154, 536-541.

Patel, B., J.P. Chandy. and S. Patel (1990) Effect of mercure, selenium and glutathione on sulphhydryl levels and glutathione reductase in blood clam *Anadara granosa* (L). Ind. J. Mar. Sc. 19, 187-190.

Ribera D., J.F. Narbonne, X. Michel, D.R. Livingstone and S. O'Hara (1991) Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 1/2, 177-181.

Rodriguez-Ariza. A., J. Peinado, C. Pueyo and J. Lopez-Barea (1993) Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 50, 2568-2573.

Stegeman, J.J., M. Brouwer, R.T. Di Giulio, L. Förlin, B.A. Fowler, B.M. Sanders and P.A. Van Veld (1992) Molecular responses to environmental contamination : enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In : Biomarkers, biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress edited by Huggett, R.J., R.A. Kimerle, P.M. Mehrle and H.L. Bergman. Lewis Publishers, USA.

Thomas, P. and H.W. Wofford (1993) Effects of cadmium and Aroclor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in *Atlantic croaker* tissues. *Aquat. Toxicol.* 27, 159-178.

Viarengo, A., M. Pertica, L. Canesi, F. Biasi, G. Cecchini and M. Orunesu (1988) Effects of heavy metals on lipid peroxidation in mussels tissues. *Mar. Environ. Res.* 24, 354.

Wenning, R.J., R.T. Di Giulio and E.P. Gallagher (1988) Oxidant-mediated biochemical effects of paraquat in the ribbed mussel, *Geukensia demissa*. *Aquat. Toxicol.* 12, 157-170.

Winston, G.W. and R.T. Di Giulio (1991) Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137-161.

Figure 1 : Responses of selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione reductase and redox status of glutathione in gills and digestive glands of mussels *Unio tumidus* to 3 days exposure to copper (30  $\mu\text{g/l}$ ), thiram (100  $\mu\text{g/l}$ ) and a combination of copper with thiram (respectively 30  $\mu\text{g/l}$  and 100  $\mu\text{g/l}$ ).

Enzymatic activities are expressed in nmole NADPH/min/mg protein and glutathione concentrations are expressed in nmole/mg protein.

Figures 1E and 1F represent the redox status of glutathione in the total homogenates. Glutathione levels in the cytosolic and the particulate fractions have been added to simplify the presentation : this presentation did not modify the results obtained in the fractions taken separately.

The symbols\* and ★ represent a significant decrease and a significant increase compared to control values respectively.

Figure 2 : Percentages of antioxidant enzyme activities, GSH, GSSG and MDA levels determined in the whole homogenates of digestive glands and gills of 5 mussels (*Unio tumidus*) exposed for 3 days to a combination of copper (30  $\mu\text{g/l}$ ) and thiram (100  $\mu\text{g/l}$ ), in comparison with controls.

Figure 3 : Responses of selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione reductase and redox status of glutathione in gills and digestive glands of mussels *Unio tumidus* after 8 days of exposure at a site contaminated with the effluents of a cokery.

Enzymatic activities are expressed in nmole NADPH/min/mg protein and glutathione concentrations are expressed in nmole/mg protein.

The symbols\* and ★ represent a significant decrease and a significant increase compared to control values respectively.

GPX

S12000  
P12000

Rd

athione  
dox  
atus

GSH tot  
GSH  
GSSG

### GILLS

### DIGESTIVE GLANDS

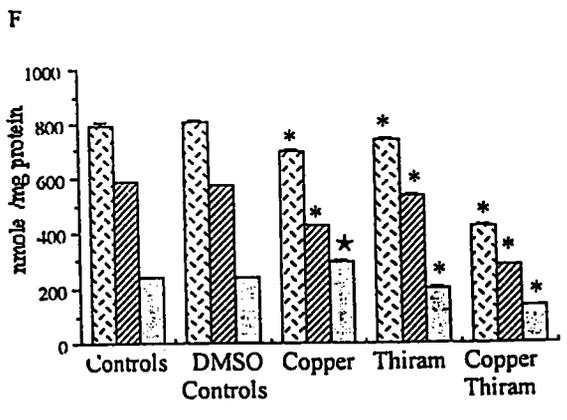
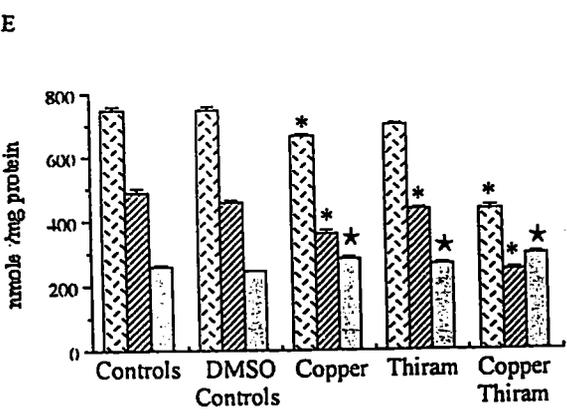
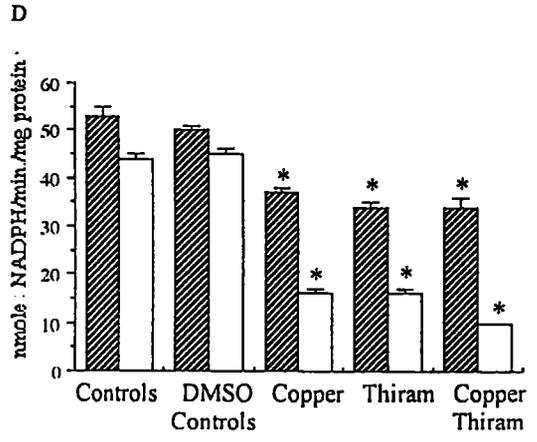
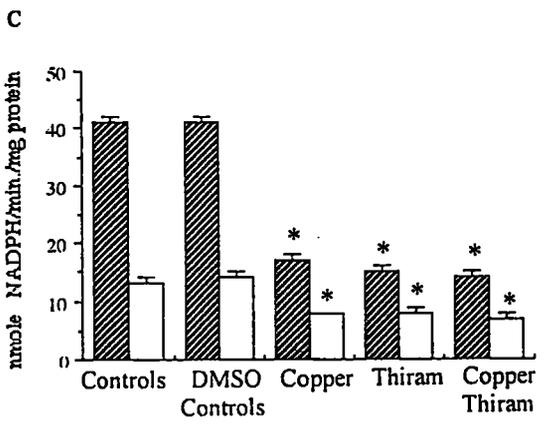
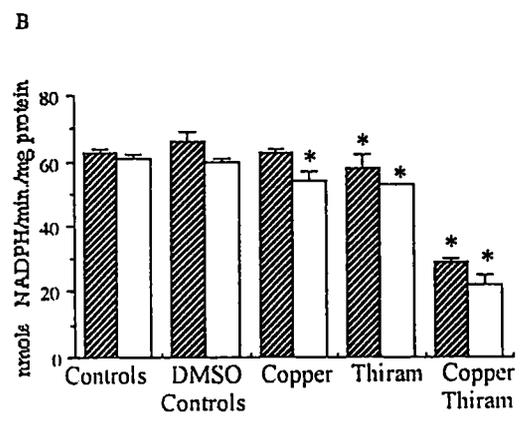
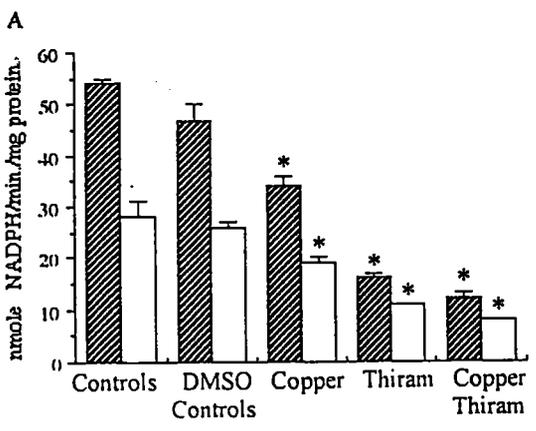
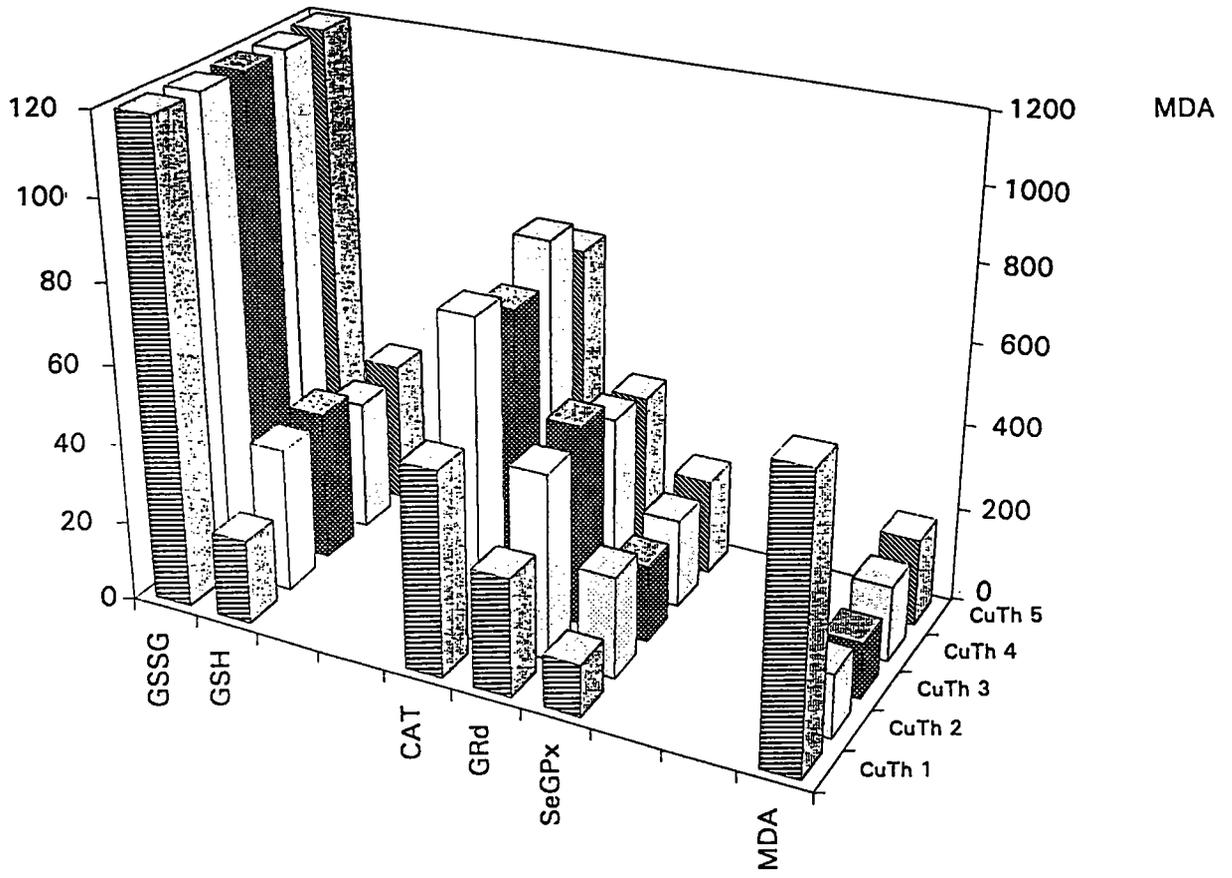
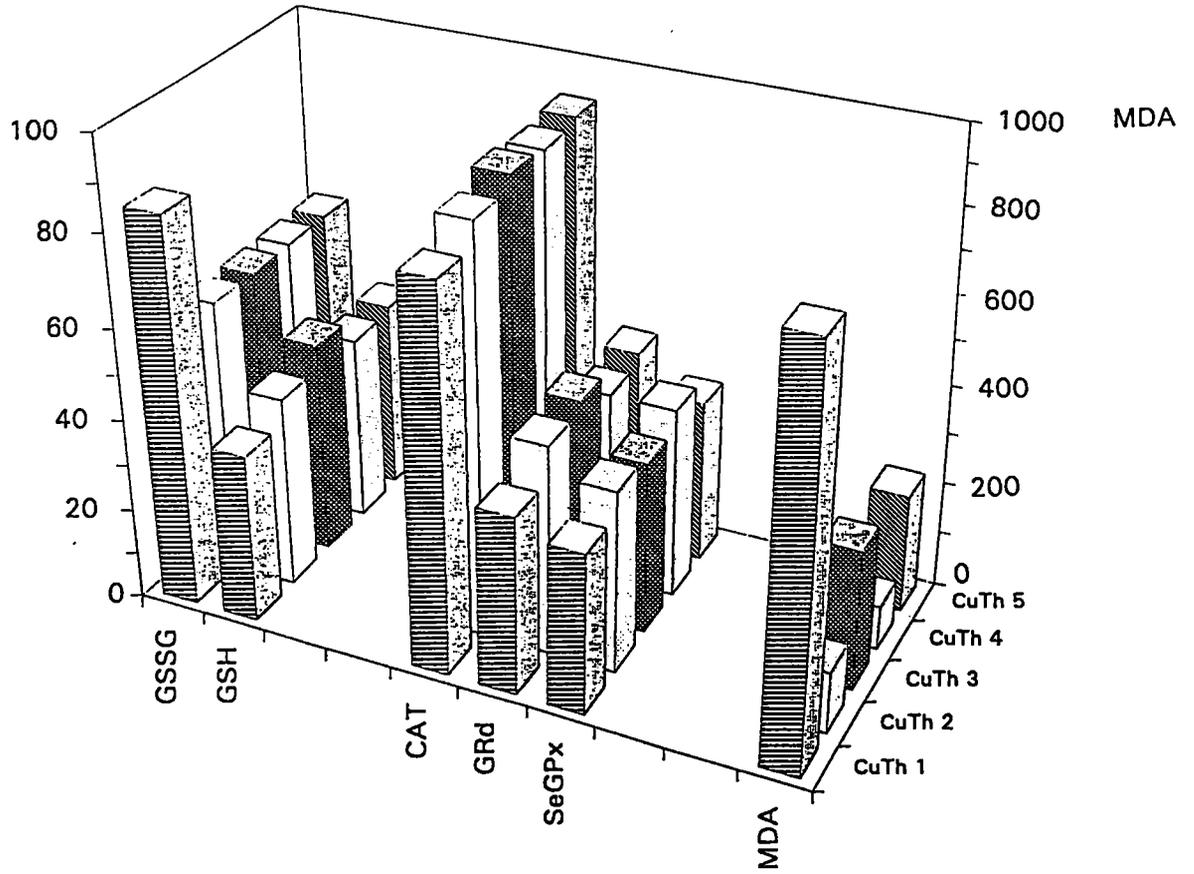


Fig. 1

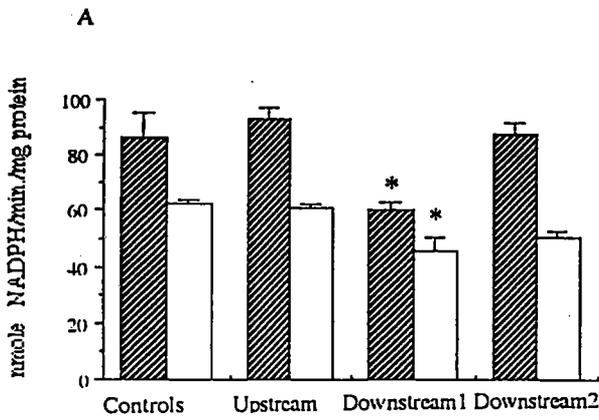
GILLS



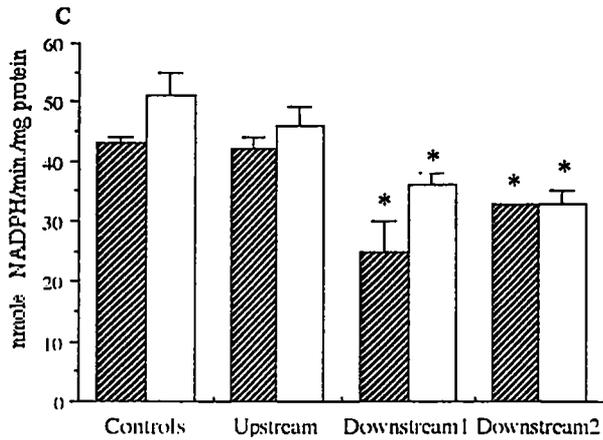
DIGESTIVE  
GLANDS



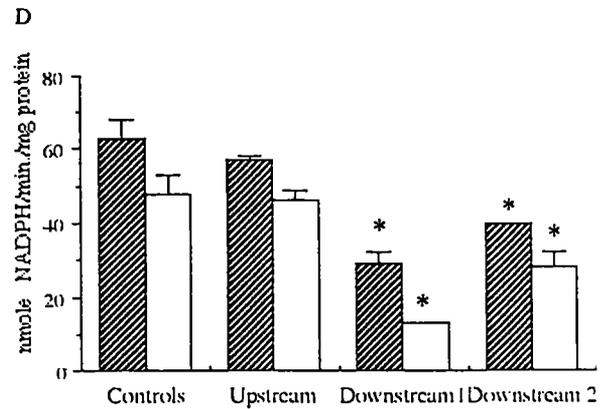
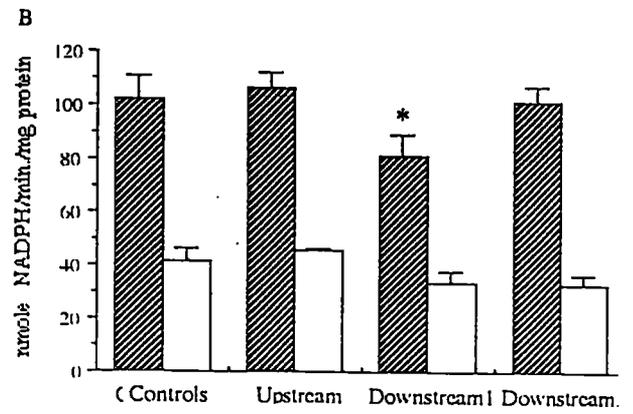
## GILLS



■ S12000  
□ P12000

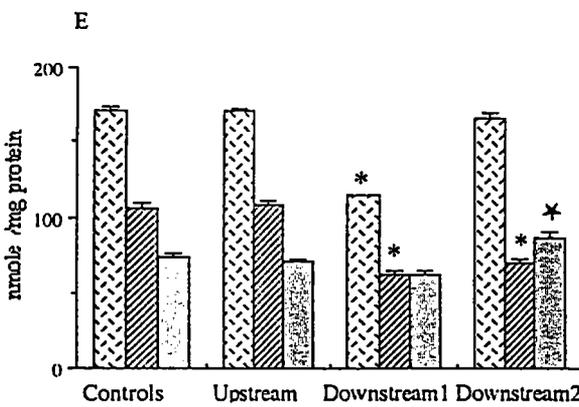


## DIGESTIVE GLANDS

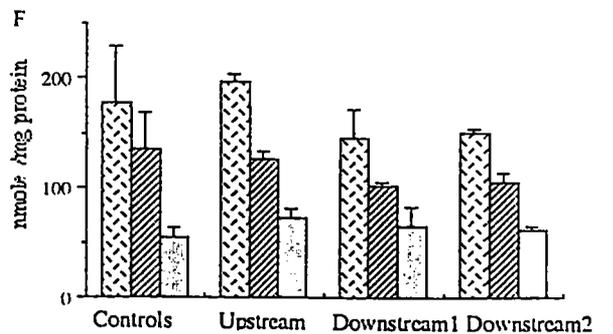


thione redox  
status

Particulate fraction



■ GSH tot  
▨ GSH  
□ GSSG



Cytosolic fraction

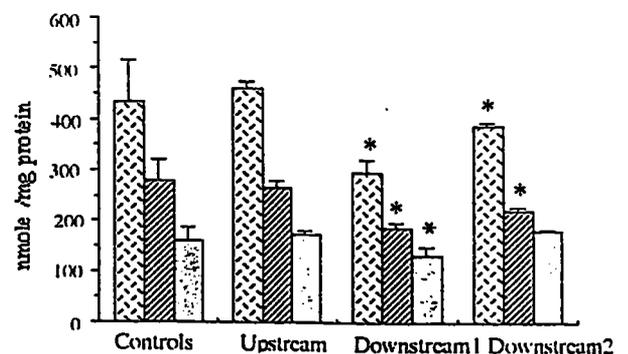
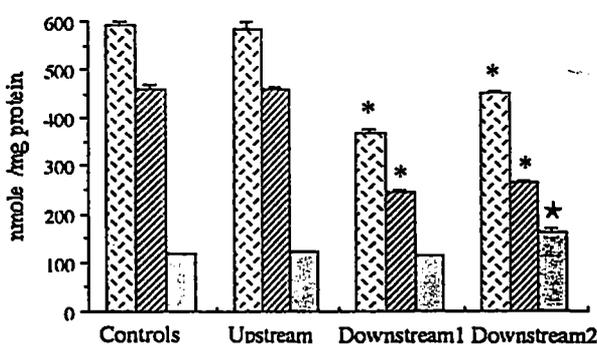


Table 1 : Antioxidant enzyme activities in the digestive glands and the gills of mussels (*Unio tumidus*) exposed to copper (30 µg/l) or/and thiram (100 µg/l).

Activities		Controls		DMSO Controls		Copper		Thiram		Copper + Thiram	
		Digestive gland	Gills	Digestive gland	Gills	Digestive gland	Gills	Digestive gland	Gills	Digestive gland	Gills
GPX tot (a)	S	93 ± 2	65 ± 2	91 ± 4	56 ± 2	89 ± 1*	42 ± 5*	83 ± 4 *	24 ± 3 *	60 ± 6 *	18 ± 2 *
	P	79 ± 2	35 ± 2	79 ± 4	33 ± 4	74 ± 2 *	26 ± 5 *	69 ± 4 *	13 ± 3 *	52 ± 5 *	13 ± 2 *
SeGPx (a)	S	63 ± 3	60 ± 2	66 ± 6	47 ± 2	63 ± 1	34 ± 3 *	56 ± 4 *	16 ± 2 *	29 ± 3 *	12 ± 2 *
	P	61 ± 3	30 ± 2	60 ± 2	26 ± 3	54 ± 3 *	19 ± 2 *	53 ± 3 *	11 ± 2 *	22 ± 5 *	8 ± 2 *
Se ind.GPX (a)	S	30 ± 3	9 ± 1	30 ± 2	10 ± 1	29 ± 1	11 ± 3	26 ± 1 *	8 ± 1 *	29 ± 2	7 ± 1 *
	P	19 ± 3	9 ± 1	20 ± 1	8 ± 1	16 ± 1 *	9 ± 2	17 ± 1 *	7 ± 2	17 ± 1 *	6 ± 0 *
CAT (b)	S	173 ± 11	32 ± 5	174 ± 11	31 ± 9	163 ± 13	30 ± 5	156 ± 14	29 ± 3	148 ± 12 *	27 ± 4 *
	P	708 ± 23	139 ± 15	706 ± 16	134 ± 6	644 ± 12 *	96 ± 8 *	644 ± 12 *	93 ± 5 *	643 ± 12 *	89 ± 2 *
SOD (c)	S	78 ± 15	87 ± 17	84 ± 17	94 ± 26	83 ± 22	101 ± 28	80 ± 24	84 ± 30	95 ± 26	106 ± 26
	P	79 ± 18	73 ± 20	80 ± 14	70 ± 18	78 ± 19	71 ± 18	74 ± 22	61 ± 20	74 ± 9	69 ± 17

(a) : nmole NADPH/min/mg protein

(b) : µmole H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg protein

(c) : U/mg protein

\*P < 0.01, (n=5)

**Table 2 : Ratio of antioxidant parameters determined in whole homogenate (S 500) and subcellular fractions (S 12000 and P 12000) of the digestive glands and the gills of mussels (*Unio tumidus*) exposed to the combination of copper with thiram (respectively 30 µg/l and 100 µg/l) in comparison with controls.**

Organs	Ratio mussels treated by copper + thiram / controls					
	Digestive glands			Gills		
Parameters	S 500	S 12000	P 12000	S 500	S 12000	P 12000
GPx tot	0.6	0.6	0.5	0.3	0.3	0.4
SeGPx	0.4	0.5	0.4	0.2	0.2	0.3
GRd	0.4	0.6	0.2	0.4	0.3	0.5
CAT	0.9	0.9	0.9	0.7	0.8	0.6
GSH tot	0.5	0.5	0.5	0.6	0.6	0.7
GSH	0.4	0.5	0.5	0.3	0.5	0.6
GSSG	0.6	0.6	0.5	1.2	1.2	1.1
MDA	3.4	-	-	2.8	-	-

20 animals were used : 10 for S 500 measurements (5 controls and 5 treated) and 10 for S 12000 and P 12000 measurements (5 controls and 5 treated). All the differences between control and treated animals were statistically significant (P = 0.01) except the values noted in italic.

- : MDA levels were measured only in whole homogenates of the tissues.

Table 3 : Antioxidant parameters in the digestive glands and in the gills of mussels (*Unio tumidus*) transferred to sediments contaminated with a complex mixture of industrial effluents (cokeries).

Activities		Reference site		Upstream		Downstream 1		Downstream 2	
		Digestive gland	Gills						
GPX tot (a)	S	141 ± 15	121 ± 16	148 ± 10	121 ± 3	103 ± 7 *	110 ± 2	119 ± 17	117 ± 5
	P	63 ± 7	76 ± 8	66 ± 8	79 ± 4	49 ± 8 *	59 ± 7 *	36 ± 9 *	76 ± 5
SeGPx (a)	S	102 ± 7	86 ± 5	106 ± 11	93 ± 4	81 ± 4 *	60 ± 7 *	101 ± 6	88 ± 4
	P	42 ± 10	62 ± 2	46 ± 12	61 ± 2	34 ± 7	46 ± 6 *	33 ± 9 *	51 ± 2
Se ind.GPX (a)	S	35 ± 9	33 ± 9	27 ± 4	30 ± 5	20 ± 3	45 ± 6 *	23 ± 6	28 ± 5
	P	19 ± 7	15 ± 4	16 ± 5	17 ± 2	14 ± 4	13 ± 9	12 ± 2	22 ± 4
CAT (b)	S	158 ± 27	105 ± 14	159 ± 25	140 ± 17	155 ± 21	108 ± 17	153 ± 19	141 ± 14
	P	661 ± 62	332 ± 14	757 ± 35	327 ± 38	742 ± 52	306 ± 9	778 ± 40	313 ± 27
SOD (c)	S	68 ± 9	70 ± 8	70 ± 10	93 ± 15	72 ± 14	84 ± 18	75 ± 8	87 ± 13
	P	71 ± 7	84 ± 8	69 ± 3	72 ± 13	72 ± 6	79 ± 12	72 ± 9	70 ± 8
MDA (d)		2 ± 1	2 ± 0	4 ± 2	4 ± 2	2 ± 1	3 ± 1	5 ± 2	4 ± 1

(a) : nmole NADPH/min/mg protein

(b) : μmole H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg protein

(c) : U/mg protein

(d) : ng MDA/ mg protein

\*P < 0.01, (n = 3)

Table 4 : Redox status of glutathione in the gills of mussels (*Unio tumidus*) exposed to copper (30 µg/l) or/and thiram (100 µg/l).

		Controls	DMSO Controls	Copper	Thiram	Copper + Thiram
GSH tot	S	575 ± 17	579 ± 31	526 ± 25 *	546 ± 28 *	320 ± 23 *
	P	180 ± 10	167 ± 26	140 ± 20 *	155 ± 25 *	117 ± 17 *
GSH	S	375 ± 14	356 ± 26	273 ± 25 *	332 ± 17 *	171 ± 17 *
	P	115 ± 5	104 ± 17	87 ± 17 *	100 ± 21	75 ± 14 *
GSSG	S	182 ± 5	163 ± 24	190 ± 16 *	184 ± 22 *	200 ± 21 *
	P	80 ± 3	84 ± 16	93 ± 18 *	79 ± 15	94 ± 14 *

The glutathione levels are expressed in nmole/mg protein.

\*P < 0.01, (n = 5).

Table 5 : Redox status of glutathione in the digestive glands of mussels (*Unio tumidus*) exposed to copper (30 µg/l) or/and thiram (100 µg/l).

		Controls	DMSO Controls	Copper	Thiram	Copper + Thiram
GSH tot	S	587 ± 11	600 ± 27	534 ± 5 *	541 ± 16 *	314 ± 8 *
	P	206 ± 10	204 ± 10	159 ± 11 *	195 ± 11 *	108 ± 7 *
GSH	S	441 ± 12	430 ± 10	318 ± 9 *	414 ± 11 *	210 ± 12 *
	P	143 ± 15	139 ± 8	107 ± 11 *	120 ± 12 *	73 ± 6 *
GSSG	S	142 ± 14	139 ± 10	181 ± 6 *	116 ± 18 *	87 ± 7 *
	P	98 ± 8	101 ± 13	114 ± 9 *	85 ± 6 *	48 ± 6 *

The glutathione levels are expressed in nmole/mg protein.

\*P < 0.01, (n = 5).

## Résumé

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une recherche de biomarqueurs à long terme de pollutions hydriques diffuses. Le rôle des superoxyde dismutases est important dans la lutte contre les stress oxydants, ces enzymes servent à éliminer les radicaux superoxyde formés en conditions physiologiques ou lors de la métabolisation de certains xénobiotiques.

La première partie de ce travail a consisté en la recherche d'une méthode de dosage fiable et rapide. Deux méthodes ont été retenues : la méthode de Paoletti *et al.* (1986) et la méthode de McCord et Fridovich, 1969. Puis les activités ont été déterminées sur des individus de sites témoins non pollués au printemps et en automne. En dehors d'un pic d'activité SOD au mois de septembre, nous n'avons pas mis en évidence de différence entre sites ou entre saisons.

La distinction entre la Mn-SOD et de la CuZn-SOD a été tentée par inhibition de la CuZn-SOD et par isoélectrofocalisation. Le pHi de la CuZn-SOD de *Unio tumidus* est de 4,9. L'encagement des moules n'induit pas de modification des activités SOD.

Des transferts vers des sites contaminés par des PAHs, PCBs et métaux n'ont pas permis de mettre en évidence d'induction ou d'inhibition de l'activité enzymatique totale.

Des intoxications en laboratoire par du cuivre et du thiram ont donné des niveaux de SOD stables quelles que soient les conditions. D'après cette étude, l'activité de la SOD ne répond pas aux critères d'un bon biomarqueur d'exposition à des stress oxydants.

### Mots clés

Biomarqueur ; stress oxydant ; superoxyde dismutase ; eau douce ; moule ; HAP ; PCB ; métaux