



**HAL**  
open science

# Activités de systèmes antioxydants chez *Unio tumidus*, bivalve dulçaquicole en conditions physiologiques et de stress chimique

Carole Cossu Cossu-Leguille

► **To cite this version:**

Carole Cossu Cossu-Leguille. Activités de systèmes antioxydants chez *Unio tumidus*, bivalve dulçaquicole en conditions physiologiques et de stress chimique. Sciences agricoles. Université Paul Verlaine - Metz, 1996. Français. NNT : 1996METZ054S . tel-01777174

**HAL Id: tel-01777174**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01777174>**

Submitted on 24 Apr 2018

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

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



## AVERTISSEMENT

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

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

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

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

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

S/172  
96/4 5

UNIVERSITE DE METZ  
CENTRE DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

THESE

soutenue le 2 Mai 1996

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

mention "Toxicologie de l'Environnement"

Activités de systèmes antioxydants  
chez *Unio tumidus*, bivalve dulçaquicole  
en conditions physiologiques et de stress chimique

Carole LEGUILLE-COSSU

Membres du jury :

- P. VASSEUR, Professeur, Université de Metz, Directeur de thèse  
C. AMIARD, Directeur de Recherche CNRS, Université de Nantes, rapporteur  
J.M. HAGUENOER, Professeur, Université de Lille, rapporteur  
T. CAQUET, Docteur, Université de Paris XI  
M. BABUT, Docteur, Agence de l'Eau Rhin-Meuse, Metz  
P. LEHR, Directeur de Recherche CNRS, Université de Nancy

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 420565 4

127169

*A mes parents, qu'ils trouvent ici l'aboutissement d'un travail auquel ils ont grandement participé. Merci pour toutes années d'encouragement et de soutien.*

*A Pascal, pour son tendre soutien et sa patience.*

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv	1996 1085
Cote	S/M3 96/54
Loc	Magasin



## Remerciements

*Ce travail de recherche a fait l'objet de deux contrats avec l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse et Elf-Atochem qui ont financé la totalité des travaux. L'ensemble des expérimentations a été effectué au laboratoire d'écotoxicologie du Centre des Sciences de l'Environnement (Metz) dirigé par le Professeur Paule VASSEUR.*

*De simples mots ne suffisent pas pour exprimer ma profonde reconnaissance, mon respect et mon admiration pour Paule VASSEUR. Votre bienveillance à mon égard, votre soutien et la confiance que vous m'avez accordés resteront inoubliables pour moi. Je vous remercie de m'avoir fait profiter de vos connaissances et de vos précieux conseils.*

*Je suis reconnaissante à Mme C. AMIARD et Mr J.M HAGUENOER d'avoir accepté de juger ce travail et d'assurer la difficile tâche d'en être les rapporteurs.*

*J'adresse toute ma gratitude à Mr M. BABUT pour m'avoir suivi pas à pas dans cette recherche et d'avoir accepté de juger cette étude.*

*Mes remerciements s'adressent à Mr T. CAQUET et à Mr P. LEHR qui ont accepté de faire partie de ce jury et pour l'intérêt qu'ils porteront à ce mémoire.*

*Merci à toute l'équipe du CSE pour tous les bons moments passés et l'ambiance agréable qui règne au sein du laboratoire.*

*J'en profite également pour remercier Marie - Cécile et Aurélie qui ont toutes deux collaboré à cette recherche. Et plus particulièrement à ces inoubliables moments passés sur le terrain...*

*Je tiens à exprimer ma gratitude à Maryline pour sa sympathique contribution aux tâches les plus variées.*

*Au travers de ces quelques lignes je tiens à adresser mes chaleureuses pensées à Claudine et à Dominique pour leur amitié de tous les instants, pour leur soutien et leurs conseils. Sans oublier Stéphanie et Marie-José pour leur bonne humeur et leur sympathie.*

# SOMMAIRE

	Pages
<b>I.INTRODUCTION</b>	
<b>II.SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
II.1. MECANISMES DE FORMATION, SYSTEMES DE DEFENSE ET EFFETS DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE.	3
II.1.1. La toxicité de l'oxygène.	3
II.1.2. Les espèces réactives de l'oxygène et leurs modes de détection.	3
II.1.3. Sources biologiques des espèces réactives de l'oxygène.	7
II.1.4. Systèmes de défense antioxydants.	8
II.1.4.1. Présentation des systèmes antioxydants.	8
II.1.4.2. Méthodes de dosage des systèmes antioxydants.	13
II.1.5. Effets biologiques des espèces réactives de l'oxygène.	16
II.2. FACTEURS MODULATEURS DES SYSTEMES ANTIOXYDANTS CHEZ LES MAMMIFERES.	17
II.3. LE STRESS OXYDANT CHEZ LES ESPECES AQUATIQUES.	22
II.3.1. Activités antioxydantes endogènes chez les espèces aquatiques.	22
II.3.2. Réponses des organismes aquatiques lors d'expositions à des xénobiotiques.	24
II.3.3. Intérêt des biomarqueurs de stress oxydant en écotoxicologie.	31
<b>III.MATERIEL ET METHODES</b>	
III.1. Matériel biologique et méthodes.	33
III.1.1. Matériel biologique.	33
III.1.2. Echantillonnage - Conservation - Préparation des échantillons.	34
III.1.3. Méthodes analytiques.	37
III.1.3.1. Les enzymes antioxydantes.	37
III.1.3.2. Le glutathion.	41
III.1.3.3. Les protéines totales.	45
III.1.4. Calculs des activités enzymatiques et des taux de glutathion.	45
III.1.4.1. Les activités enzymatiques.	45
III.1.4.2. Les taux de glutathion.	45

	<b>Pages</b>
III.2. Optimisation des méthodes de dosage - Conservation et protocole de préparation des tissus.	47
III.2.1. Optimisation des méthodes de dosage.	47
II.2.1.1. Activités enzymatiques.	47
II.2.1.2. Le glutathion.	49
III.2.2. Conservation et préparation des tissus.	56
III.2.2.1. Conservation des tissus dans l'azote liquide.	56
III.2.2.2. Choix d'inhibiteurs de protéases.	57
<b>IV. RESULTATS</b>	
<u>1ère partie</u> : Activités enzymatiques et taux de glutathion dans les glandes digestives et les branchies d' <i>Unio tumidus</i> .	59
Influence des saisons (printemps et automne), de la période de reproduction (présence ou absence de larves chez les femelles) et du sexe des individus (mâles et femelles).	
<u>2ème partie</u> : Etudes de terrain : mise en cages des bivalves et transfert en amont et en aval d'une source de pollution connue.	64
IV.2.1. Mise en cage et transfert des bivalves d'un site témoin vers un autre site témoin.	64
IV.2.2. Transfert d'une population témoin vers un site contaminé.	65
IV.2.2.1. Exposition de bivalves témoins, pendant 8 jours, à une source de pollution connue .	65
IV.2.2.2. Transfert de bivalves témoins sur 3 sites contaminés : étude de la durée d'exposition.	69
<u>3ème partie</u> : Intoxication des bivalves au laboratoire : évaluation de la sensibilité des paramètres face à un stress chimique.	74
IV.3.1. Essais préliminaires.	74
IV.3.2. Essai définitif.	75
<b>V. DISCUSSION</b>	80
<b>VI. CONCLUSION</b>	88
<b>VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	90
<b>VIII. ANNEXES</b>	

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique  
ARN : acide ribonucléique  
ARN m : acide ribonucléique messenger  
BCNU : 1,3-bis (2-chloroéthyl)-1-nitrosourée  
BSA : albumine de sérum bovin  
BSO : D,L-buthione-S,R-sulfoximide  
Cat. : catalase  
C12000 : culot de centrifugation 12000g (fraction des organites)  
CuOOH : hydroperoxyde de cumène  
CuZn SOD : superoxyde dismutase à cuivre et à zinc  
DDC : diéthylthiocarbamate  
DMPO : 5,5-diméthyl purroline-N-oxyde  
DO : densité optique  
DTNB : acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque)  
DTT : dithiotréitol  
ESR : résonance électronique de spin  
GCS :  $\gamma$  glutamylcystéine synthétase  
G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase  
GPx Se ind. : glutathion peroxydase sélénium indépendante  
GPx tot. : glutathion peroxydase totale  
GRd : glutathion réductase  
GSH : glutathion réduit  
GSSG : glutathion oxydé  
HAPs : hydrocarbures aromatiques polycycliques  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène  
HPLC : chromatographie liquide haute performance  
K<sub>m</sub> : constante cinétique d'une enzyme pour son substrat  
MDA : malondialdéhyde  
MnSOD : superoxyde dismutase à manganèse  
NADP<sup>+</sup> : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée  
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite  
NaN<sub>3</sub> : azide de sodium  
NEM : N-éthylmaléimide  
OPA : *ortho*-phtalaldéhyde  
PCBs : polychlorobiphényles  
pCMB : acide *p*-chloromercuribenzoïque  
PLGPx : phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase  
PMSF : phénylméthylsulfonylfluorure  
RPE : résonance paramagnétique électronique  
S12000 : surnageant de centrifugation 12000g (fraction cytosolique)  
SeGPx : glutathion peroxydase sélénium-dépendante  
SOD : superoxyde dismutase  
TNB : acide thiobis-nitrobenzoïque  
UV : ultra violet

## LISTE DES FIGURES.

- Figure 1 : Actions conjointes des différentes enzymes antioxydantes pour la détoxification des espèces réactives de l'oxygène.
- Figure 2 : Répartition subcellulaire du glutathion et des enzymes antioxydantes avec leurs principaux inhibiteurs.
- Figure 3 : Principaux effets biologiques des espèces réactives et systèmes de défense antioxydants.
- Figure 4 : Schéma du protocole de préparation des fractions subcellulaires.
- Figure 5 : Schéma du montage expérimental utilisé pour le dosage du glutathion par HPLC.
- Figure 6 : Exemples de cinétiques de la **glutathion peroxydase totale** pour différentes concentrations d'enzyme commerciale.
- Figure 7 : Exemples de cinétiques de la **glutathion réductase** pour différentes concentrations d'enzyme commerciale.
- Figure 8 : Exemples de cinétiques de la **catalase** pour différentes concentrations d'enzyme commerciale.
- Figure 9 : Gamme étalon du **glutathion total** obtenue avec la méthode classique au DTNB.
- Figure 10 : Gamme étalon du **glutathion réduit** obtenue avec la méthode classique au DTNB.
- Figure 11 : Gamme étalon du **glutathion réduit (GSH)** obtenue avec la méthode HPLC.
- Figure 12 : Exemple de chromatogramme obtenu pour une concentration en glutathion réduit (GSH) de 0,1 µg/ml
- Figure 13 : Cinétique de réduction du glutathion oxydé (GSSG) par le DTT 10 mM.
- Figure 14 : Exemple de chromatogramme obtenu pour une concentration en GSSG de 0,5 µg/ml après 1 heure de réduction par le DTT 10 mM.
- Figure 15 : Réaction entre le glutathion réduit et la N-éthylmaléimide.
- Figure 16 : Comparaison des taux de glutathion total et réduit mesurés à l'aide des deux méthodes de mesure, dans la fraction cytosolique et la fraction des organites de glandes digestives.
- Figure 17 : Activités des **glutathion peroxydases** (totale, sélénium-dépendante et sélénium-indépendante), de la **glutathion réductase** et de la **catalase** mesurées dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **glandes digestives** des témoins et des individus mis en cages (n=16).
- Figure 18 : Taux de **glutathion** (total, réduit et oxydé) mesurée dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **glandes digestives** des témoins et des individus mis en cages (n=16).
- Figure 19 : Activités des **glutathion peroxydases** (totale, sélénium-dépendante et sélénium-indépendante), de la **glutathion réductase** et de la **catalase** mesurées dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **glandes digestives** d'*Unio tumidus* (n=3) placés en amont et en aval d'une source de pollution pendant 1 semaine.
- Figure 20 : Taux de **glutathion** (total, réduit et oxydé) mesurés dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **branchies** <sup>(a)</sup> et des **glandes digestives** <sup>(b)</sup> d'*Unio umidus* (n=3) placés en amont et en aval d'une source de pollution pendant 1 semaine.

- Figure 21 : Activités des **glutathion peroxydases** (totale, sélénium-dépendante et sélénium-indépendante), de la **glutathion réductase** et de la **catalase** mesurées dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **branchies** d'*Unio tumidus* (n=3) placés en amont et en aval d'une source de pollution pendant 1 semaine.
- Figure 22 : Activités des **glutathion peroxydases** (totale, sélénium-dépendante et sélénium-indépendante), de la **glutathion réductase** et de la **catalase** mesurées dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **glandes digestives** d'*Unio tumidus* (n=5) mis en cages et transférés dans 3 sites (sites B, C et D). Les bivalves ont été exposés pendant 15 jours (T15) et 30 jours (T30).
- Figure 23 : Taux de **glutathion** (réduit et oxydé) mesurés dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **branchies** <sup>(a)</sup> et des **glandes digestives** <sup>(b)</sup> d'*Unio tumidus* (n=5) mis en cages et transférés dans 3 sites (sites B, C et D). Les bivalves ont été exposés pendant 15 jours (T15) et 30 jours (T30).
- Figure 24 : Activités des **glutathion peroxydases** (totale, sélénium-dépendante et sélénium-indépendante), de la **glutathion réductase** et de la **catalase** mesurées dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **branchies** d'*Unio tumidus* (n=5) mis en cages et transférés dans 3 sites (sites B, C et D). Les bivalves ont été exposés pendant 15 jours (T15) et 30 jours (T30).
- Figure 25 : Activités des **glutathion peroxydases** (totale, sélénium-dépendante et sélénium-indépendante), de la **glutathion réductase** et de la **catalase** mesurées dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **glandes digestives** d'*Unio tumidus* (n=5) intoxiqués au laboratoire pendant 3 jours avec du cuivre (30 µg/l), du thiram (100 µg/l) et le mélange des deux toxiques.
- Figure 26 : Taux de **glutathion** (total, réduit et oxydé) mesurés dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **glandes digestives** d'*Unio tumidus* (n=5) intoxiqués au laboratoire pendant 3 jours avec du cuivre (30 µg/l), du thiram (100 µg/l) et le mélange des deux toxiques.
- Figure 27 : Activités des **glutathion peroxydases** (totale, sélénium-dépendante et sélénium-indépendante), de la **glutathion réductase** et de la **catalase** mesurées dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **branchies** d'*Unio tumidus* (n=5) intoxiqués au laboratoire pendant 3 jours avec du cuivre (30 µg/l), du thiram (100 µg/l) et le mélange des deux toxiques.
- Figure 28 : Taux de **glutathion** (total, réduit et oxydé) mesurés dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **branchies** d'*Unio tumidus* (n=5) intoxiqués au laboratoire pendant 3 jours avec du cuivre (30 µg/l), du thiram (100 µg/l) et le mélange des deux toxiques.

## LISTE DES TABLEAUX.

- Tableau 1 : Modifications d'activités ou de concentrations des paramètres antioxydants et du malonaldéhyde de poissons ou de bivalves exposés à des **métaux** lors d'expérimentations *in vitro* au laboratoire : augmentation (+), diminution (-) par rapport aux témoins.
- Tableau 2 : Modifications d'activités ou de concentrations des paramètres antioxydants et du malonaldéhyde de poissons ou de bivalves exposés à des **composés organiques** lors d'expérimentations au laboratoire : augmentation (+), diminution (-) par rapport aux témoins.
- Tableau 3 : Modifications d'activités ou de concentrations des paramètres antioxydants et du malonaldéhyde de poissons ou de bivalves exposés à des **métaux** lors d'expérimentations au laboratoire : augmentation (+), diminution (-) par rapport aux témoins.
- Tableau 4 : Modifications d'activités ou de concentrations des paramètres antioxydants, du malonaldéhyde et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase de poissons ou de bivalves prélevés *in situ* ou exposés au laboratoire à des **sédiments provenant de sites contaminés ou non** : augmentation (+), diminution (-) par rapport aux témoins.
- Tableau 5 : Dosage du glutathion réduit (GSH), total (GSH+GSSG) et oxydé (GSSG) dans un mélange de solutions commerciales de GSH et de GSSG à des concentrations finales respectives de 1  $\mu\text{g/ml}$  et 0,1  $\mu\text{g/ml}$ .
- Tableau 6 : Dosage des taux de glutathion réduit (GSH), total (GSH+GSSG) et oxydé (GSSG) sur un échantillon de glande digestive d'*Unio tumidus*, dopé ou non, avec une solution commerciale de GSH de 0,1  $\mu\text{g/ml}$  ajoutée lors de l'homogénéisation de l'échantillon tissulaire.
- Tableau 7 : Récapitulatif des activités moyennes des différents paramètres mesurés dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites (C) obtenues après centrifugation à 12000g des homogénats de glandes digestives d'*Unio tumidus* selon le sexe des moules, avant et après conservation des tissus pendant 1 mois dans l'azote liquide (-196°C). Campagne de Juin 1993.
- Tableau 8 : Activités spécifiques des glutathion peroxydases (GPx), de la glutathion réductase (GRd), de la catalase et taux de glutathion mesurés avant et après traitement de la fraction cytosolique (S12000) et de la fraction des organites (C12000) avec deux inhibiteurs de protéases : le PMSF et le mélange sérine-borate. Echantillon de glandes digestives d'*Unio tumidus* prélevés en octobre 1993.
- Tableau 9 : Tableau récapitulatif des différentes activités enzymatiques mesurées au cours des campagnes d'échantillonnage d'octobre 1993 et 1994 dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites (C) déterminées après centrifugation à 12000g des homogénats de glandes digestives (GD) et de branchies (Br) d'*Unio tumidus*.
- Tableau 10 : Tableau récapitulatif des différentes activités enzymatiques mesurées au cours des campagnes d'échantillonnage de mai et d'octobre 1994 dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites (C) déterminées après centrifugation à 12000g des homogénats de glandes digestives (GD) et de branchies (Br) d'*Unio tumidus*.
- Tableau 11 : Tableau récapitulatif des différents taux de glutathion mesurés par la méthode au DTNB au cours des différentes campagnes d'échantillonnage dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites (C) déterminées après centrifugation à 12000g des homogénats de glandes digestives (GD) et de branchies (Br) d'*Unio tumidus*.

- Tableau 12 : Analyses des micropolluants organiques et des métaux effectuées sur la fraction inférieure à 1mm des sédiments prélevés dans chacun des sites étudiés.
- Tableau 13 : Tableau récapitulatif des différentes activités antioxydantes mesurées au cours des campagnes différentes d'échantillonnage dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites (C) déterminées après centrifugation à 12000g des homogénats de glandes digestives (GD) et de branchies (Br) d'*Unio tumidus*.
- Tableau 14 : Tableau récapitulatif des activités antioxydantes totales mesurées au cours des campagnes différentes d'échantillonnage dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites (C) déterminées après centrifugation à 12000g des homogénats de glandes digestives (GD) et de branchies (Br) d'*Unio tumidus*.
- Tableau 15 : Comparaison des activités antioxydantes et des taux de glutathion relevées dans la littérature concernant les travaux sur foies de poissons.
- Tableau 16 : Comparaison des activités antioxydantes et des taux de glutathion mesurés sur glandes digestives (GD) et branchies (Br) d'*Unio tumidus* au cours de notre étude expérimentale avec celles relevées dans la littérature concernant les travaux sur glandes digestives et/ou branchies de bivalves.
- Tableau 17 : Tableau récapitulatif des modifications mesurées dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites (C) des glandes digestives et des branchies des individus transférés dans les sites contaminés B, C et D par rapport aux témoins.



# **I. INTRODUCTION**

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la recherche de biomarqueurs de toxicité permettant de détecter l'altération précoce des organismes aquatiques vivant au sein d'écosystèmes contaminés.

Un biomarqueur peut être défini comme tout changement physiologique, biologique ou comportemental induit par l'exposition à des substances chimiques et pouvant être utilisé comme indicateur précoce d'exposition ou de toxicité à des xénobiotiques.

Ses principales caractéristiques sont les suivantes : (1) il doit être facile à mesurer et permettre la quantification sur plusieurs individus afin d'évaluer la variabilité inter individus, (2) sa réponse doit être dose-dépendante par rapport à la contamination, (3) il doit être sensible et la variabilité due à des facteurs climatiques ou physiologiques doit être bien connue.

Nous nous sommes intéressés aux marqueurs de stress oxydant en étudiant d'une part les activités d'enzymes impliquées dans la détoxification des cellules vis à vis de substances oxydantes, comme les glutathion peroxydases, la glutathion réductase et la catalase localisées au niveau cytosolique et mitochondrial pour les premières et principalement au niveau peroxysomal pour la dernière, et les taux de glutathion réduit et oxydé d'autre part. Les mesures d'activités de ces enzymes et des taux de glutathion ont été associés aux mesures d'activités superoxyde dismutases et des concentrations de malonaldéhyde, marqueur de lipoperoxydation, réalisées simultanément par deux autres chercheurs afin d'étudier la réponse des organismes aquatiques exposés à des polluants.

La finalité de cette recherche est de déterminer si les systèmes antioxydants des invertébrés dulçaquicoles peuvent constituer des biomarqueurs de toxicité intéressants pour les études de terrain et de bons indices reflétant l'éventuelle contamination d'un site.

On entend par stress oxydant un ensemble de phénomènes qui aboutissent à la formation de peroxydes (peroxydes organiques et/ou peroxyde d'hydrogène), de radicaux libres (radical hydroyle  $\text{OH}\cdot$ ), d'anions superoxydes ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) ou d'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ). La respiration cellulaire, les réactions de transformation de certains xénobiotiques tels que ceux capables de se comporter comme des systèmes rédox peuvent générer des espèces très réactives capables de détruire les structures cellulaires en l'absence de systèmes protecteurs.

Parmi les systèmes protecteurs antioxydants figurent (1) les glutathion peroxydases capables de réduire les molécules de peroxyde d'hydrogène et les peroxydes organiques en présence de glutathion réduit qui sera simultanément oxydé en glutathion disulfide, (2) la glutathion réductase qui participe à la régénération du glutathion réduit, (3) le glutathion réduit qui sert de substrat aux glutathion peroxydases, mais qui peut également se conjuguer aux molécules toxiques en présence de glutathion transférases et permettre ainsi leur élimination.

Ces systèmes antioxydants ont été principalement étudiés chez les mammifères où il apparaît que la cytotoxicité peut résulter de l'inhibition des enzymes participant au maintien des taux de glutathion dans la cellule.

On ne relève encore que peu d'études des systèmes antioxydants chez les organismes aquatiques. La plupart des travaux ont été conduits sur les poissons et seuls les bivalves marins ont été étudiés. Ces travaux ont surtout été réalisés en laboratoire et les études de terrain utilisant les bivalves restent à ce jour encore peu nombreuses.

Nous avons choisi de conduire nos recherches sur les bivalves dulçaquicoles, qui constituent des organismes sentinelles des écosystèmes hydriques par leur capacité de filtration et d'accumulation des polluants. Leur mobilité réduite rend par ailleurs ces organismes intéressants dans les études d'impact et les opérations de transfert en amont et en aval d'une source de pollution, pour en étudier les effets.

Les mesures des activités enzymatiques antioxydantes et des taux de glutathion (réduit et oxydé) ont été réalisées sur les glandes digestives et les branchies de la moule d'eau douce *Unio tumidus*.

Dans la perspective d'étudier les réponses des systèmes antioxydants chez les invertébrés d'eau douce, nous avons dans un premier temps (1) optimisé les méthodes de dosage des paramètres étudiés, (2) déterminé les conditions optimales de conservation des échantillons (congélation des tissus dans l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$  immédiatement après échantillonnage) et de préparation des homogénats (utilisation d'inhibiteurs de protéases pour préserver l'intégrité des paramètres biochimiques étudiés).

Après avoir résolu ces quelques points techniques et méthodologiques, nous avons entrepris :

(1) la détermination des concentrations et des activités basales des différents paramètres afin d'étudier l'influence de la saison, du sexe des individus et de l'état physiologique des femelles (absence ou présence de larves) sur les activités enzymatiques et les taux de glutathion,

(2) la réalisation d'études de terrain en étudiant (i) l'impact de la mise en cage par le transfert d'individus d'un site témoin vers un autre site témoin, (ii) la réponse des individus transférés d'un milieu sain vers un milieu pollué (étude amont-aval d'une source de pollution) en fonction de la durée de l'exposition et (iii) la sensibilité des différents paramètres étudiés relative aux polluants des différents sites,

(3) l'intoxication des bivalves en laboratoire pour juger de la sensibilité des paramètres antioxydants face à un stress chimique.

## **II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

## II.1. MECANISMES DE FORMATION, SYSTEMES DE DEFENSE ET EFFETS DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE.

### II.1.1. La toxicité de l'oxygène.

L'oxygène, nécessaire à toute forme de vie aérobie, peut se révéler toxique lors de sa transformation en espèces radicalaires très réactives. Ces composés sont formés par voie endogène en petite quantité (moins de 5%) au cours de la respiration cellulaire mettant en jeu un transfert d'électrons ; ils peuvent également être générés à la suite d'un stress oxydant ou au cours de toute réaction mettant en jeu un transfert d'électrons.

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

Sous le terme d'espèces réactives de l'oxygène, se trouvent regroupées les formes actives de l'oxygène (anion superoxyde, radical hydroxyle, peroxyde d'hydrogène et oxygène singulet) ainsi que les espèces radicalaires qui peuvent en être les initiateurs. Ces différents composés plus ou moins réactifs peuvent attaquer les constituants cellulaires : protéines, lipides, polysaccharides, acides nucléiques, et entraîner le dysfonctionnement, voire la destruction des systèmes biologiques au niveau desquels ils ont été formés. Cependant, la réactivité des espèces avec les constituants biologiques ne s'accompagne pas systématiquement de toxicité. Les espèces réactives peuvent être neutralisées par les systèmes de défense présents dans toute cellule aérobie, et les lésions réparées et/ou compensées. Lorsque les systèmes de défense sont débordés, la toxicité se manifeste avec l'apparition de dommages cellulaires plus ou moins graves.

L'**oxygène moléculaire** est un biradical qui possède deux électrons non appariés sur son orbitale moléculaire externe. Ces électrons ont le même nombre de spin et sont localisés selon une configuration de spin parallèle, ce qui confère à la molécule sa stabilité et sa faible réactivité.

La réduction de l'oxygène par un électron à la fois est donc plus facile, mais engendre la production d'intermédiaires radicalaires très réactifs : l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle et l'oxygène singulet.

### II.1.2. Les espèces réactives de l'oxygène et leurs modes de détection.

\* L'**anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$** , probablement le plus connu des oxyradicaux, est formé par la réduction univalente de l'oxygène moléculaire. Les métaux de transition tels que le fer ou le cuivre ont souvent des électrons non appariés et sont d'excellents catalyseurs de la réduction de l'oxygène avec formation d'anion superoxyde :  $Fe^{II} + O_2 \rightarrow Fe^{III} + O_2^{\cdot-}$

L'anion superoxyde peut être produit lorsque des quinones, composés électrophiles, sont réduites en semiquinones par transfert d'électron au niveau des flavoprotéines (Cadenas, 1989). Il est également formé au cours de processus physiologiques par les cellules phagocytaires pour la destruction des particules étrangères et des complexes immuns (Babior, 1978).

Formé essentiellement au niveau des membranes biologiques (Gutteridge & Halliwell, 1993), il n'est pas l'oxyradical le plus réactif, mais peut endommager les structures cellulaires. 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.

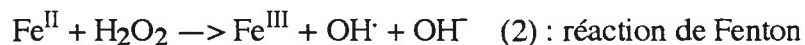
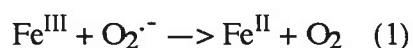
L'anion superoxyde peut se dismuter en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en milieu acide. A pH neutre, sa dismutation est catalysée par la superoxyde dismutase (Fridovich, 1975).

Il peut également servir de précurseur pour la formation d'autres espèces radicalaires beaucoup plus nocives : (i) lors de sa protonation, avec formation du radical hydroperoxyde ( $HO_2^{\cdot}$ ) particulièrement toxique, (ii) en réagissant avec  $H_2O_2$  pour générer une molécule d'oxygène singulet ( $^1O_2$ ).

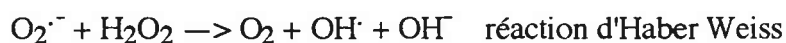
\* **Le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$**  est formé par dismutation de l'anion superoxyde et par addition d'un second électron et deux protons.

Modérément réactif, c'est un important oxydant des thiols et du pyruvate (Halliwell & Gutteridge, 1989). Il diffuse facilement au travers des membranes hydrophobes à cause de son état non ionisé et non chargé. Il participe à la production d'espèces très réactives comme le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) et son action est plus importante comme initiateur de la cytotoxicité des radicaux libres plutôt qu'en tant qu'espèce réactive (Yu, 1994).

\* **Le radical hydroxyle  $OH^{\cdot}$** , est produit par réaction thermique, par radiations ionisantes ou par réaction de type Fenton (1894) *in vitro*, en présence de métaux de transition sous forme réduite et d' $H_2O_2$  comme précurseur. La première étape consiste en la réduction du métal (fer ou cuivre) par l'anion superoxyde (équation1), la deuxième étape fait intervenir le peroxyde d'hydrogène par une réaction de Fenton (équation2), le bilan de la réaction est appelée réaction d'Haber Weiss :



Bilan des réactions



Cette réaction dépend bien évidemment de la disponibilité des métaux de transition à l'état libre et surtout du fer et du cuivre qui sont les candidats les plus actifs, probablement à cause de leur abondance dans les systèmes biologiques. En présence de composés chélateurs de métaux comme par exemple la ferrioxamine dans le cas du fer ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ), la réaction d'Haber Weiss est inhibée et la production d'ions hydroxyles supprimée. Par contre elle peut avoir lieu en présence de  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -EDTA (Mc Cord & Bay, 1978) et d'autres chélateurs physiologiques comme l'ATP et l'ADP (Gutteridge & Halliwell, 1993).

Le radical hydroxyle est extrêmement réactif. Il est faiblement diffusible et réagit avec les premières cibles cellulaires rencontrées. Il peut attaquer tous types de constituants (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 (Dodet, 1991 ; Yu, 1994).

\* **L'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$**  est formé par activation photochimique de l'oxygène et lors de réactions de thermolyse des endoperoxydes.

Il existe sous deux états d'excitation : (1) l'état delta ( $1\Delta_g \text{O}_2$ ) qui n'est pas un radical puisqu'il n'a pas d'électrons non appariés, (2) l'état sigma ( $1\Sigma_g^+ \text{O}_2$ ), radicalaire et très énergétique qui se dégrade rapidement en l'état delta. L'oxygène singulet est d'ailleurs considéré comme entité seulement dans l'état delta (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Cette forme active de l'oxygène peut être générée lors de l'illumination de pigments biologiques (chlorophylles, rétinol, flavine, porphyrine) (Dodet, 1991). L'oxygène singulet peut également être produit au sein des organismes vivants en l'absence de lumière suite au processus de lipoperoxydation et à certaines réactions catalysées par voie enzymatique. Les leucocytes humains sont connus pour le produire comme agent antibactérien (Joenje, 1989).

Il est moins réactif que le radical hydroxyle mais plus diffusible (Cadenas, 1989).

**La détection des espèces radicalaires** mises en jeu dans le processus de stress oxydant fait appel aux techniques spectroscopiques de résonance paramagnétique électronique (RPE). Ces techniques, basées sur la résonance électronique de spin (ESR) permettent d'étudier la nature et la structure des radicaux libres puisqu'elles détectent la présence d'électrons non appariés.

Un électron célibataire (non apparié) a un spin de  $+1/2$  ou de  $-1/2$  et se comporte comme un petit aimant. Lorsque le radical est exposé à une radiation électromagnétique, l'électron célibataire peut s'aligner de façon parallèle ou antiparallèle par rapport au champ magnétique. Si l'énergie de la radiation électromagnétique est adaptée à l'espèce radicalaire étudiée, celle-ci va absorber l'énergie et faire se déplacer l'électron célibataire de son niveau d'énergie le plus bas vers son niveau d'énergie le plus haut. Un spectre d'absorption proche du spectre électromagnétique sera ainsi obtenu. Tout radical pourra donc être identifié par rapport à son spectre de résonance électronique de spin.

Dans le cas des espèces réactives de l'oxygène qui sont des composés fugaces (leur demi-vie est comprise entre  $10^{-6}$  et  $10^{-9}$  secondes (Yu, 1994)) et présents à des concentrations très faibles dans les milieux biologiques, on utilise une technique appelée "spin-trapping" qui consiste à faire réagir les espèces radicalaires avec des molécules telles que le DMPO (5,5-diméthyl purroline-N-oxyde) afin d'obtenir un complexe radicalaire de durée de vie plus longue et donc plus stable pour l'étude spectrale (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Ces techniques ne peuvent toutefois être mises en oeuvre qu'*in vitro* sur des systèmes réactionnels simplifiés : biomolécules, fractions subcellulaires ou cellules.

*In vivo*, les études consistent à évaluer les effets cellulaires et subcellulaires des espèces radicalaires, qui témoignent indirectement de l'implication d'un stress oxydant.



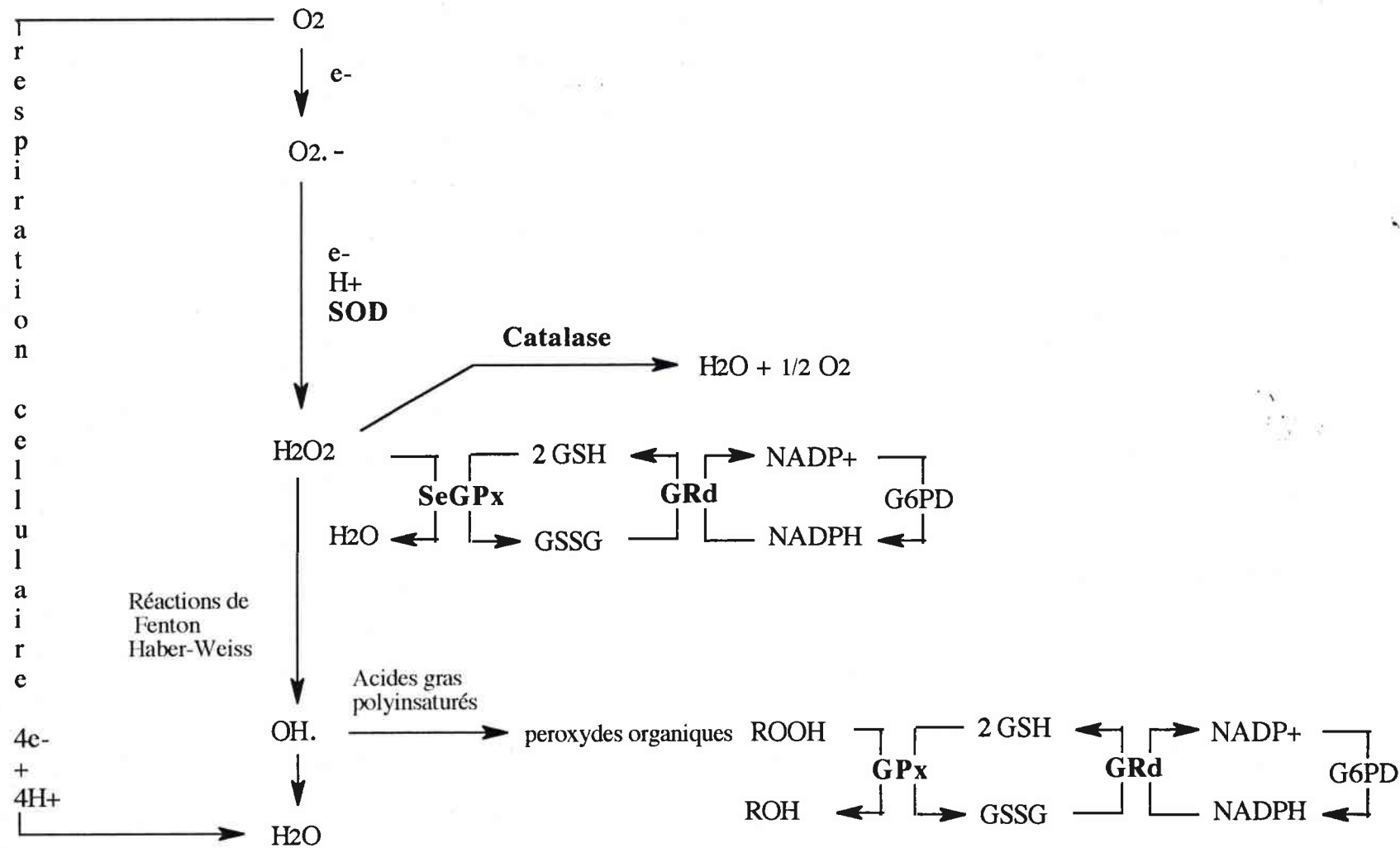
### **II.1.3. Sources biologiques des espèces réactives de l'oxygène.**

Les réactions radicalaires jouent un rôle important dans les systèmes biologiques car elles interviennent dans les réactions métaboliques normales et la production d'énergie. Le principal procédé biologique conduisant à la formation d'espèces réactives telles que l'anion superoxyde est le système de transport des électrons associé aux membranes mitochondriales (Mc Cord & Fridovich, 1969 ; Halliwell, 1989). En effet, la réduction de l'oxygène moléculaire en eau par les oxydases au cours de la respiration cellulaire met en jeu un transport séquentiel d'électrons accompagné de la formation d'espèces radicalaires réactives. Ces espèces radicalaires sont donc des intermédiaires clés de la respiration cellulaire mais également de la photosynthèse, de la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes et aussi de l'activité phagocytaire où les dérivés actifs de l'oxygène produits au niveau des neutrophiles et des macrophages constituent une des armes majeures dans la défense antibactérienne (Dodet, 1991).

Les enzymes comme la xanthine oxydase et la tryptophane dioxygénase sont reconnues pour produire  $O_2^{\cdot-}$ , la prostaglandine synthétase, la guanylcyclase et la glucose oxydase pour générer  $OH^{\cdot}$ . L'induction du système des monooxygénases associées au cytochrome P450 présente aussi un puissant potentiel de production d'espèces réactives (Kappus, 1987). La formation d'intermédiaires réactifs peut également être consécutive à la métabolisation de substances exogènes et à l'autooxydation spontanée des métabolites réduits. Les substances se comportant comme des systèmes rédox, réduites par voie enzymatique par un électron peuvent ensuite transférer cet électron à l'oxygène moléculaire en l'activant sous forme d'anion superoxyde. Les dérivés quinoniques, aromatiques, nitroaromatiques et hydroxylaminés, les diazoïques, les métaux de transition et les composés organiques rentrent dans cette catégorie (Kappus, 1987 ; Winston & Di Giulio, 1991).

Qu'ils soient utiles sur le plan physiologique ou fortuits, ces processus doivent être étroitement contrôlés. La production des intermédiaires physiologiques est 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 2% du processus global de réduction (Mc Cord, 1983).

Toutefois, les dommages oxydatifs sont inévitables en milieu aérobie où la vie n'est possible qu'avec la protection d'antioxydants et de systèmes de réparation des cibles endommagées. De ce fait, la surproduction d'espèces réactives ou le dysfonctionnement des mécanismes de contrôle des réactions physiologiques ne présenteront d'effets néfastes que si les capacités antioxydantes sont dépassées et les systèmes de réparation et de compensation devenus inopérants.



**Figure 1 :** Actions conjointes des différentes enzymes antioxydantes pour la détoxification des espèces réactives de l'oxygène.  
 SOD : superoxyde dismutase, GRd : glutathion réductase, GPx : glutathion peroxydases, SeGPx : glutathion peroxydase sélénium-dépendante, G6PD : glucose-6-phosphate deshydrogénase.

## **II.1.4. Systèmes de défense antioxydants.**

### II.1.4.1. Présentation des systèmes antioxydants.

Les trois principaux mécanismes d'action antioxydante développés par les organismes vivants aérobies consistent à (1) éliminer les espèces réactives et les catalyseurs de leur formation, (2) induire les systèmes antioxydants, (3) augmenter l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées.

Les systèmes antioxydants responsables de la protection cellulaire contre le stress oxydant sont aussi diversifiés que les espèces radicalaires elles mêmes. Les moyens mis en oeuvre pour l'élimination des espèces réactives de l'oxygène sont les suivants :

- \* éliminer les métaux catalyseurs de la production d' $\text{OH}\cdot$  en les séquestrant par des métalloprotéines - la transferrine au niveau extracellulaire et la ferritine intracellulaire jouent ce rôle pour le fer, la céruléoplasmine et les cupréines pour le cuivre,
- \* inactiver  $\text{O}_2^{\cdot-}$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  à l'aide d'enzymes spécifiques,
- \* capter les radicaux libres responsables de dommages cellulaires à l'aide de piègeurs moléculaires,
- \* casser la propagation des réactions en chaîne.

#### a. Les enzymes antioxydantes.

Il existe trois enzymes antioxydantes majeures mises en oeuvre pour l'élimination des espèces réactives de l'oxygène : les superoxyde dismutases, les glutathion peroxydases et la catalase. Ces enzymes sont toutes des métalloprotéines et agissent de façon coordonnée (figure 1).

• **Les superoxyde dismutases** (SOD, EC 1.15.1.1) possèdent un métal de transition (cuivre, manganèse ou fer) au niveau de leur site actif. Il existe plusieurs formes de SOD :

- \* la CuZn SOD, isolée en 1968 par Mc Cord & Fridovich dans les érythrocytes bovins. Cette enzyme dimérique contient un atome de cuivre et un atome de zinc par sous unité, elle est présente dans le compartiment cytosolique mais également dans les peroxysomes, les lysosomes et le noyau des cellules eucaryotes (Beyer *et al.*, 1991). On la retrouve chez les organismes vivants aquatiques et terrestres vertébrés et invertébrés ainsi que chez les plantes,
- \* la Mn SOD présente chez les eucaryotes et les bactéries au niveau de la matrice mitochondriale,
- \* la Fe SOD trouvée chez les plantes et les bactéries,
- \* la SOD extracellulaire, tétramérique, qui contient du cuivre et du zinc. Elle a été identifiée par Marklund récemment (1982) et son rôle serait de protéger les parois endothéliales vis à vis d' $\text{O}_2^{\cdot-}$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  produits par les phagocytes.

• **La glutathion peroxydase sélénium-dépendante** (SeGPx, EC 1.11.1.9) découverte par Mills en 1957 dans les érythrocytes bovins, catalyse la réduction glutathion-dépendante de nombreux peroxydes allant du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) aux peroxydes organiques (ROOH).

Cette enzyme est une métalloenzyme tétramérique (80000 daltons) dont chaque sous unité contient, au niveau de son site actif, un atome de sélénium sous forme d'un résidu sélénocystéine (Paglia & Valentine, 1967 ; Tappel *et al.*, 1982 ; Flohé & Günzler, 1984 ; Mannervik, 1985 ; Rice-Evans *et al.*, 1991). Le sélénium d'origine exogène serait incorporé dans le site actif de l'enzyme par un ARN de transfert sélénocystéine-spécifique (Spallholz & Boylan, 1991). L'enzyme est localisée dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle est retrouvée dans la plupart des tissus animaux et apparaît comme un système protecteur contre le processus de lipoperoxydation endogène et exogène (Wendel, 1981).

Un déficit en sélénium entraîne une diminution de l'activité de la SeGPx qui est associée à l'apparition de nécroses tissulaires, de réactions inflammatoires et de l'occlusion de microvaisseaux (Flohé, 1976 ; Dodet, 1991). Cependant, une déplétion en sélénium n'a pas d'effets majeurs sur les activités SOD et catalase, ce qui implique que les enzymes antioxydantes sont capables de s'adapter au manque en sélénium en minimisant les changements dans les capacités de défenses antioxydantes (Yu, 1994).

Les inhibiteurs les plus connus de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase sélénium-dépendante sont les thioloprives tels que le cadmium ou le plomb par exemple et des composés organiques comme la N-éthylmaléimide ou l'octoxynol (triton X).

Il existe une autre sélénoglutathion peroxydase, découverte par Urisini *et al.* (1982) dans le foie de porc : **la phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase** (PLGPx, EC 1.11.1.12). Cette enzyme monomérique (22000 daltons) est localisée dans le cytosol et son rôle consiste à protéger les liposomes et les biomembranes contre les dommages peroxydatifs. Elle diffère de SeGPx par son exigence moins stricte en sélénium et son inhibition spécifique par l'iodoacétate (Spallholz & Boylan, 1991).

Cette enzyme possède dans son site actif un atome de sélénium sous forme d'un résidu sélénocystéine, lequel est incorporé dans la chaîne polypeptidique par un codon TGA spécifique de ce résidu. Sa compétence comprend la réduction des hydroperoxydes phospholipidiques, des hydroperoxydes solubles, du cholestérol et des esters de cholestérol hydroperoxydes, dans les liposomes et les membranes. Ceci explique qu'elle peut réduire tous les groupes hydroperoxydes générés dans les membranes microsomaux au cours de la lipoperoxydation, alors que la glutathion peroxydase classique est inefficace face à ces espèces réactives. Il a été montré que la lipoperoxydation microsomale est inhibée par PLGPx seulement quand les membranes contiennent des concentrations physiologiques en vitamine E, ce qui suggère un mécanisme d'action conjoint de ces deux antioxydants (Roveri *et al.*, 1994).

En 1976 Lawrence & Burk ont découvert l'existence d'une **glutathion peroxydase sélénium-indépendante**. Cette enzyme dépourvue de sélénium, ne peut réduire que les peroxydes organiques. C'est un dimère (55000 daltons) localisé majoritairement au niveau du réticulum endoplasmique (Flohé & Günzler, 1985 ; Mannervik, 1985).

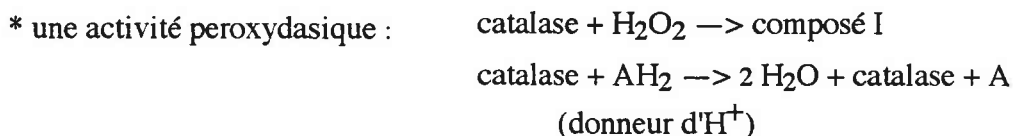
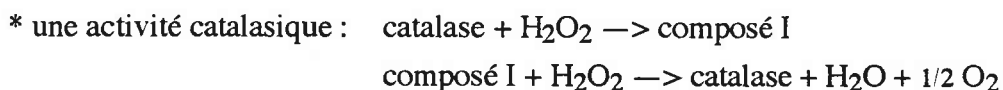
Cette enzyme serait en fait une glutathion transférase à activité peroxydasique. Lors d'un déficit en sélénium, la réponse cellulaire adaptative inclut une forte augmentation de l'activité de cette enzyme (Lawrence & Burk, 1976 ; Yu, 1994). Elle a également la particularité d'être activée en présence de N-éthylmaléimide.

Le maintien d'une activité glutathion peroxydasique implique le recyclage NADPH-dépendant du glutathion réduit, par la **glutathion réductase** (GRd, EC 1.6.4.2), le NADPH étant lui même produit par la voie des pentoses phosphates.

Cette enzyme est une flavoprotéine dimérique (100000 daltons) localisée dans le cytosol et les mitochondries (Meister & Anderson, 1983).

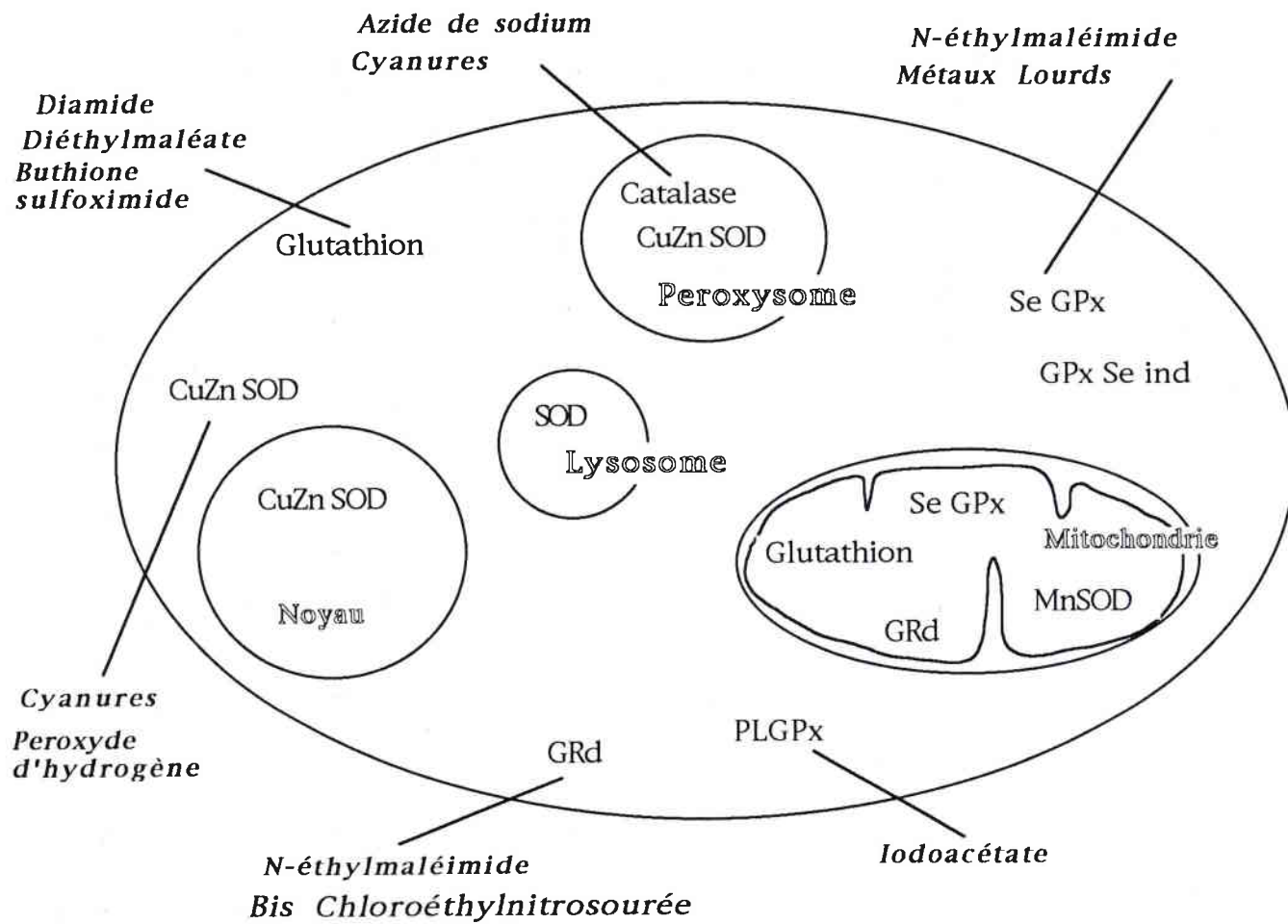
Au niveau bactérien elle est contrôlée par le régulon *oxyR* (Harris, 1992), alors que chez les eucaryotes elle peut être autorégulée par des espèces rédox comme le NADPH (Lopez-Baréa *et al.*, 1990).

• **La catalase** (EC 1.11.1.6) est une hémoprotéine tétramérique (240000 daltons) qui possède un atome de fer par sous unité, chacune des sous unités contenant une molécule de NADPH liée à elle pour stabiliser l'enzyme. Elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire, elle possède une activité double :



Le composé I est un produit d'oxydation de la réaction entre le fer du site actif de l'enzyme et le peroxyde d'hydrogène (Chance *et al.*, 1979).

La catalase est localisée majoritairement dans les peroxysomes, organites contenant des enzymes génératrices de peroxyde d'hydrogène telles que la glycolate oxydase, l'urate oxydase et les déshydrogénases impliquées dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras (Aebi, 1984).



**Figure 2 :** Répartition subcellulaire du glutathion et des enzymes antioxydantes. Les inhibiteurs de ces systèmes sont notés en italique.

Elle a un rôle complémentaire de celui de la glutathion peroxydase sélénium-dépendante contre la lipoperoxydation induite par  $H_2O_2$ . Les principaux inhibiteurs de l'activité catalasique sont l'azide de sodium, les cyanures et le 3-amino-1,2,4-triazole (Simmons & Jammal, 1988).

Certaines souches bactériennes (*streptococcus* ou *lactobacillus*) contiennent une "pseudo catalase" capable de dégrader  $H_2O_2$ , mais insensible à l'inhibition par l'azide de sodium et les cyanures. C'est en fait un hexasomère (174000 daltons) dont chaque sous unité contient un atome de manganèse (Halliwell & Gutteridge, 1989).

La figure 2 résume la répartition subcellulaire des principales activités antioxydantes.

#### b. Les antioxydants non enzymatiques.

Ils agissent comme des réducteurs ou des piègeurs de radicaux et viennent renforcer l'action des enzymes antioxydantes. Au sein des membranes biologiques, ils peuvent également piéger les oxyradicaux dès leur formation, interrompre les réactions en chaîne et empêcher la lipoperoxydation. Ces piègeurs de radicaux sont :

- **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.

- **le glutathion** (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cystéinyglycine) est le thiol non protéique le plus abondant dans les organismes vivants. Il est présent majoritairement à l'état réduit (GSH) dans les cellules ; son groupement thiol et sa liaison  $\gamma$ -glutamyl lui permettent d'être résistant à l'attaque des peptidases. Toutefois, une augmentation de la forme oxydée (GSSG) est indicative d'un stress oxydant (Akerboom & Sies, 1990).

Il agit à la fois comme nucléophile (donneur d'électrons) pouvant ainsi neutraliser des espèces réactives telles que les radicaux hydroxyles ou phénoxy, et comme puissant réducteur du peroxyde d'hydrogène et des lipoperoxydes (Deneke & Fanburg, 1989 ; Mundays & Winterbourn, 1989 ; De Leve & Kaplowitz, 1990). A pH=7, GSH, sous sa forme anionique ( $GS^-$ ), inactive l'oxygène singulet (Cadenas, 1989). Il intervient également comme substrat des glutathion peroxydases ainsi que dans la conjugaison des substances électrophiles catalysée par les glutathion transférases.

Le glutathion joue aussi un rôle important dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la synthèse des protéines, le transport des acides aminés, la réserve et le transport de la cystéine, le métabolisme des prostaglandines et des leucotriènes, la réduction de ribonucléotides en déoxyribonucléotides (Meister & Anderson, 1983 ; Cotgrave *et al.*, 1990 ; Bray & Taylor, 1993).

- **la vitamine E** est l'antioxydant le plus largement distribué dans la nature, aussi bien chez les organismes animaux que végétaux. Parmi ses isomères structuraux, l' $\alpha$ -tocophérol est le plus connu et possède le potentiel antioxydant le plus important. Ses propriétés lipophiles font qu'il se retrouve associé aux membranes intracellulaires, en particulier celle des mitochondries et du réticulum endoplasmique. Il protège les membranes contre la lipoperoxydation en cédant un atome d'hydrogène aux espèces radicalaires (Byczkowski & Gessner, 1988 ; Cadenas, 1989).

- **la vitamine C** est, au contraire de la vitamine E, hydrosoluble. Elle agit en tant que réducteur en réagissant directement avec l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et de nombreux hydroperoxydes lipidiques. De plus, elle permet la régénération de la vitamine E oxydée et se comporte donc comme le relais de l' $\alpha$ -tocophérol au niveau cytosolique (Halliwell & Gutteridge, 1989).

- **le  $\beta$  carotène** (vitamine A) et les caroténoïdes protègent les lipides de la peroxydation par quenching des oxyradicaux et plus particulièrement de l'oxygène singulet (Yu, 1994).

D'autres dérivés tels que l'ubiquinol, les flavonoïdes, l'urée ou le mannitol sont également des piègeurs de radicaux, mais ils sont le plus souvent utilisés *in vitro*.



#### II.1.4.2. Méthodes de dosage des systèmes antioxydants.

Nous ne présenterons dans cette partie que le principe des méthodes de dosage des glutathion peroxydases, de la glutathion réductase, de la catalase et des taux de glutathion, paramètres antioxydants auxquels nous nous sommes plus particulièrement intéressés lors de notre étude expérimentale.

##### a. Dosage de l'activité glutathion peroxydase.

Les méthodes décrites dans la littérature sont de deux types : (i) des méthodes directes basées sur la mesure de la disparition du substrat de l'enzyme, (ii) des méthodes indirectes faisant intervenir des réactions couplées dont le produit de la réaction est quantifié.

##### \* Les méthodes directes.

Les glutathion peroxydases sont des enzymes possédant deux substrats, le glutathion réduit (GSH) et un peroxyde organique ou inorganique. Les méthodes de dosage décrites reposent sur la mesure de la consommation :

- du glutathion réduit, soit après formation d'un complexe détectable en UV avec un composé spécifique des groupements thiols (l'acide dithiobis nitrobenzoïque est le plus couramment utilisé) (Griffith, 1980 ; Flohé & Günzler, 1984), soit par polarographie (Wendel, 1981),

- du peroxyde et notamment du peroxyde d'hydrogène, mesuré à l'aide d'un composé fluorescent (Günzler & Flohé, 1985).

##### \* Les méthodes indirectes.

Toutes les méthodes relevées dans la littérature dérivent de la méthode décrite par Paglia & Valentine (1967). Cette méthode est basée sur une réaction couplée : la réaction enzymatique est initiée par l'introduction d'une quantité définie de peroxyde et du glutathion réduit en excès dans le milieu réactionnel contenant l'échantillon biologique. La glutathion peroxydase va oxyder ses deux substrats. Le glutathion oxydé sera régénéré à l'état réduit, en présence de NADPH, par la glutathion réductase ajoutée au mélange réactionnel. L'oxydation des molécules de NADPH sera suivie au spectrophotomètre à 340 nm. Cette méthode permet donc de ne mesurer que l'activité glutathion peroxydase présente dans l'extrait biologique. L'utilisation de peroxyde d'hydrogène pour initier la réaction permet de mesurer spécifiquement l'activité glutathion peroxydase sélénium-dépendante. Les initiateurs tels que l'hydroperoxyde de cumène ou l'hydroperoxyde de *t*-butyl, permettent de doser les activités glutathion peroxydase sélénium-dépendante et sélénium-indépendante en même temps (Lawrence & Burk, 1978 ; Burk *et al.*, 1982).

### b. Dosage de l'activité glutathion réductase.

L'activité de cette enzyme est évaluée par une méthode directe basée sur le suivi de l'oxydation du NADPH par l'enzyme en présence de son second substrat, le glutathion oxydé. La cinétique enzymatique est suivie au spectrophotomètre à 340 nm (Carlberg & Mannervik, 1985).

### c. Dosage de l'activité catalasique.

Les méthodes directes de mesure de l'activité catalasique sont basées sur le suivi de :

- la disparition d' $H_2O_2$  : cette technique directe développée par Beers & Sizer (1952) est la méthode de référence pour l'évaluation de l'activité de la catalase. Elle consiste à suivre, au spectrophotomètre à 240 nm, la disparition du peroxyde d'hydrogène dégradé par l'enzyme au cours du temps. L'activité de l'enzyme est proportionnelle à la quantité de peroxyde d'hydrogène dégradé.

- la formation d'oxygène : l'oxygène formé au cours de la réaction enzymatique est mesurée à l'aide d'une électrode de Clark (Del Maestro & Mc Donald, 1987). Cette méthode reste cependant très peu souvent utilisée.

La méthode indirecte consiste à ajouter dans le milieu réactionnel contenant l'extrait biologique un excès de peroxyde d'hydrogène. La réaction est stoppée par acidification au bout d'un temps donné et une forte concentration de permanganate de potassium est ensuite ajoutée dans le mélange réactionnel. Le permanganate réagit avec le peroxyde d'hydrogène qui n'a pas été dégradé par l'enzyme (réaction d'oxydo-réduction). La quantité de permanganate de potassium qui n'a pas réagit avec  $H_2O_2$  est mesurée au spectrophotomètre à 480 nm.

L'activité de la catalase est inversement proportionnelle à la quantité de permanganate de potassium encore présente (Cohen *et al.*, 1970).

#### d. Dosage du glutathion.

Les méthodes de dosage du glutathion sont soit des méthodes spectrophotométriques, soit des méthodes chromatographiques.

##### \* Les méthodes spectrophotométriques.

- La méthode la plus couramment utilisée est une méthode enzymatique qui consiste à utiliser le réactif d'Ellman (acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque ou DTNB)) : le glutathion réduit (GSH) est oxydé par le DTNB en glutathion dissulfide (GSSG) et en TNB (5-thio-2-nitrobenzoate) ; le GSSG est à nouveau réduit par de la glutathion réductase ajoutée dans le milieu réactionnel. La formation de TNB, proportionnelle à la quantité de glutathion total (GSH+GSSG) est suivie à 412 nm (Mills, 1957 ; Anderson, 1985).

- Le glutathion réduit peut être dosé (1) par une méthode utilisant la glyoxalase I et dont la formation du produit de la réaction est suivie à 240 nm, (2) par la mesure de la formation d'un complexe fluorescent entre le GSH et l'*o*-phtalaldéhyde. Ces deux méthodes, bien que sensibles sont peu utilisées (Akerboom & Sies, 1981).

##### \* Les méthodes chromatographiques.

Depuis 10 ans, différentes techniques HPLC ont été développées pour l'évaluation des taux de glutathion dans des échantillons cellulaires et tissulaires.

Le glutathion réduit et le glutathion oxydé peuvent être mesurés simultanément par détection électrochimique à l'aide d'une double électrode or-mercure (Stein *et al.*, 1986 ; Morrier-Tessier *et al.*, 1993).

Le glutathion n'absorbe pas en UV : pour pouvoir le détecter, il est nécessaire de le faire réagir avec un réactif chromophore. La complexation avec le chromophore, encore appelée dérivation, peut se faire :

- avant injection de l'échantillon, on parle alors de *dérivation pré-colonne*. Les réactifs les plus couramment utilisés dans ce type de procédure sont le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (Reeds *et al.*, 1980), le chlorure de dansyl (Martin & White, 1991), le monobromobimane (Anderson, 1985) et l'*o*-phtalaldéhyde (Morineau *et al.*, 1989 ; Neuchwander-Tetri & Roll, 1989).

- au fur et à mesure de la séparation des constituants de l'échantillon biologique sur la colonne, on parle alors de *dérivation post-colonne*. L'*o*-phtalaldéhyde (Leroy *et al.*, 1993 a, b ; Fujita *et al.*, 1993) ou le pyrènemaléimide (Johansson & Lenngren, 1988) couplé à une détection fluorimétrique sont les plus couramment utilisés.

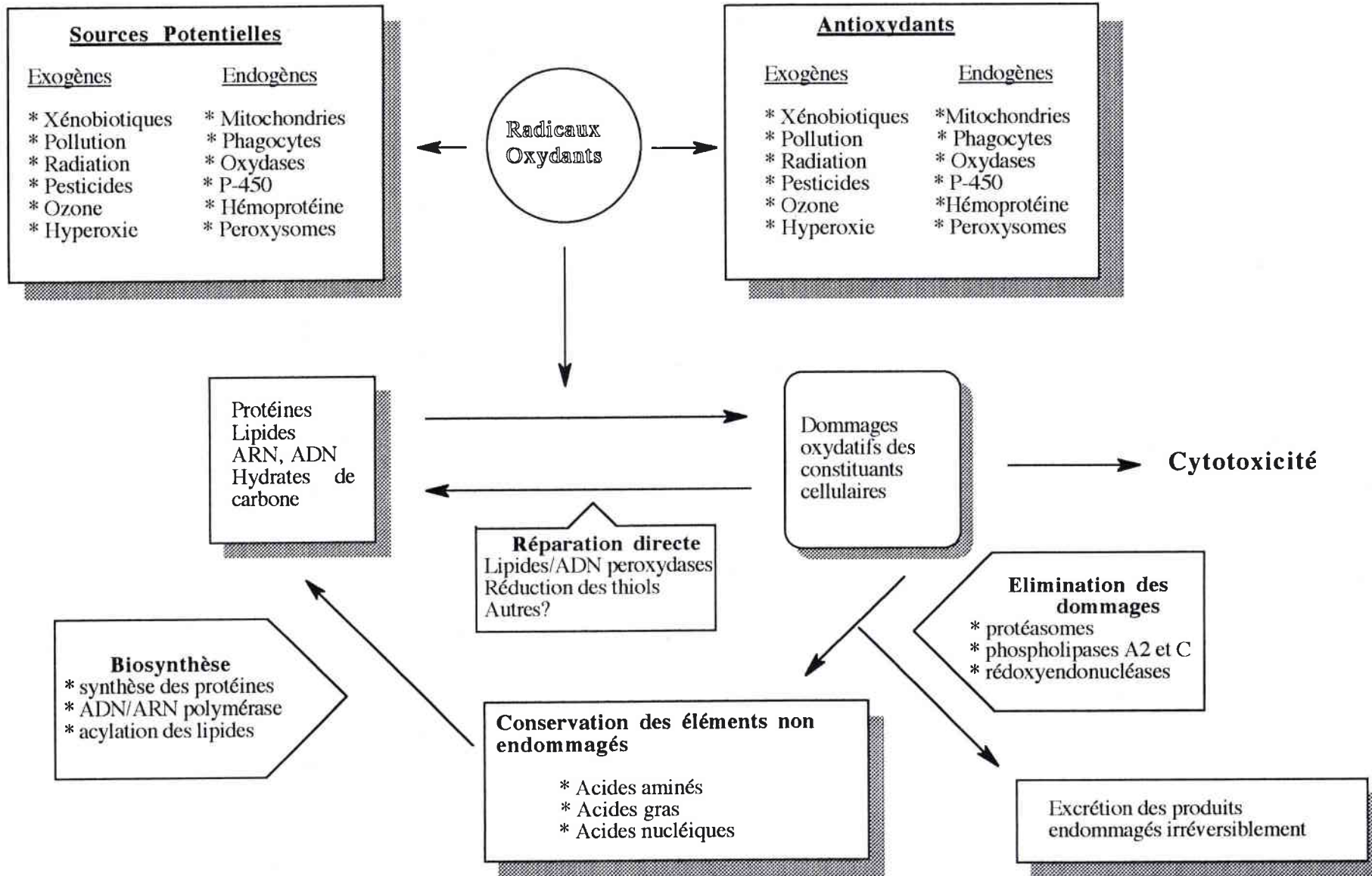


Figure 3 : Principaux effets biologiques des espèces réactives et systèmes de défense antioxydants.

### **II.1.5. Effets biologiques des espèces réactives de l'oxygène.**

Les principaux effets toxiques des espèces réactives de l'oxygène sont : la fragmentation des protéines, l'inactivation d'enzymes, la peroxydation des lipides, les dommages à l'ADN et la mort cellulaire (figure 3).

Au niveau de la membrane, la peroxydation des acides gras polyinsaturés des phospholipides entraîne un déficit de ses fonctions avec comme effets une diminution de sa fluidité et une inactivation des récepteurs et des enzymes membranaires (Snell & Mullock, 1991), ainsi qu'une augmentation de la perméabilité aux ions calciques en particulier (Gutteridge & Halliwell, 1990). Dans les mitochondries, la lipoperoxydation se traduit par un gonflement puis une lyse des organites ; il en est de même pour les lysosomes dont la rupture s'accompagne de la libération d'enzymes catalysant l'hydrolyse des protéines, des acides nucléiques et des polysaccharides cellulaires (Snell & Mullock, 1991 ; Pré, 1991).

Les aldéhydes issus de la décomposition des hydroperoxydes lipidiques sont responsables de la cytotoxicité liée à la lipoperoxydation. Le 4-hydroxynonéal et le malondialdéhyde, représentant les plus réactifs et les plus abondants des aldéhydes formés *in vivo* sont de puissants alkylants : ils réagissent spontanément en formant des composés d'addition avec les résidus cystéinyl des protéines et du glutathion (Benetti *et al.*, 1986 ; Esterbauer, 1993).

Les protéines et les acides aminés sont des cibles courantes de l'attaque des espèces réactives de l'oxygène. Les protéines membranaires sont particulièrement sensibles aux radicaux alcoyle (RO $\cdot$ ) et peroxyde (ROO $\cdot$ ) générés lors de la peroxydation lipidique. L'oxydation des acides aminés des protéines conduit inmanquablement à des changements physiques des protéines elles mêmes. 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 (Rice-Evans *et al.*, 1991).

Les acides nucléiques sont également la cible des oxyradicaux. Il a été démontré 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, mais le radical hydroxyle et l'oxygène singulet sont les formes réactives les plus génotoxiques (Joenje, 1989 ; Yu, 1994).

Les effets pathologiques sont loin d'être élucidés et dépendent beaucoup des tissus cibles et des espèces concernées (Stegeman *et al.*, 1992).

## II.2. FACTEURS MODULATEURS DES SYSTEMES ANTIOXYDANTS CHEZ LES MAMMIFERES.

Le stress oxydant a été beaucoup étudié *in vivo* et sur cultures de cellules *in vitro*. Ces travaux ont d'ailleurs été à l'origine des études sur les espèces aquatiques, les plantes et les insectes.

Il est maintenant bien établi que la vie des organismes dans un milieu oxygéné implique une interaction complexe entre la formation des oxyradicaux au niveau biologique, responsables de nombreux dommages cellulaires, et la capacité des organismes à contrôler les espèces radicalaires par le biais de leurs défenses antioxydantes. Sachant que les espèces radicalaires pouvant être générées en présence de composés chimiques tels que les métaux ou les composés quinoniques, les auteurs se sont attachés entre autre à (1) étudier l'impact de ces molécules sur les capacités antioxydantes, en l'occurrence des activités glutathion peroxydases, glutathion réductase et catalase, (2) démontrer le rôle protecteur du glutathion réduit vis à vis de la toxicité de certaines molécules et (3) étudier les modes d'action des substances entraînant une déplétion du glutathion réduit.

Chez les mammifères, le foie est l'organe dans lequel les activités glutathion peroxydases, glutathion réductase et catalase sont les plus élevées. Le cœur, les reins, les poumons, les muscles et le cerveau en contiennent également mais en quantités moindres (Tappel *et al.*, 1982 ; Chien *et al.*, 1994).

Les taux de glutathion réduit sont la plupart du temps plus élevés au niveau hépatique que rénal (Cartaña *et al.*, 1994). Ces taux plus conséquents sont associés à une activité plus faible de la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase, enzyme qui hydrolyse le glutathion réduit en résidus cystéinyl-glycine et  $\gamma$ -glutamyl (Bray & Taylor, 1994)

Une grande partie des travaux réalisés sur les systèmes antioxydants porte sur l'étude de la toxicité de métaux ou de composés quinoniques. L'intoxication des animaux se fait soit par injection du toxique par voie intra péritonéale, soit par ajout dans la nourriture. La plupart du temps, les auteurs ont mis en évidence une diminution des activités enzymatiques ou une déplétion des taux de glutathion réduit.

Les activités glutathion peroxydase sélénium-dépendante, glutathion réductase et catalase sont souvent diminuées suite à l'action de métaux.

Jamall & Smith (1985) ont montré que le cadmium entraîne une cardiotoxicité chez des rats intoxiqués pendant 35 jours avec 200 ppm de cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ), associée à une forte inhibition de l'activité glutathion peroxydase totale. Ils ont également noté l'absence totale d'activité glutathion peroxydase sélénium-dépendante au niveau cardiaque, pouvant expliquer les dommages peroxydatifs induits par le cadmium dans cet organe.

*In vitro*, l'activité de la catalase peut être fortement diminuée en présence de nickel pour des concentrations en métal inférieures ou égales à 25 mM. L'injection de nickel (105  $\mu$ moles/kg) chez des rats entraîne une forte diminution de l'activité catalasique au niveau hépatique, 16 heures après injection du toxique, alors que l'activité est augmentée au niveau rénal (Rodriguez *et al.*, 1990). Les susceptibilités rénales et hépatiques semblent donc différentes vis à vis de la toxicité du nickel, les reins étant plus résistants malgré un stockage plus important du métal à ce niveau. L'action toxique du nickel sur l'activité de la catalase résulterait de liaison directe du nickel au niveau du site actif de l'enzyme, provoquant ainsi une modification de la structure même de l'enzyme. Cependant le nickel ne semble pas se lier aux quatre sous unités de la catalase, puisqu'*in vivo* l'activité de l'enzyme n'est jamais totalement inhibée, même en présence de concentrations importantes.

Le paraquat (1,1'-diméthyl-4,4'-bipyridium), herbicide connu pour induire un stress oxydant chez les animaux, entraîne une inhibition des activités glutathion peroxydase sélénium-dépendante et catalasique au niveau hépatique et sanguin pour la première et uniquement au niveau sanguin pour la seconde lorsqu'il est incorporé à l'alimentation des souris à la concentration de 200 ppm. Une expérience similaire réalisée sur des souris sénescences montre une plus grande susceptibilité de ces individus à l'action toxique du paraquat, probablement due à la diminution des capacités antioxydantes chez les sujets âgés (He *et al.*, 1994).

Cependant, le paraquat n'entraîne pas systématiquement une inhibition de activités enzymatiques antioxydantes. Certains auteurs ont montré que l'induction de l'activité glutathion réductase mais surtout de celle de la glutathion peroxydase sélénium-dépendante permettrait une protection et une résistance des organismes face à la toxicité du paraquat (Kelner & Bagnel, 1990 ; Kelner *et al.*, 1995).

Des composés comme le ciprofibrate, proliférateur de peroxisomes, induisent l'activité de la catalase mais inhibent celle de la glutathion peroxydase sélénium-dépendante au niveau hépatique chez des rats alimentés avec une nourriture supplémentée avec 0,025% de ciprofibrate (Dhaunsi *et al.*, 1994).

L'adriamycine, substance benzantraquinonique antitumorale génératrice d'espèces réactives de l'oxygène, et la 1,3-bis (2-chloroéthyl)-1-nitrosourée (BCNU) inhibent l'activité de la glutathion réductase, mais reste sans effets sur les activités glutathion peroxydase et catalase mesurées dans des hépatocytes de rats incubés avec 100 $\mu$ M d'adriamycine ou 75  $\mu$ M de BCNU (Babson *et al.*, 1981).

Les taux de glutathion réduit ont été très souvent étudiés, associés ou non à l'étude d'activités enzymatiques antioxydantes. Le rôle protecteur du glutathion réduit face à l'action de certaines molécules toxiques et sa déplétion en leur présence ont été l'objet de nombreux travaux.

Le nickel (4 mg/kg) injecté par voie intra-péritonéale à des rats a peu d'effets sur les taux rénaux de glutathion malgré une forte accumulation du métal dans cet organe. Par contre il inhibe l'activité de la glutathion réductase et déplete les taux de glutathion réduit au niveau hépatique (Cartaña *et al.*, 1992).

Les taux de glutathion réduit sont diminués, au niveau hépatique et rénal, chez des rats intoxiqués par du cuivre injecté par voie intrapéritonéale à la concentration de 2mg/kg. Une augmentation simultanée des taux de glutathion oxydé ainsi que l'inhibition de l'activité glutathion réductase ont également été observées (Cartaña *et al.*, 1992). La diminution des taux de glutathion réduit peut s'expliquer par son implication dans l'excrétion biliaire du cuivre. L'augmentation des taux de glutathion oxydé peut résulter de l'action oxydante du cuivre sur le glutathion réduit (Christie & Costa, 1984) et/ou de l'inhibition de l'activité de la glutathion réductase (Cartaña *et al.*, 1992).

L'incubation des cellules sanguines humaines avec 10 mM de diéthylthiocarbamate (DDC) entraîne une déplétion du glutathion réduit avec formation de méthémoglobine (Kelner & Alexander, 1986). Une diminution en glutathion réduit a également été observée *in vitro* après exposition de cellules myéloïdes (HL 60) à des concentrations en DDC comprises entre 0,1 et 100 mM (Kelner *et al.*, 1989). Le diéthylthiocarbamate peut se lier aux groupements sulfhydryles des protéines. L'oxydation du glutathion réduit par le DDC est due à la liaison du DDC avec le complexe fer-superoxyde ( $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2^-$ ) de l'oxyhémoglobine, avec production de peroxyde d'hydrogène, de méthémoglobine, de sulfhémoglobine et de disulfiram (qui est la forme oxydée du DDC). Le peroxyde d'hydrogène et le disulfiram réagissent avec les groupements thiols du glutathion ce qui entraîne une déplétion en glutathion réduit.

Le paraquat déplete le glutathion réduit avec augmentation simultanée de la forme oxydée chez des hépatocytes isolés de rats exposés à des concentrations comprises entre 1 et 10 mM (Palmeira *et al.*, 1994). Il entraîne une forte induction de l'activité glutathion réductase de cellules Vero (fibroblastes rénaux de singe) exposées pendant 24 heures à 10 mM de paraquat (Garcia-Alfonso *et al.*, 1995). L'hépatotoxicité du paraquat, composé quinonique, résulterait (1) de la réactivité des anions superoxydes, radicaux hydroxyles ou peroxyde d'hydrogène formés au cours de sa métabolisation, (2) de la déplétion des taux d'ATP et de NADPH (Bramble *et al.*, 1994 ; Palmeira *et al.*, 1994).



Kang & Enger (1988) ont montré que le glutathion réduit avait un rôle protecteur contre la cytotoxicité du cadmium. La déplétion du glutathion par la buthione sulfoximide (BSO) entraînerait la sensibilisation de cellules pulmonaires humaines (A549-T27) à la toxicité du cadmium, ces cellules étant en temps normal résistantes à son action toxique. Cette résistance serait due à la présence de taux de glutathion intracellulaire élevés. D'autre part, l'ajout de glutathion exogène à des fibroblastes rénaux de rats (NRK-49F) intoxiqués *in vitro* par 0,5  $\mu\text{M}$  de cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) permet de bloquer les effets toxiques du métal, en l'occurrence l'inhibition de la synthèse d'ADN. L'apport de glutathion permet d'augmenter le taux de glutathion réduit intracellulaire et de diminuer fortement l'accumulation du cadmium dans les cellules (Kang, 1992).

Les travaux sur le glutathion réduit ont permis d'identifier de nombreuses molécules chimiques pouvant entraîner une déplétion du glutathion intracellulaire *in vivo* et *in vitro*. Ces composés peuvent dépléter le glutathion réduit en :

\* *agissant directement au niveau du cycle cellulaire du glutathion* : c'est le cas de molécules comme la D,L-buthionine-S,R-sulfoximide (BSO) qui inhibe la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase et empêche donc la synthèse du glutathion (Andreoli *et al.*, 1992 ; Applgate *et al.*, 1992 ; Liebross & Wetterhahn, 1992) ou comme la N-glycylglycine, qui inhibe la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (Plummer *et al.*, 1981).

\* *se conjuguant avec le glutathion* : des composés comme le diéthylmaléate (Casini *et al.*, 1984 ; Deneke *et al.*, 1985 ; Maellaro *et al.*, 1992 ; Tate & Flory, 1993), la phorone (Plummer *et al.*, 1981 ; Romero & Roma, 1989) ou la N-éthylmaléimide (Hugues *et al.*, 1990) peuvent dépléter les taux de glutathion réduit intracellulaires en se conjuguant avec la molécule, cette conjugaison étant catalysée par les glutathion transférases.

\* *oxydant le glutathion réduit* : (i) le diamide, l'azoester (méthylphényl diazène carboxylate), la tétrathionate de sodium, l'allylalcool (Plummer *et al.*, 1981 ; Romero & Roma, 1989 ; Romero & Galaris, 1990), la ménadione ou le *t*-buthyl hydroperoxyde (Comporti, 1987) qui vont oxyder directement les groupements thiols libres, (ii) le bromobenzène ou l'acétaminophène (Comporti, 1987 ; Maellaro *et al.*, 1992) qui vont, lors de leur métabolisation, générer des réactifs électrophiles, oxydants du glutathion, (iii) le BCNU (1,3-bis (2-chloroéthyl)-1-nitrosourée) qui agit comme un agent alkylant (Romero & Galaris, 1990).

Si de nombreux métaux comme le cuivre, le cadmium, le fer ou le nickel ont souvent été étudiés pour leurs actions toxiques chez les mammifères, une carence en métal au niveau cellulaire peut, sur le plan physiologique, être à l'origine de pathologies graves.

En effet, des rats nourris avec une alimentation carencée en cuivre ont des activités glutathion peroxydase sélénium-dépendante, glutathion réductase et catalase cardiaques et hépatiques endogènes plus faibles que les individus témoins. Cette diminution des capacités antioxydantes se traduit par des dommages oxydatifs importants au niveau cardiaque (Chien *et al.*, 1994). Moriarty *et al.* (1994) suggèrent qu'un déficit en cuivre pourrait diminuer la concentration en ARNm responsables de la synthèse de la glutathion peroxydase sélénium-dépendante. Ainsi, la diminution de l'activité mesurée chez les rats alimentés avec une nourriture carencée en cuivre résulterait d'une réduction de la synthèse de l'enzyme.

Chez les rats, une nourriture dépourvue de fer a montré, au niveau hépatique, des diminutions de l'activité glutathion peroxydase sélénium-dépendante et de la concentration en sélénium. En présence de desferrioxamine, chélateur du fer, la concentration en ARNm pour la synthèse de glutathion peroxydase sélénium-dépendante est diminuée, ce qui suggère que le facteur modulateur des ARNm pour la glutathion peroxydase sélénium-dépendante serait un pool de fer libre intracellulaire (Moriarty *et al.*, 1994).

## II.3. LE STRESS OXYDANT CHEZ LES ESPECES AQUATIQUES

L'étude du stress oxydant chez les espèces aquatiques a débuté par la mise en évidence des capacités antioxydantes chez les poissons dans les années 80. Les travaux sur les invertébrés aquatiques, bivalves ou crustacés, concernant la production des espèces réactives et ses conséquences ont été entrepris depuis une dizaine d'années. La distribution des systèmes antioxydants, leurs niveaux d'activités et leurs réponses face à un stress chimique ont été étudiés chez les vertébrés et les invertébrés aquatiques. Le rôle de la pollution au sein de l'environnement commence à être étudié en tant que facteur de stress oxydant.

### II.3.1. Activités antioxydantes endogènes chez les espèces aquatiques.

D'un point de vue qualitatif, les organismes aquatiques sont dotés des mêmes capacités antioxydantes que les mammifères. Les taux élevés en oxygène dans les branchies et dans la vessie gazeuse des poissons, les variations intertidales de pression en oxygène (identique au mécanisme d'hyperoxie-anoxie) chez les invertébrés des zones côtières marines ou les taux élevés en acides gras polyinsaturés chez les poissons sont des facteurs susceptibles d'entraîner un stress oxydant, voire des facteurs pouvant rendre les espèces aquatiques plus sensibles à l'action d'oxyradicaux.

Chez les poissons, les activités glutathion peroxydase et catalase sont présentes dans tous les tissus, avec une prédominance au niveau hépatique et sanguin ; le muscle rouge, les branchies, le cœur et la rate possèdent des activités moindres mais non négligeables (Aknes & Njaa, 1981). Chez la morue, ces activités antioxydantes sont majoritaires au niveau branchial (Lemaire *et al.*, 1993). Aknes & Njaa (1981) ont trouvé des variations allant jusqu'à un facteur 4 pour l'activité catalasique mesurée sur différentes espèces d'une même famille.

Les activités antioxydantes mesurées chez les espèces aquatiques sont en général inférieures à celles des mammifères. Dans une étude comparative des activités glutathion peroxydase sélénium-dépendante mesurées dans plusieurs tissus pour 5 espèces de mammifères et 4 espèces de poissons, Tappel *et al.* (1982) ont montré que les activités trouvées chez les poissons étaient en général bien inférieures à celles des mammifères, à l'exception de la carpe pour laquelle elles sont du même ordre.

Les activités glutathion peroxydases et catalase ainsi que les taux de glutathion réduit et oxydé chez la truite, la grenouille et le xénope sont 5 à 10 fois plus faibles que chez le rat et le cochon d'Inde selon les paramètres et les tissus (foie, cerveau, poumon ou branchies) étudiés (Lopez-Torres *et al.*, 1993).

Une étude comparative sur les activités glutathion peroxydases totale et sélénium-dépendante mesurées dans différents tissus (glande digestive, tissus respiratoire et musculaire) chez la moule (*Mytilus edulis*), la pétoncle (*Pecten maximus*), le crabe (*Carcinus maenas*) et l'étoile de mer (*Asterias rubens*) a montré que les activités étaient les plus élevées au niveau digestif chez la moule, la pétoncle et l'étoile de mer et au niveau du tissu respiratoire chez le crabe (Gamble *et al.*, 1995).

Les activités enzymatiques mesurées dans les glandes digestives des bivalves sont du même ordre de grandeur qu'au niveau hépatique chez les poissons. Chez *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*, bivalves les plus couramment étudiés, les activités dans les glandes digestives sont influencées par :

- \* *la ponte*, qui entraîne chez *Mytilus galloprovincialis*, une augmentation des activités antioxydantes en mars-avril, suivie d'une diminution progressive tout au long du printemps alors que les conditions climatiques s'améliorent et la disponibilité des nutriments augmente (Solé *et al.*, 1995),

- \* *l'âge*, qui sensibilise les bivalves (*Mytilus edulis*) aux effets oxydants. En effet, les organismes âgés de 10 ans et plus ont des activités glutathion peroxydases et catalase ainsi que des taux de glutathion beaucoup plus faibles, ce qui explique que les effets des oxyradicaux soient plus importants chez les bivalves plus âgés, surtout en ce qui concerne la lipoperoxydation (Viarengo *et al.*, 1991),

- \* *la teneur en oxygène* : les activités antioxydantes sont diminuées en conditions d'anaérobiose, alors qu'elles retrouvent leurs taux initiaux lorsque les conditions d'oxygénation sont rétablies (Viarengo *et al.*, 1989).

### **II.3.2. Réponses des organismes aquatiques lors d'expositions à des xénobiotiques.**

Les principales études relevées dans la littérature concernant le stress oxydant chez les espèces aquatiques sont répertoriées dans les tableaux 1, 2, 3 et 4, avec le rappel des conditions d'exposition, des espèces utilisées, des paramètres contrôlés et des réponses qualitatives obtenues. Le tableau 1 correspond aux études expérimentales réalisées *in vitro* avec des métaux, les tableaux 2 et 3 aux essais réalisés *in vivo* avec des substances minérales et organiques et le tableau 4 aux études réalisées *in situ* ou au laboratoire avec des sédiments provenant de sites naturels contaminés.

La réponse de l'activité de la catalase est souvent précoce. L'augmentation de cette activité enzymatique, observée en présence de sédiments contaminés par les HAPs et les PCBs (Livingstone *et al.*, 1993 ; Rodriguez-Ariza *et al.*, 1993) semble dûe à la surproduction d'oxyradicaux induite par les xénobiotiques. Cependant, *in situ* les relations doses-effets sont loin d'être évidentes. Les réponses semblent être influencées par d'autres facteurs que les teneurs en polluants : les taux de contaminants mesurés dans les tissus varient selon les saisons, d'où une probable variation concernant le métabolisme des contaminants (Livingstone *et al.*, 1995). Une augmentation de l'activité de la catalase a également été observée lors d'expositions d'organismes aquatiques (i) au paraquat (Gabiellak & Klékot, 1985 ; Wenning *et al.*, 1988) ou à un mélange de plomb et de zinc (Dimitrova *et al.*, 1994) *in vivo*, (ii) au chrome (Roche & Bogé, 1993), au cuivre ou au mercure (Gwozdziński *et al.*, 1992) *in vitro*.

Les activités glutathion peroxydase sélénium-dépendante et catalase sont toutes deux augmentées en présence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et de polychlorobiphényles (PCBs), *in situ* ou en laboratoire (Rodriguez-Ariza *et al.*, 1993 ; Solé *et al.*, 1995) ou de paraquat (10 ppm) *in vivo* (Gabiellak & Klékot, 1985).

Chez des limandes prélevées en mer du Nord au niveau de sites pollués par des hydrocarbures et des métaux (Livingstone *et al.*, 1993), ainsi que chez des carpes exposées au laboratoire à du cuivre (25 ppm) et à du zinc (10 ppm) (Radi & Matkovics, 1988), l'activité de la glutathion peroxydase sélénium-dépendante était augmentée tandis que celle de la catalase était diminuée. Ceci peut s'expliquer par une surproduction de peroxyde d'hydrogène capable de stimuler la glutathion peroxydase sélénium-dépendante et d'inhiber la catalase.

	CONCENTRATIONS (mM)	DURÉE D'EXPOSITION	SOD	MnSOD	SeGPx	GRd	Catalase	MDA	AUTEURS
<b>Chrome</b> Poisson/milieu marin <i>Dicentrachus labrax</i>	0,01 à 2 incubation des globules rouges	24 heures (20°C)	=	++(a) - (b)	+		++	= (total) ++(libre)	Roche et Bogé, 1993
<b>Cuivre</b> Poisson/marin <i>Dicentrachus labrax</i> Homme	0,1 à 3 incubation des globules rouges	1 heure (température ambiante)	++ =	= =	+		+ =		Gwozdziński et al., 1992
Poisson/marin <i>Dicentrachus labrax</i>	0,01 à 0,1 incubation des globules rouges	24 heures (20°C)	-	=	-		=	= (total) ++(libre)	Roche et Bogé, 1993
<b>Mercure</b> Poisson/marin <i>Dicentrachus labrax</i> Homme	0,1 à 3 incubation des globules rouges	1 heure (température ambiante)	++ =	= =	= =		+ =		Gwozdziński et al., 1992
Poisson/eau douce et marin <i>Mugil cephalus</i> <i>Micropogonias undulatus</i>	25 incubation des microsomes hépatiques	non détaillée						--	Wofford et Thomas, 1988
<b>Zinc</b> Poisson/marin <i>Dicentrachus labrax</i>	0,001 à 1 incubation des globules rouges	24 heures (20°C)	-	-	-		=	= (total) ++(libre)	Roche et Bogé, 1993

TABLEAU 1 : MODIFICATIONS D'ACTIVITÉS OU DE CONCENTRATIONS DES PARAMÈTRES ANTIOXYDANTS ET DU MALONALDÉHYDE DE POISSONS OU DE BIVALVES EXPOSÉS À DES MÉTAUX LORS D'EXPÉRIMENTATIONS IN VITRO AU LABORATOIRE : AUGMENTATION (+) DIMINUTION (-) PAR RAPPORT AU TÉMOIN.

SUBSTANCE ETUDIEE espèce	CONC. (mg/l)	DUREE D'EXPOSITION	SOD	GPxtot	CAT	MDA	GSH +GSSG	GCS	DT diaphorase	AUTEURS
Color 1254 poisson/marin <i>Scopelogobius undulatus</i>	0,5mg/g nourriture	17 jours		+	(f,o)	= (f) ++ (o)	= (b)			Thomas et Wofford, 1993
Bivalve/marin <i>Mytilus edulis</i>	0,05	6 jours	=	=	=	=			++	Livingstone et al., 1990
Bivalve/marin <i>Mytilus edulis</i>	1	6 jours				++	=			Ribera et al., 1991
Chlorothalonil poisson/eau douce <i>Stenotomus punctatus</i>	0,042	0 24 72 144 heures					= (f, b) ++ (f, b) + (f) ++ (b)	= (f, b) = (f, b) + (f) = (b)		Gallagher et al., 1992
Fa S,S,S-tri-n-butylmercaptan (nBM) poisson/eau douce <i>Stenotomus punctatus</i>	DEF: 1 à 40% de la CL50 nBM: 7 à 45% de la CL50	21 jours	=	=	=	=	=			Mather- Mihaich et Di Giulio, 1986
Chlorothalonil Bivalve/marin <i>Mytilus edulis</i>	1	6 jours	=	=	=	=			++	Livingstone et al., 1990
Bivalve/marin <i>Mytilus edulis</i>	1	6 jours				+ t	-			Ribera et al., 1991
Poisson/eau douce <i>Stenotomus punctatus</i> <i>Merluccius nebulosus</i>	40 injection i.p	2 jours					+ t + t			Hasspieler et al., 1994
Chlorothalonil Bivalve/marin <i>Mytilus edulis</i>	?	6 à 36 heures	++ t		++ t	++ t	> contrôle			Wenning et al., 1988
Poissons/eau douce <i>Prunus carpio</i> <i>Carassius auratus</i> <i>Salmo trutta</i>	10	96 heures	- t = - t	++ ++ =	- ++ =	++ t + t =				Gabrielak et Klekot, 1985
Hydroperoxyde poisson/eau douce <i>Stenotomus punctatus</i> <i>Merluccius nebulosus</i>	125 injection i.p	8 heures					++ t - t			Hasspieler et al., 1994
Effluent d'usine de pâte à papier poisson/eau douce <i>Stenotomus punctatus</i>	10-20-40%		=	=	+	=	=			Mather- Mihaich et Di Giulio, 1991

Tableau 2 : Modifications d'activités ou de concentrations des paramètres antioxydants et du malonaldéhyde de poissons ou de bivalves exposés à des **composés organiques** lors d'expérimentations au laboratoire : augmentation (+), diminution (-) par rapport aux témoins.

branchies, (f) : foie, (o) : ovaires.  
Indique que la variation est transitoire.

F : S,S,S-tri-n-butyl phosphotriothioate (herbicide organophosphoré) : CL50 entre 5,6 et 18,8 mg/l.  
S,S,S-tri-n-butylmercaptan : métabolite du DEF : CL50 entre 1100 et 3600 mg/l

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 (HgCl <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.

**TABEAU 3 : 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>	POLLUANTS/SEDIMENTS 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.

**TABEAU 4 : 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).

La glutathion peroxydase sélénium-dépendante a un rôle protecteur important contre la lipoperoxydation (Winston & Di Giulio, 1991). Cependant, l'augmentation de son activité n'est pas toujours suffisante pour éviter des effets de lipoperoxydation induits par les contaminants. Certaines études ont mis en évidence une diminution de l'activité glutathion peroxydase sélénium dépendante associée à une lipoperoxydation importante chez des limandes exposés à des sédiments fortement contaminés par les HAPs et les PCBs (Livingstone *et al.*, 1993) ou chez *Micropogonias undulatus*, poisson marin, lors d'une exposition à long terme (33 jours) au cadmium (1 mg/l) (Wofford & Thomas, 1993).

La mesure des taux de glutathion réduit est souvent associée à celles des activités glutathion peroxydases et catalase.

Une augmentation des taux de glutathion réduit a été observée chez des organismes aquatiques en réponse à une contamination expérimentale par des sédiments provenant de sites naturels contaminés (Di Giulio *et al.*, 1993), par la ménadione (40 mg/l) (Hasspieler *et al.*, 1994) ou le mercure (0,1 mg/l) (Patel *et al.*, 1990). Cette réponse peut résulter d'une augmentation de l'activité de la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase, enzyme qui synthétise le glutathion, comme dans le cas de poissons chats exposés au chlorothalonil, un biocide cancérigène éliminé sous forme de conjugué aux glutathion transférases (Gallagher *et al.*, 1992). Cependant l'induction de la synthétase n'explique pas toujours l'augmentation du taux de glutathion réduit : Nishimoto *et al.* (1995) n'ont pas d'explications aux teneurs hépatiques en glutathion réduit parfois plus élevées chez les soles *Pleuronectes vetulus*, prélevées sur un site connu pour la pollution importante de ses sédiments par les HAPs par rapport aux soles témoins.

*In situ*, Rodriguez-Ariza *et al.* (1993) ont observé une augmentation des taux de glutathion oxydé, traduisant un stress des poissons prélevés dans les sites contaminés par des HAPs et des PCBs, par rapport aux individus témoins. L'augmentation du glutathion oxydé, observé également par Di Giulio *et al.* (1993) lors de l'exposition au laboratoire de poissons chats à des sédiments contaminés par le même type de polluants pourrait résulter de l'oxydation directe du glutathion réduit par les xénobiotiques.

Les teneurs individuelles endogènes des paramètres antioxydants sont importantes et sont souvent à l'origine des réponses différentes observées selon les espèces exposées à des contaminants.

Hasspieler *et al.* (1994) ont montré que le poisson à tête boule (*Ameriurus nebulosus*) possédait une activité glutathion peroxydase sélénium-dépendante élevée et une activité glutathion réductase et un taux de glutathion réduit très faibles. Cette présence élevée d'activité glutathion peroxydase sélénium-dépendante suggère une capacité plus importante de défense contre la toxicité des hydroperoxydes. Pourtant ces poissons sont plus sensibles à

l'action toxique de polluants organiques. Cette susceptibilité s'explique par une déplétion importante du taux de glutathion réduit suite à l'exposition aux polluants, ce déficit ne peut pas être rapidement comblé du fait de l'activité glutathion réductase trop faible.

L'inhibition des taux de glutathion réduit est souvent associée à des effets de lipoperoxydation importants, comme cela a été observé lors de l'exposition de bivalves marins (*Mytilus edulis*) à du cuivre (40  $\mu\text{g/l}$ ) (Viarengo *et al.*, 1988).

L'activité de la glutathion réductase serait un paramètre intéressant à suivre dans le contexte de l'étude du stress oxydant induit par les xénobiotiques, mais elle reste encore très peu étudiée. Patel *et al.* (1990) ont montré une inhibition importante de cette activité chez des clams (*Anadra granosa*) exposées à 100  $\mu\text{g/l}$  de mercure, accompagnée d'une augmentation du glutathion réduit. Mais, en l'absence d'informations sur les autres enzymes impliquées dans le métabolisme du glutathion, il est difficile d'expliquer l'augmentation du tripeptide.

### **II.3.3. Intérêt des biomarqueurs de stress oxydant en écotoxicologie.**

Il existe 3 grands types de biomarqueurs : (i) les *biomarqueurs d'exposition*, indicateurs de l'apparition et de l'exposition prolongée des organismes aux polluants, (ii) les *biomarqueurs d'effets*, indicateurs des dommages pathologiques et des réponses biologiques suite à l'exposition à des toxiques et (iii) les *biomarqueurs de susceptibilité*, indicateurs du rôle des variations génétiques dans les réponses toxiques enregistrées (Speakall, 1994 ; Trimbell *et al.*, 1994).

L'intérêt des paramètres antioxydants réside dans le caractère aspécifique de leur réponse, ce qui est un avantage dans le cadre de la contamination multiple des écosystèmes. La réponse des systèmes antioxydants aux xénobiotiques peut consister dans un premier temps en une augmentation d'activité. Ce phénomène traduit l'adaptation des individus à un nouvel environnement, la phase d'augmentation reste cependant modérée et de courte durée comparativement aux augmentations d'activités EROD (éthoxyrésorufine *O*-dééthylase) observées suite à l'exposition à des composés organiques.

Les réponses des systèmes antioxydants peuvent être transitoires : les niveaux d'activités peuvent retrouver leurs taux initiaux après une première phase d'induction, alors que les conditions d'intoxications ne semblent pas avoir été modifiées, comme l'ont montré les études de Solé *et al.* (1995) sur bivalves prélevés *in situ* de janvier à juin sur des sites contaminés et celles de Livingstone *et al.* (1993) sur poissons exposés pendant 144 jours au laboratoire à des sédiments contaminés par les HAPs et les PCBs.

L'induction d'activité peut n'intéresser qu'un seul paramètre et traduire ainsi un effet compensatoire. L'activation des systèmes antioxydants peut, dans un premier temps, permettre de limiter la surproduction d'oxyradicaux et empêcher leurs effets, mais ce n'est pas toujours le cas, car ces systèmes de protection peuvent être débordés permettant ainsi l'apparition de dommages oxydatifs importants.

Les composants du système antioxydant peuvent également être inhibés, comme dans le cas d'intoxications aiguës. Ce phénomène d'inhibition est, la plupart du temps, associé à des effets de lipoperoxydation traduisant des effets de toxicité et un état de non compensation des lésions cellulaires.

Les systèmes antioxydants pourraient être plus que de simples indicateurs de la contamination du milieu. Ils pourraient également servir comme biomarqueurs de toxicité, leur inhibition ou leur déplétion pouvant être la traduction des effets de toxicité en réponse à un stress environnemental.

Le glutathion semble être un bon indicateur de l'altération précoce des individus, sa déplétion traduisant un état instable et précaire. Cependant une diminution du taux de glutathion réduit peut résulter (i) de la mobilisation du tripeptide pour la conjugaison de métabolites toxiques catalysée par les glutathion transférases ou (ii) de la réduction du glutathion par certains toxiques. La diminution du taux de glutathion réduit sera sans effets cellulaires majeurs si les enzymes impliquées dans la synthèse sont suffisamment actives pour combler un déficit qui ne sera donc que transitoire. Dans le cas contraire, elle sera synonyme de dommages cellulaires importants pouvant conduire à la mort cellulaire.

Notre étude expérimentale portera sur l'étude du glutathion et des enzymes associées à son métabolisme, telles que les glutathion peroxydases et la glutathion réductase. Cette dernière est encore très peu étudiée chez les organismes aquatiques, mais elle nous a paru particulièrement importante à cause de son rôle de régénération du glutathion réduit. Nous avons associé à ces différents paramètres l'étude de l'activité catalasique afin de comparer sa réponse à celle des glutathion peroxydases.

La plupart des études relevées dans la littérature portent sur l'étude de paramètres antioxydants chez les poissons et chez quelques bivalves marins. Nous avons choisi de travailler sur des bivalves d'eau douce, *Unio tumidus*, qui peuvent se révéler d'intéressants indicateurs pour le contrôle des écosystèmes aquatiques dulçaquicoles. Nous avons tout d'abord étudié l'influence des saisons, de la période de reproduction et du sexe des individus chez ces bivalves. Nous avons ensuite étudié si les paramètres biologiques antioxydants décrits précédemment pourraient constituer des biomarqueurs d'exposition voire de toxicité intéressants chez des bivalves exposés à des polluants dans l'environnement.

# **III. MATERIEL ET METHODES**

### **III.1. MATERIEL BIOLOGIQUE ET METHODES**

#### **III.1.1. Matériel biologique.**

Les dosages des différents paramètres enzymatiques et des taux de glutathion ont été réalisés sur les glandes digestives et les branchies d'un bivalve d'eau douce, *Unio tumidus*.

##### a. Systématique.

**Embranchement** : Mollusques

**Classe** : Lamellibranches

**Ordre** : Eulamellibranches homomyaires

**Famille** : Unionidés

**Genre et espèce** : *Unio tumidus*

##### b. Morphologie et habitat.

Les bivalves sont des mollusques caractérisés par une masse viscérale symétrique aplatie transversalement et enveloppée par le manteau qui forme deux grands lobes dont chacun sécrète une valve de la coquille.

Ils possèdent, situées de part et d'autre de la masse viscérale, des branchies lamellaires à l'épithélium pourvu de puissants cils vibratils dont les battements génèrent un courant d'eau continu.

*Unio tumidus* vit dans les écosystèmes dulçaquicoles à l'interface eau-sédiment, plus ou moins enfoui dans le sédiment. Sa coquille, fortement nacrée intérieurement est recouverte d'une épaisse cuticule très foncée de couleur brun-vert. Ce mollusque se déplace lentement dans le sédiment par contraction du pied et se nourrit de microalgues par filtration continue du milieu aquatique.

Pendant la période de reproduction qui débute à l'automne, les larves ou *glochidium* sont logées dans une poche incubatrice, ou *marsupium*, formée par une partie des branchies. En effet, pendant cette période, les branchies perdent une partie de leur fonction respiratoire pour acquérir un rôle incubateur. Au printemps quand la température de l'eau remonte, les larves sont expulsées par les orifices siphonaux. Le développement des larves comporte une phase parasitaire au cours de laquelle elles se fixent aux branchies ou à la peau de poissons hôtes à l'aide de crochets dont elles sont pourvues ; elles se nourrissent grâce à un faux manteau, ou *pseudopallium* qui fonctionne comme un appareil absorbant. Arrivées à maturation, les larves se détachent du poisson hôte et commencent leur vie de bivalve à proprement parler.

*Unio tumidus* nous est apparu comme un organisme de choix car :

(1) sa taille importante (6,5 cm de long et 3,5 cm de large en moyenne) permet le dosage de plusieurs paramètres biochimiques antioxydants sur un même individu, ce qui évite d'avoir à pooler les tissus ; l'évaluation de la variabilité inter-individu est donc possible,

(2) sa situation à l'interface eau-sédiment est intéressante, ainsi il peut être contaminé à la fois par les xénobiotiques de l'eau et du sédiment,

(3) sa faible mobilité permet la mise en cage des individus et des études de transfert sur des sites pollués. La mise en cage ne devrait pas induire de stress majeur, au contraire de ce qui peut être observé avec les poissons.

### **III.1.2. Echantillonnage - Conservation - Préparation des échantillons**

#### **a. Echantillonnage.**

Notre étude a été réalisée à l'aide d'organismes prélevés sur deux sites contrôles :

\* un étang (Gavisse) qui a servi à l'évaluation des niveaux de base des activités enzymatiques antioxydantes et des taux de glutathion au printemps et à l'automne pour les périodes situées entre mai 1993 et octobre 1994,

\* un second site plus étendu (Manom), sur lequel ont été prélevés les organismes utilisés pour les études de transfert réalisées entre Octobre 1994 et Octobre 1995.

Nous avons utilisé deux sites différents afin d'étudier une éventuelle variabilité des "témoins" liée au site de prélèvement. Les analyses physicochimiques des sédiments prélevés sur les deux sites (Annexe1) a montré que ces deux sites étaient de qualité équivalente.

#### **b. Conservation.**

Dans tous les cas, les organismes ont été disséqués sur place, immédiatement après échantillonnage. Les branchies et les glandes digestives ont été placées individuellement dans des cryotubes et congelées directement dans l'azote liquide à -196°C. Les tissus sont conservés au laboratoire dans ces conditions jusqu'au moment des dosages.

Lors des expérimentations, les tissus sont décongelés rapidement et pesés avant homogénéisation.



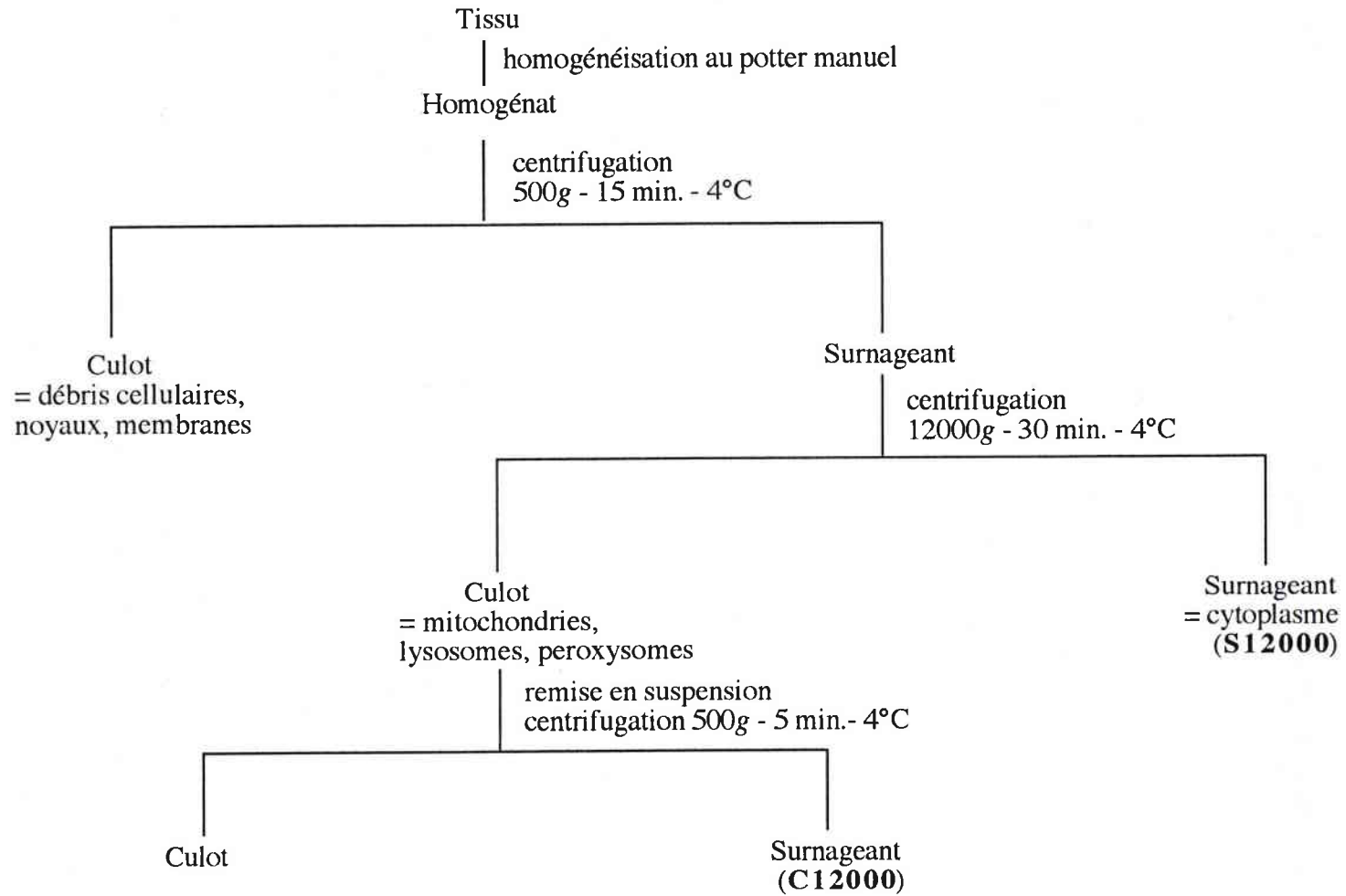


Figure 4 : Protocole de préparation des fractions subcellulaires.

### c. Préparation des échantillons : protocole de fractionnement.

Les enzymes antioxydantes et le glutathion sont localisés dans des compartiments cellulaires différents, soit au niveau cytoplasmique, soit au niveau mitochondrial ou peroxysomal.

Afin d'évaluer les niveaux et les éventuelles différences de sensibilité des différents paramètres en fonction de leur localisation cellulaire, nous avons choisi de réaliser les différents dosages sur la fraction cytosolique et la fraction des organites. Le fractionnement subcellulaire a été réalisé selon le protocole (figure 4) suivant :

1). *homogénéisation des tissus* : après décongélation et pesée, les tissus sont homogénéisés dans du tampon phosphate 50 mM pH=7,60 auquel sont ajoutés du phénylméthylsulfonylfluorure (PMSF, inhibiteur des sérine protéases) et un mélange sérine-borate (inhibiteur de la  $\gamma$ -glutamylcystéine transpeptidase qui hydrolyse le glutathion) à des concentrations finales dans le tampon de 1 mM. L'homogénéisation se fait manuellement, à 4°C, à l'aide d'un potter Elvehjem.

Afin de préserver l'intégrité des organites cellulaires, les glandes digestives sont homogénéisées par 3 coups de potter à raison de 2 ml de tampon d'homogénéisation pour 500 mg de tissu. Pour les branchies, 6 coups de potter sont nécessaires et l'homogénéisation se fait dans 2 ml de tampon pour 1000 mg de tissu.

#### 2). *fractionnement subcellulaire:*

- l'homogénat précédent est centrifugé à 500g pendant 15 minutes à 4°C, afin d'éliminer les débris cellulaires, les noyaux et les fragments membranaires qui se retrouvent dans le culot de centrifugation. Le surnageant (S500) renferme le cytoplasme avec les mitochondries, les microsomes, les peroxysomes et les lysosomes.

- le surnageant S500 est centrifugé à 12000g pendant 30 minutes à 4°C pour séparer le surnageant (fraction cytoplasmique, S12000) du culot (fraction des organites, C12000). Le culot 12000g sera repris et les organites cassés (broyage manuel, 30 coups de potter) afin d'accéder aux enzymes contenues à leur niveau.

La qualité des fractions subcellulaires a été vérifiée lors d'une étude en microscopie électronique des culots de centrifugation 12000g et 105000g de glandes digestives après une homogénéisation douce (3 coups de potter manuel) et une homogénéisation poussée (potter motorisé, 10 aller-retour à 300 tours/minute).

Les images obtenues en microscopie électronique ont montré que l'homogénéisation douce retenue pour le protocole de fractionnement permettait de préserver l'intégrité des organites contenu dans les deux culots de centrifugation (photos 1a et 2a), alors qu'ils étaient détruits lors d'une homogénéisation plus poussée (photos 1b et 2b).

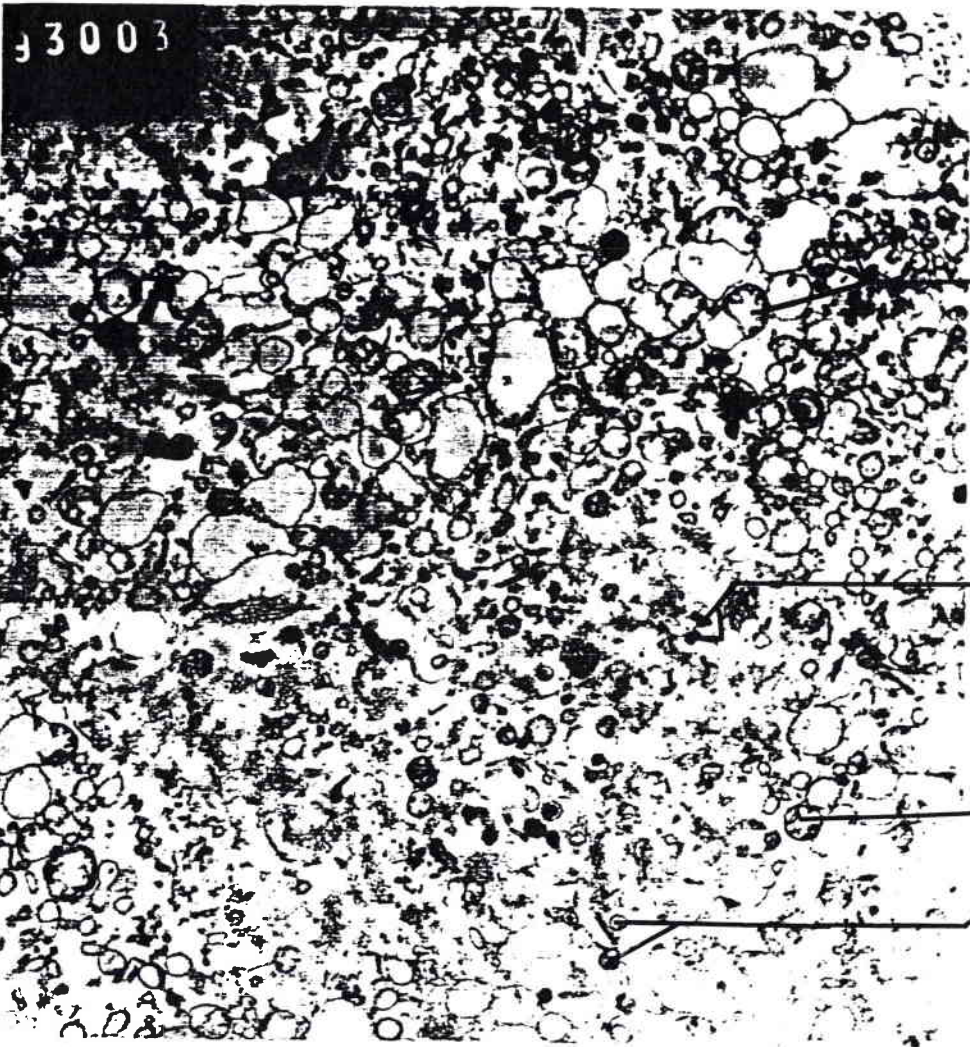


Photo 1a : Unio tumidus  
Homogénéisation manuelle  
C12000

Mitochondries

Peroxisomes

Mitochondrie

Lysosomes

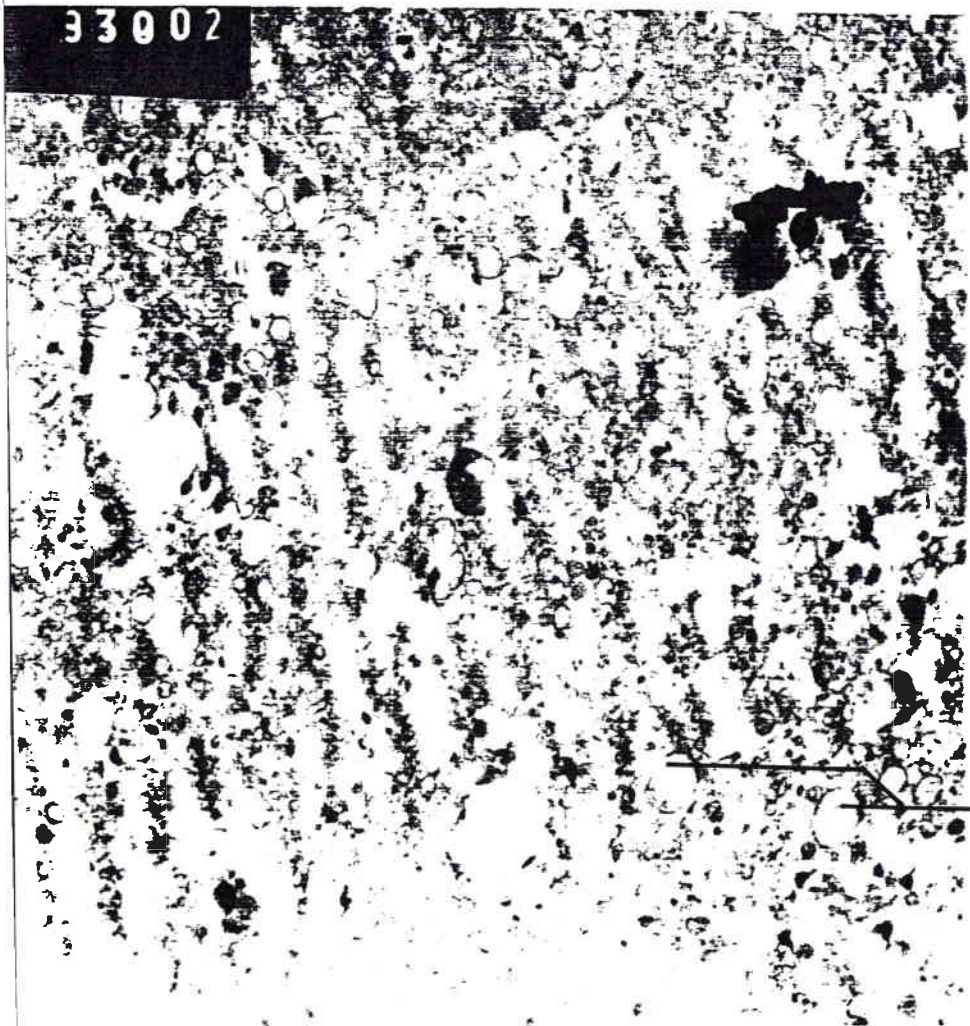


Photo 1b : Unio tumidus  
Homogénéisation mécanique  
C12000

Mitochondries vides



3008

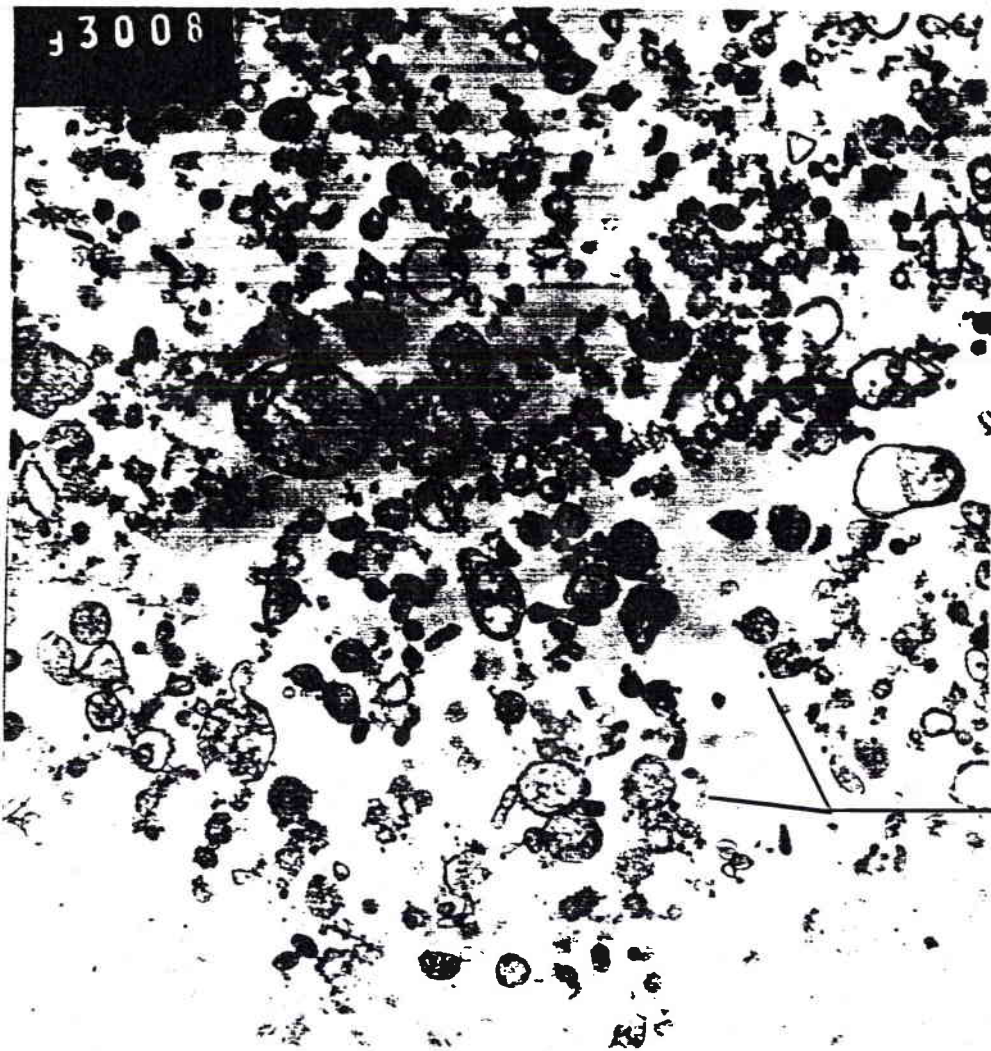


Photo 2a : Unio tumidus

Homogénéisation manuelle  
(3 tours de pilon)

C105000

Vacuoles réticulum  
endoplasmique

Ribosomes

93019

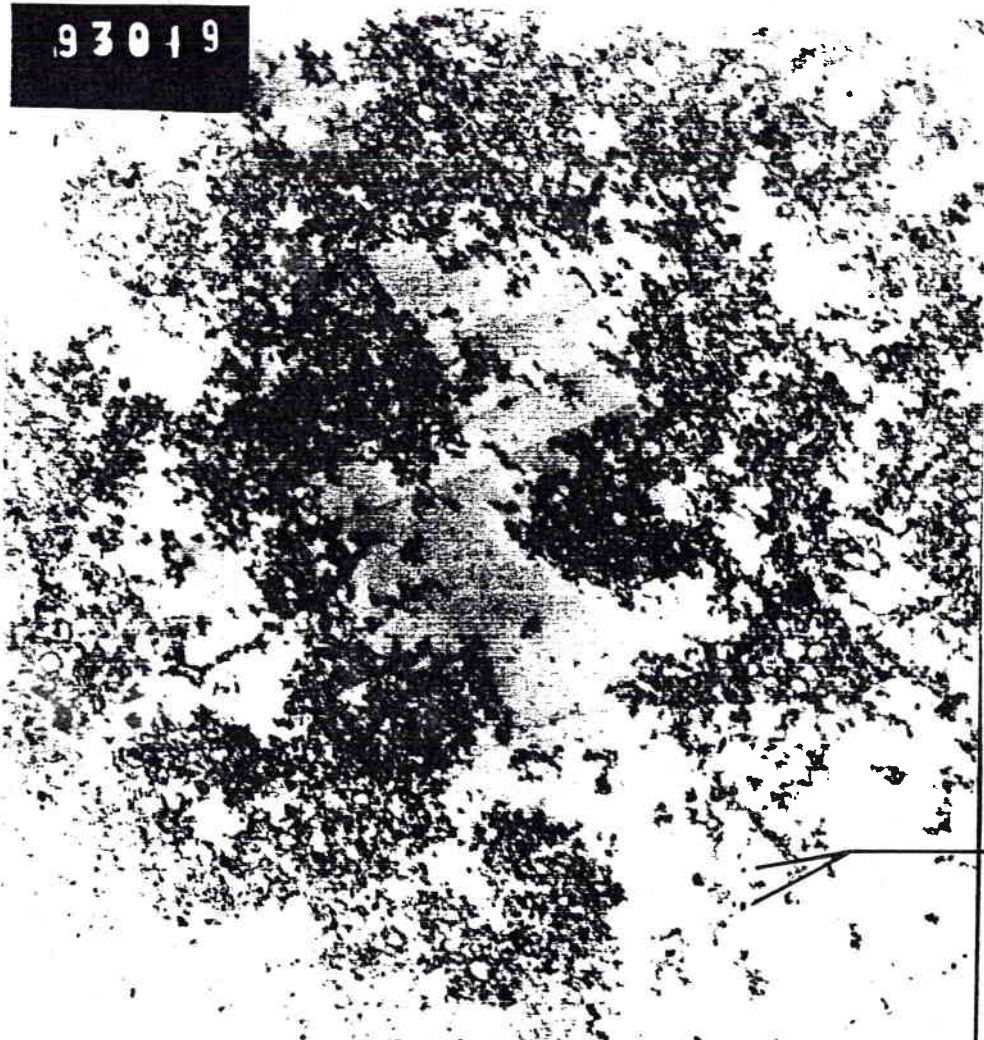


Photo 2b : Unio tumidus

Homogénéisation mécanique  
(10 A.R. 300 tr/mn).

C105000

Ribosomes

### III.1.3. Méthodes analytiques.

#### III.1.3.1. Les enzymes antioxydantes.

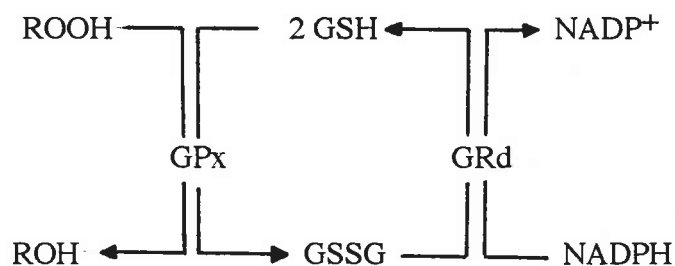
##### a. Les glutathion peroxydases.

*Principe de la méthode :*

L'activité glutathion peroxydasique est évaluée à l'aide de la méthode décrite par Paglia & Valentine (1967) modifiée par Lawrence & Burk (1976).

Le principe de cette méthode est le suivant : en présence de ses deux substrats (le glutathion réduit et un peroxyde) la glutathion peroxydase contenue dans l'échantillon biologique va oxyder le glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG), lequel sera à son tour réduit en présence de NADPH par la glutathion réductase (GRd) ajoutés dans le mélange réactionnel.

La réduction du NADPH est suivie au spectrophotomètre à 340 nm pendant 5 minutes.



Comme il existe deux principales formes de glutathion peroxydases, une sélénium-dépendante et une sélénium-indépendante, il est important de pouvoir différencier ces deux activités enzymatiques pour déterminer si une forme semble plus sensible aux xénobiotiques que l'autre. La différence entre les deux glutathion peroxydases se fait à l'aide du substrat de l'enzyme ajouté au mélange réactionnel : l'hydroperoxyde de cumène est un substrat pour les deux formes de glutathion peroxydases ; le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est un substrat spécifique de la glutathion peroxydase sélénium-dépendante.

Lorsque H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est utilisé comme substrat, la mesure se fait en présence d'azide de sodium pour inhiber la catalase dont le rôle est aussi de décomposer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

L'activité de la glutathion peroxydase sélénium-indépendante peut être obtenue de deux façons : soit directement en utilisant l'hydroperoxyde de cumène comme substrat, après avoir inhibé la glutathion peroxydase sélénium-dépendante avec de la N-éthylmaléimide, soit par différence entre les activités glutathion peroxydase totale et sélénium-dépendante.

Ces deux modes de détermination de l'activité glutathion peroxydase sélénium-indépendante ont été utilisés simultanément.

*Réactifs utilisés :*

- \* Tampon phosphate de potassium 50 mM pH = 7,60 ± 0,02
- \* Solution tamponnée de glutathion réduit (GSH) 30 mM (Sigma G 4251)
- \* Solution de NADPH 3,6 mM (Boehringer n° 107 824) dans NaHCO<sub>3</sub> 0,5 %
- \* Solution de glutathion réductase de levure de boulanger (GRd) 30U/ml (Sigma G 4751)
- \* Solution aqueuse d'hydroperoxyde de cumène (CuOOH) 6 mM (Sigma CO 524)
- \* Solution tamponnée de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3 mM (Prolabo n° 23 619 231)
- \* Solution aqueuse d'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>) 1 mM (UCB 8513)
- \* Solution aqueuse de N-éthyl maléimide (NEM) 10 mM (Sigma E 3876)

*Protocole expérimental :*

BLANC		ESSAI
2,3 ml tampon phosphate + 100 µl GSH + 100 µl NADPH + 100 µl GRd + 300 µl tampon phosphate		2,3 ml tampon phosphate + 100 µl GSH + 100 µl NADPH + 100 µl GRd + 300 µl échantillon dilué dans tampon
• mélange des cuves par retournement, puis incubation dans le spectrophotomètre à 25°C pendant 5 minutes		
+ 100 µl de substrat (CuOOH ou H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )		+ 100 µl de substrat (CuOOH ou H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
• mélange puis lecture de la diminution de la densité optique (DO) à 340 nm toutes les 12 secondes pendant 5 minutes.		

**Remarques :** (1) quand le substrat est  $H_2O_2$  on met dans chaque cuve 2,2 ml de tampon (au lieu de 2,3 ml) et 100  $\mu l$  de  $NaN_3$ . (2) pour le dosage de la glutathion peroxydase sélénium indépendante, 300  $\mu l$  d'échantillon seront préalablement incubés en présence de 100  $\mu l$  de NEM 10 mM à température ambiante pendant 30 minutes, puis l'échantillon sera dosé comme décrit précédemment avec  $CuOOH$  comme substrat.

### **b. La glutathion réductase.**

#### *Principe de la méthode :*

L'activité de cette enzyme est évaluée à l'aide d'une méthode directe décrite par Carlberg & Mannervik (1985). Cette technique est basée sur le suivi, à 340 nm, de la réduction du NADPH par l'enzyme en présence de son deuxième substrat le glutathion oxydé (GSSG).

#### *Réactifs utilisés :*

- \* Tampon phosphate de potassium 50 mM, pH = 7,60  $\pm$  0,02
- \* Solution de NADPH 2mM (Boehringer n° 107 824) dans  $NaHCO_3$  0,5 %
- \* Solution tamponnée de GSSG 20 mM (Sigma G 4501)

#### *Protocole expérimental :*

BLANC		ESSAI
2,4 ml tampon phosphate + 150 $\mu l$ GSSG + 150 $\mu l$ NADPH		2,4 ml tampon phosphate + 150 $\mu l$ GSSG + 150 $\mu l$ NADPH
<ul style="list-style-type: none"> <li>• mélange des cuves par retournement, puis incubation dans le spectrophotomètre à 25°C pendant 5 minutes</li> </ul>		
+ 300 $\mu l$ tampon phosphate		+ 300 $\mu l$ échantillon dilué dans tampon
<ul style="list-style-type: none"> <li>• mélange des cuves par retournement puis lecture de la diminution de la densité optique (DO) à 340 nm à 25°C toutes les 12 secondes pendant 5 minutes.</li> </ul>		

### c. La catalase.

#### *Principe :*

La méthode de référence pour évaluer l'activité de la catalase est celle décrite par Beers & Sizer (1951). Elle est basée sur le suivi, à 240 nm, de la consommation d'  $\text{H}_2\text{O}_2$  par l'enzyme. L'activité enzymatique est directement proportionnelle à la cinétique de dégradation d'  $\text{H}_2\text{O}_2$  au cours du temps.

Le seul inconvénient de cette méthode est le dégagement d'oxygène au cours de la réaction, ce dernier pouvant inhiber l'enzyme. On peut pallier à ce problème en mesurant la cinétique enzymatique pendant la première minute de la réaction, alors que le dégagement d'oxygène n'a pas encore lieu.

#### **Réactifs utilisés :**

- \* Tampon phosphate de potassium 50 mM, pH = 7,60 ± 0,02
- \* Solution tamponnée de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 21 mM (Prolabo n° 23 619 231)

#### **Protocole expérimental :**

BLANC		ESSAI
1,9 ml tampon phosphate + 1 ml $\text{H}_2\text{O}_2$		1,9 ml tampon phosphate + 1 ml $\text{H}_2\text{O}_2$
<ul style="list-style-type: none"> <li>• mélange des cuves par retournement, incubation pendant 5 minutes à 25 °C dans le spectrophotomètre, puis ajouter</li> </ul>		
+ 100 $\mu\text{l}$ tampon phosphate		+ 100 $\mu\text{l}$ échantillon dilué dans le tampon
<ul style="list-style-type: none"> <li>• mélange des cuves par retournement puis lecture de la diminution de la densité optique (DO) à 240 nm à 25°C toutes les 12 secondes pendant 5 minutes.</li> </ul>		

#### Remarques :

(1) Dans tous les cas, les solutions doivent être préparées quotidiennement et celles de NADPH, glutathion réductase, hydroperoxyde de cumène et peroxyde d'hydrogène doivent impérativement être conservées à l'abri de la lumière.



(2) L'échantillon à doser sera dilué dans du tampon phosphate afin d'obtenir une cinétique enzymatique exploitable, car avec l'échantillon non dilué la cinétique enzymatique est trop rapide et le substrat est consommé en quelques secondes ce qui ne permet pas de calculer la variation de densité optique en une minute. De plus il est nécessaire de procéder à la dilution des échantillons pour éviter des interférences liées à la coloration des fractions subcellulaires, surtout lors des dosages sur glandes digestives.

### III.1.3.2. Le glutathion.

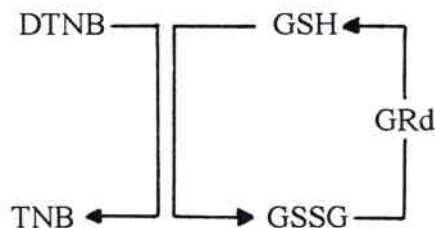
Nous avons testé deux méthodes de dosage :

- \* la méthode enzymatique classique à l'acide dithio-bis-nitrobenzoïque (DTNB) basée sur des mesures spectrophotométriques,
- \* une méthode chromatographique utilisant la chromatographie liquide haute performance (HPLC).

#### **a. La méthode enzymatique au DTNB**

*Principe :*

Cette méthode utilise un réactif spécifique des groupements thiols, le DTNB qui oxyde le glutathion réduit (GSH) avec formation de TNB (acide thio-bis-nitrobenzoïque), de couleur jaune ; le glutathion oxydé formé (GSSG) est à nouveau réduit par la glutathion réductase apportée lors du dosage. La formation de TNB est suivie à 412 nm au spectrophotomètre, elle est proportionnelle à la quantité de glutathion total c'est à dire de glutathion réduit (GSH) et de glutathion oxydé (GSSG). (Akerboom & Sies, 1981 ; Anderson, 1985).



Le glutathion réduit est évalué à l'aide d'une méthode chimique utilisant la formation de TNB lors de l'oxydation du GSH par le DTNB à 37°C et à pH=8. (Rice-Evans *et al.*, 1991). La quantité de TNB formée est proportionnelle à la quantité de GSH.

Le taux de glutathion oxydé est obtenu par la différence entre la quantité de glutathion total (GSH+GSSG) et celle de glutathion réduit (GSH).

### • Le glutathion total (GSH + GSSG)

#### Réactifs utilisés :

- \* Tampon phosphate de potassium 50 mM, pH = 7,60 ± 0,02
- \* Solution de NADPH 0,3 mM (Boehringer n° 107 824) dans NaHCO<sub>3</sub> 0,5 %
- \* Solution tamponnée d'acide dithio-bis-nitrobenzoïque (DTNB) 6 mM (Sigma D 8130)
- \* Solution de glutathion réductase de levure de boulanger (GRd) 266 U/ml (Sigma G 4751)

#### Protocole expérimental :

BLANC  
2,4 ml tampon phosphate  
+ 150 µl NADPH  
+ 75 µl GRd  
+ 75 µl DTNB

ESSAI  
2,4 ml tampon phosphate  
+ 150 µl NADPH  
+ 75 µl GRd  
+ 75 µl DTNB

- mélange des cuves par retournement, puis incubation dans le spectrophotomètre à 25°C pendant 5 minutes

+ 300 µl tampon phosphate

+ 300 µl échantillon dilué dans le tampon

- mélange puis lecture de l'augmentation de la densité optique (DO) à 412 nm toutes les 6 secondes pendant 5 minutes.

### • Le glutathion réduit (GSH)

#### Réactifs utilisés :

- \* Tampon phosphate de potassium 50 mM, pH = 7,60 ± 0,02
- \* Solution tamponnée d'acide dithio bis nitrobenzoïque (DTNB) 1 mM (Sigma D 8130)

#### Protocole expérimental :

2,4 ml de tampon phosphate  
+ 300 µl d'échantillon dilué

- lire la densité optique à 412 nm (DO<sub>1</sub>)

+ 300 µl de DTNB

- laisser incuber 1 heure à 37°C, puis lire la densité optique à 412 nm (DO<sub>2</sub>)

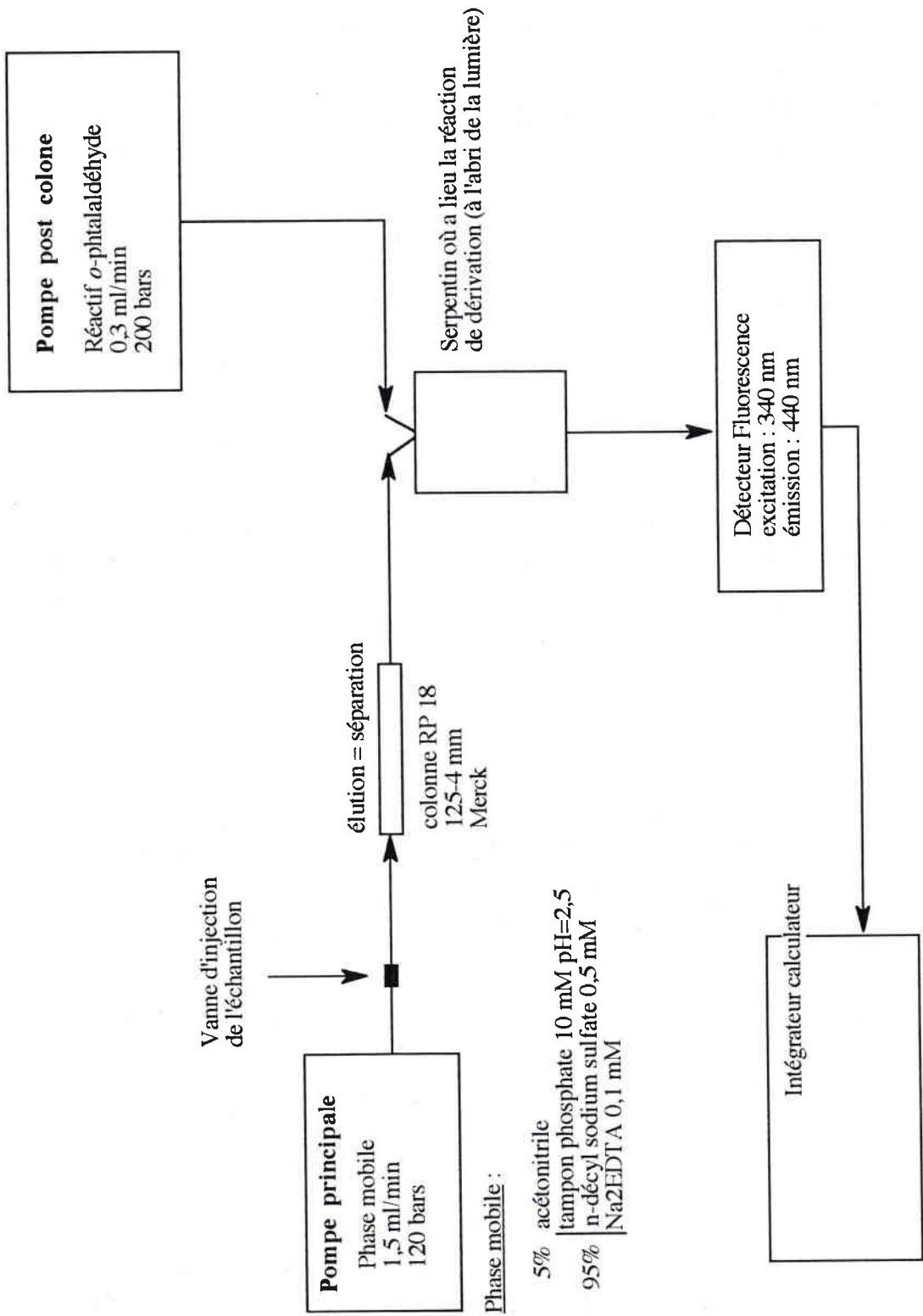


Figure 5 : Schéma du montage expérimental utilisé pour le dosage du glutathion par HPLC.

## b. La méthode HPLC

### Principe :

Le glutathion n'absorbant pas en ultra violet (UV) et n'étant pas fluorescent, il est nécessaire de procéder à une dérivation de la molécule pour pouvoir le détecter.

Cette étape consiste à faire réagir le glutathion avec un composé qui conduit à la formation d'un adduit détectable en UV ou par fluorescence.

Nous avons choisi de travailler avec l'*o*-phthalaldéhyde (OPA) en dérivation post-colonne afin d'augmenter la spécificité de la réaction entre le glutathion et le réactif (Leroy *et al.*, 1993). L'adduit formé est détecté par fluorescence (excitation : 340 nm ; émission : 440 nm) ce qui permet, comparativement à l'UV, d'obtenir une meilleure sensibilité de détection.

Le schéma du montage expérimental est représenté sur la figure 5.

L'OPA forme un adduit seulement avec le glutathion réduit. Donc pour doser le glutathion total, c'est à dire la somme du glutathion réduit (GSH) et du glutathion oxydé (GSSG), il faut nécessairement avoir tout le glutathion sous forme réduite. Pour cela il faut réduire le glutathion oxydé à l'aide d'un réducteur, qui est le dithiotréitol (DTT) dans notre cas. Cette réduction doit être réalisée avant la dérivation avec l'OPA.

Pour doser le glutathion oxydé seul, il faut d'abord bloquer le glutathion réduit avec de la *n*-éthyl maléimide (NEM) ; il y aura alors formation d'un complexe stable ne pouvant plus réagir avec l'OPA. Ainsi, seul le glutathion oxydé, réduit par le DTT, pourra réagir avec l'OPA.

### Réactifs utilisés :

\* phase mobile : 95% | tampon phosphate de sodium pH = 2,5  
 | n-décyl sodium sulfate 0,5 mM (Interchim 40622-0050)  
 | Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 mM  
 5% acétonitrile (Prolabo Chromanorm n° 20 060-296)

\* Solution d'*o*-phthalaldéhyde (OPA) : 5,3 g acide borique (MERCK) | solution 1  
 7,5 ml NaOH 30%  
 200 ml eau ultrapure

0,2 g OPA (Sigma P 0657) |  
 10 ml éthanol | solution 2  
 1 ml Brij 35 30% (Sigma 430 AG6) |

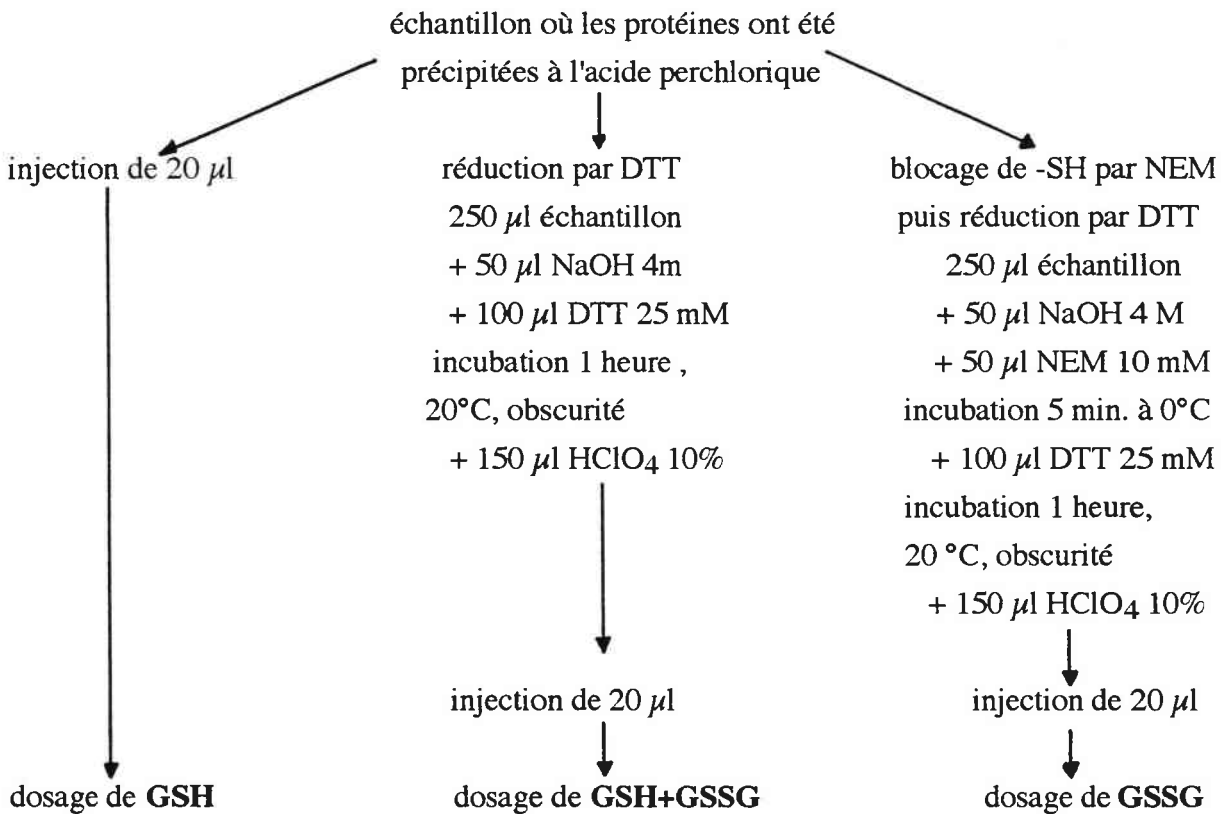
=> solution 1 + solution 2 + eau ultrapure, qsp 250 ml

- \* Solution aqueuse de dithiotréitol (DTT) 10 mM (Merck n° 12013)
- \* Solution aqueuse de soude (NaOH) 4M
- \* Solution aqueuse d'acide perchlorique (HClO<sub>4</sub>) 10% + Na<sub>2</sub>EDTA 2 mM
- \* Solution de N-éthyl maléimide (NEM) 10 mM (Sigma E 3876)
- \* Solution étalon de glutathion réduit (Sigma G 4251) dans HCl 0,1M + Na<sub>2</sub>EDTA 2mM
- \* Solution étalon de glutathion oxydé (Sigma G 9027) dans HCl 0,1M + Na<sub>2</sub>EDTA 2 mM

Toutes les solutions sont filtrées à 0,45  $\mu$ m avant d'être utilisées. La phase mobile et la solution d'*o*-phthalaldéhyde sont dégazées à l'hélium avant utilisation.

*Protocole expérimental :*

Les principales formes de glutathion contenues dans les échantillons sont, après précipitation des protéines, évaluées comme suit :



Le pic de glutathion est obtenu environ 6 minutes après injection.

### III.1.3.3. Les protéines totales.

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode décrite par Bradford (1976).

Le principe de cette méthode repose sur l'utilisation d'un colorant, le bleu de Coomassie qui, initialement rouge, devient bleu quand il se lie aux protéines. La couleur bleue résulte de l'interaction des groupements anioniques du colorant avec les groupements aminés des protéines. Le complexe formé est stable pendant environ une heure.

La densité optique (DO) lue à 595 nm est proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon biologique. Cette dernière est évaluée par rapport à une gamme étalon de sérum albumine bovine (SAB ; Merck n° 12018) réalisée simultanément.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg de protéines/100  $\mu$ l de fraction.

### III.1.4. Calculs des activités enzymatiques et des taux de glutathion.

#### III.1.4.1. Les activités enzymatiques.

La variation de densité optique enregistrée en une minute est convertie par rapport à une droite étalon :

\*  $(DO = f(\text{NADPH}))$  pour les glutathion peroxydases et réductase. La quantité de NADPH est rapportée au taux de protéines totales contenues dans l'échantillon ou au poids de tissu, les activités glutathion peroxydases et glutathion réductase sont donc exprimées en nmoles NADPH / min / mg protéines ou en nmoles NADPH / min / g tissu.

\*  $DO = f(\text{H}_2\text{O}_2)$  pour la catalase. La quantité d' $\text{H}_2\text{O}_2$  est rapportée au taux de protéines totales contenues dans l'échantillon ou au poids du tissu, l'activité catalasique est exprimée en  $\mu$ moles  $\text{H}_2\text{O}_2$  / min / mg protéines ou en  $\mu$ moles  $\text{H}_2\text{O}_2$  / min / g tissu.

#### III.1.4.2. Les taux de glutathion.

##### *a. La méthode enzymatique.*

Pour le **glutathion total (GSH+GSSG)**, la variation de densité optique enregistrée sur une minute est convertie en nmoles de GSH par rapport à une droite étalon. Cette quantité de glutathion est rapportée soit aux taux de protéines totales contenues dans l'échantillon, soit au poids du tissu. Le taux de glutathion total est donc exprimé en nmoles GSH / mg protéines ou en nmoles GSH / g tissu.

Le taux de **glutathion réduit (GSH)** est obtenu en faisant la différence entre les 2 densités optiques enregistrées ( $DO_2 - DO_1$  ; voir § 4.2.a) puis converti en nmoles de GSH par rapport à une droite étalon. La quantité de GSH est ensuite rapportée soit au taux de protéines totales contenues dans l'échantillon, soit au poids du tissu.

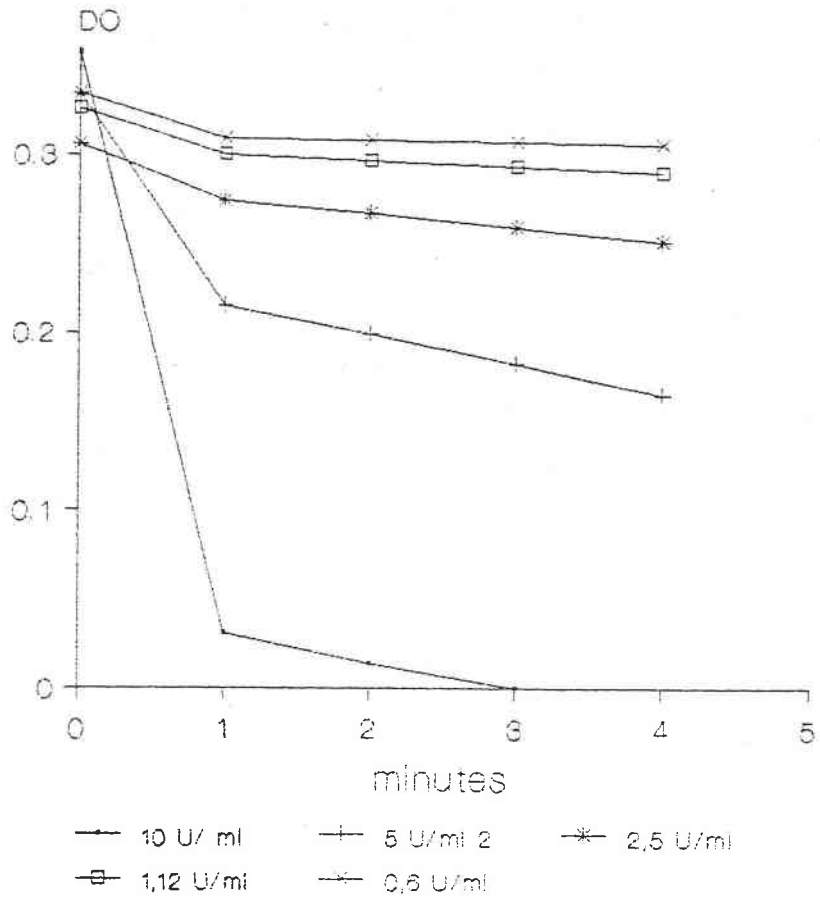
Le taux de glutathion réduit est donc exprimé en nmoles GSH / mg protéines ou en nmoles GSH / g tissu.

#### *b. La méthode HPLC.*

Les taux des différentes formes de glutathion (total, réduit et oxydé) sont évalués par rapport à des droites d'étalonnage obtenues à l'aide de solutions étalons : l'aire de chaque pic de glutathion est convertie en nmoles de GSH puis rapportée soit aux taux de protéines totales contenues dans l'échantillon, soit au poids du tissu.

Le taux de glutathion total et réduit est donc exprimé en nmoles GSH / mg protéines ou en nmoles GSH / g tissu. Celui du glutathion oxydé est exprimé en nmoles GSSG / mg protéines ou en nmoles GSSG / g tissu.

L'analyse statistique des résultats a été réalisée par analyse de variance (ANOVA) suivi d'un test de Dunnett. Pour l'analyse des résultats obtenus lors des essais d'intoxication (au laboratoire et sur le terrain), les groupes d'individus intoxiqués ont été comparés à leurs témoins respectifs.



**Figure 6** : Exemples de cinétiques de la **glutathion peroxydase totale** pour différentes concentrations d'enzyme commerciale.



## III.2. OPTIMISATION DES METHODES DE DOSAGE - CONSERVATION ET PROTOCOLE DE PREPARATION DES TISSUS.

### III.2.1. Optimisation des méthodes de dosage.

#### III.2.1.1. Activités enzymatiques.

##### III.2.1.1.1. Activités glutathion peroxydases.

Les activités enzymatiques ont été mesurées dans des conditions où les concentrations en substrats n'étaient pas limitantes : ces concentrations ont été définies après avoir déterminé les constantes cinétiques ( $K_m$ ) des enzymes pour chacun de leur substrat.

Après avoir sélectionné la concentration en glutathion peroxydase commerciale (GPx) de 5 U/ml pour laquelle la cinétique de la réaction pouvait être mesurée avec une bonne sensibilité, nous avons déterminé les constantes d'affinité ( $K_m$ ) des différents substrats de l'enzyme.

Dans ce but, nous avons à chaque fois fait varier la concentration d'un des substrats, celle des autres éléments étant maintenue constante.

Nous avons donc déterminé les différentes constantes d'affinité ( $K_m$ ) pour les différents substrats des glutathion peroxydases : le glutathion réduit (GSH), l'hydroperoxyde de cumène (CuOOH) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Les valeurs expérimentales obtenues sont les suivantes :

$$K_m (\text{GSH}) = 3 \text{ mM}$$

$$K_m (\text{CuOOH}) = 1,2 \text{ mM}$$

$$K_m (\text{H}_2\text{O}_2) = 0,3 \text{ mM}$$

Pour la suite des expérimentations nous avons utilisé des concentrations en substrat égales 5 à 10 fois la valeur du  $K_m$ . La variabilité sur des mesures réalisées en triplicat est de 5%. La limite de détection de l'activité est de 2 nmoles de NADPH réduit par minute à 25°C. Des exemples de cinétiques enzymatiques de la glutathion peroxydase totale sont donnés sur la figure 6.

*Pour évaluer l'activité des glutathion peroxydases, les concentrations en réactifs retenues sont les suivantes :*

$$\text{GSH} \quad 30 \text{ mM}$$

$$\text{NADPH} \quad 3,6 \text{ mM}$$

$$\text{GRd} \quad 30 \text{ U/ml}$$

$$\text{H}_2\text{O}_2 \quad 3 \text{ mM}$$

$$\text{CuOOH} \quad 6 \text{ mM}$$

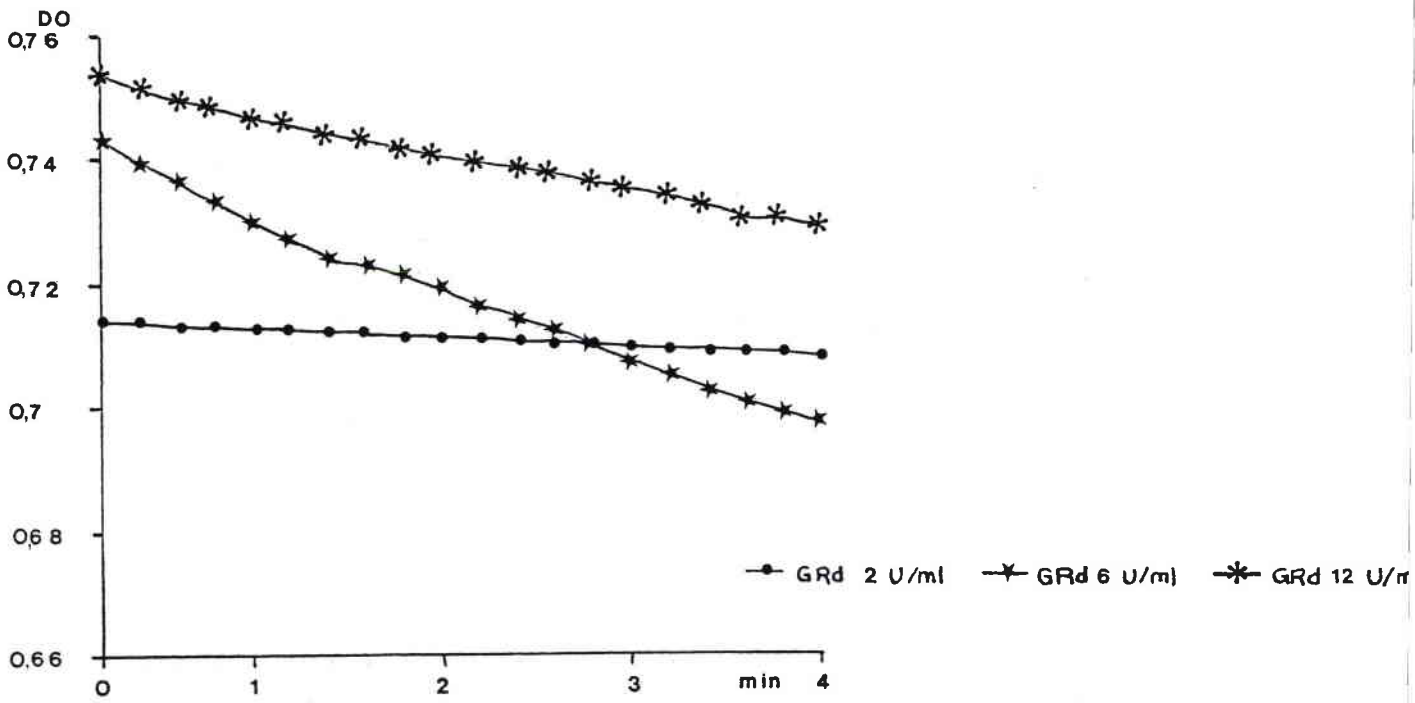


Figure 7 : Exemples de cinétiques de la **glutathion réductase** pour différentes concentrations d'enzyme commerciale.

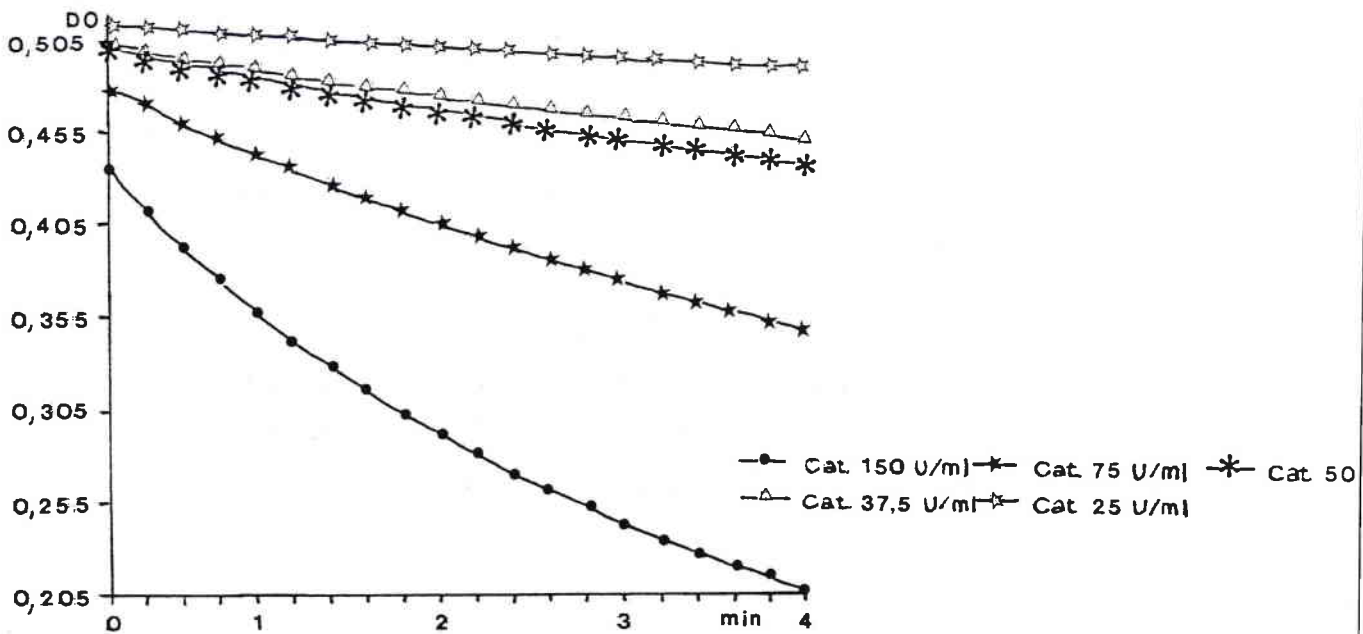


Figure 8 : Exemples de cinétiques de la **catalase** pour différentes concentrations d'enzyme commerciale.

### III.2.1.1.2. Activité glutathion réductase.

Après avoir déterminé une concentration en glutathion réductase commerciale (GRd) pour laquelle la cinétique de réaction pouvait être mesurée avec une bonne sensibilité (6 U/ml), nous avons fait varier successivement les concentrations en GSSG et en NADPH pour déterminer les constantes cinétiques ( $K_m$ ) de l'enzyme pour ses deux substrats.

La figure 7 montre un exemple de cinétique de la GRd.

Les constantes obtenues sont les suivantes :

$$K_m (\text{GSSG}) = 2 \text{ mM}$$

$$K_m (\text{NADPH}) = 0,2 \text{ mM}$$

*Comme précédemment, nous avons décidé de travailler avec des concentrations en substrats non limitantes, c'est à dire égales à 10 fois la valeur du  $K_m$ . La variabilité sur les mesures est de 5%. La limite de détection de l'activité est de 5 nmoles de NADPH réduit par minute à 25°C.*

*Les concentrations en GSSG et en NADPH retenues dans la suite des essais sont donc de 20mM et 2 mM respectivement.*

### III.2.1.1.3. Activité catalasique.

Pour déterminer les conditions optimales de mesure de l'activité catalasique, nous avons travaillé sur une solution de catalase commerciale et joué successivement sur les concentrations en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et en enzyme.

Après avoir choisi une concentration en enzyme commerciale nous donnant des cinétiques de dégradation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  exploitables (figure 8), nous avons testé différentes concentrations en  $\text{H}_2\text{O}_2$  afin de définir sa constante d'affinité.

*Ceci nous a permis d'évaluer le  $K_m (\text{H}_2\text{O}_2)$  à 3 mM.*

*La concentration en  $\text{H}_2\text{O}_2$  choisie pour la suite des essais est de 21 mM. La variabilité enregistrée sur des mesures en triplicat n'excède pas 12%. La limite de détection de l'activité de l'enzyme est de 7  $\mu$ moles d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dégradées par minute à 25°C.*

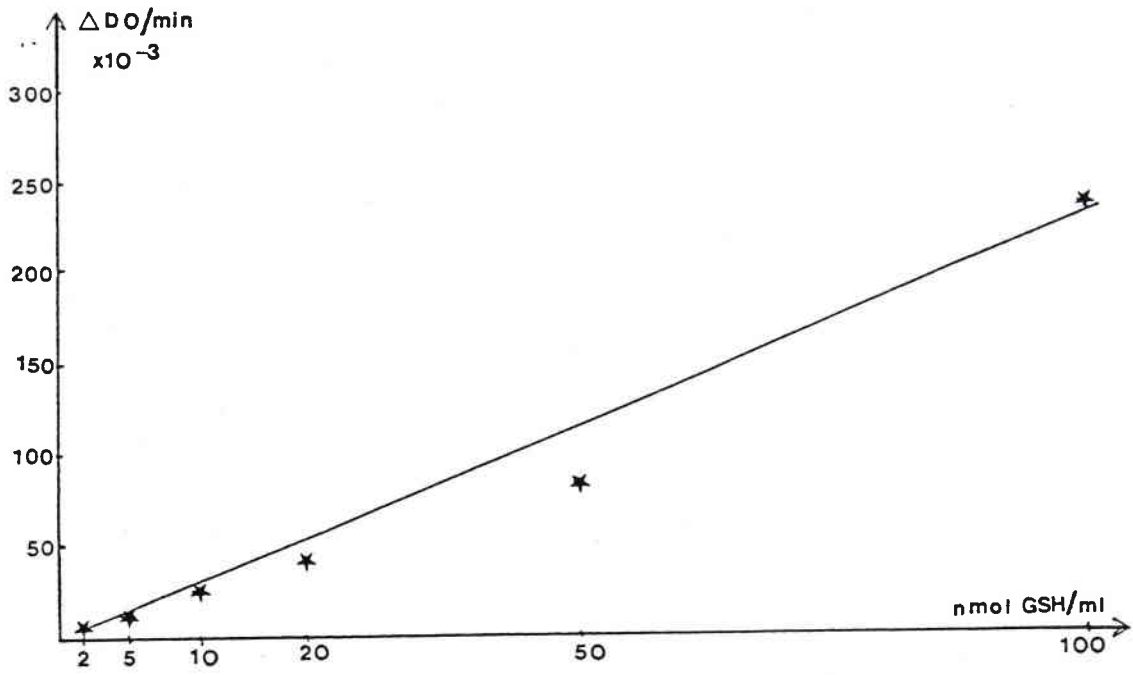


Figure 9 : Gamme étalon du **glutathion total** obtenue avec la méthode classique au DTNB.

Par la suite, nous avons travaillé sur des fractions tissulaires d'*Unio tumidus* et étudié les interférences éventuelles apportées par les constituants des fractions tissulaires.

- L'absence d'interférences des constituants des fractions 12000g (surnageant S12000 et culot C12000) a été contrôlée par ajout de fraction à une solution d'enzyme commerciale pour chacune des activités glutathion peroxydase, glutathion réductase et catalase.

- La coloration des fractions tissulaires et notamment de celle des fractions de glandes digestives de couleur brunâtre pouvait interférer sur la mesure de l'absorption du NADPH à 340 nm (suivie lors des mesures des activités glutathion peroxydases et glutathion réductase), ainsi que sur celle d' $H_2O_2$  à 240nm (suivie lors des mesures de l'activité catalasique). L'ajout de fraction S12000 et C12000 à différentes dilutions (1/2 à 1/100, soit 0,250 à 0,005mg de protéines /100 $\mu$ l de fraction S12000 et 1/2 à 1/50, soit 0,100 à 0,004 mg de protéines /100 $\mu$ l de fraction C12000) dans le milieu réactionnel n'entraîne aucune interférence pour les mesures d'activités glutathion peroxydases et glutathion réductase quelle que soit la fraction tissulaire 12000g testée. Par contre, il y avait des interférences sur les mesures d'activités catalasiques pour les fractions S12000 et C12000 obtenues à partir des glandes digestives et dont les dilutions étaient inférieures à 1/50 pour le surnageant et 1/10 pour le culot.

*A la suite de ces essais, nous avons préféré travailler avec des fractions subcellulaires dont le taux de dilutions étaient :*

- \* *supérieur ou égal à 1/50 pour la fraction cytosolique S12000 (soit 0,01 mg de protéines /100  $\mu$ l de fraction)*
- \* *supérieur ou égal à 1/10 pour la fraction des organites C12000 (soit 0,02 mg de protéines /100  $\mu$ l de fraction).*

### III.2.1.2. Le glutathion.

#### III.2.1.2.1. Mesures de glutathion par la méthode enzymatique classique.

Les taux de glutathion contenus dans les échantillons ont été évalués par rapport à une gamme étalon de glutathion.

##### *a. Glutathion total.*

Nous avons testé différentes concentrations d'une solution commerciale de glutathion réduit, choisies à partir de données bibliographiques permettant de situer la gamme des teneurs possibles en glutathion au niveau tissulaire entre 2 et 100  $\mu$ M.

La relation obtenue entre les valeurs d'absorption à 412 nm et les concentrations de solutions analysées est représentée sur la figure 9.

La limite de détection est de 2  $\mu$ M. La variabilité sur les mesures est de 15%.

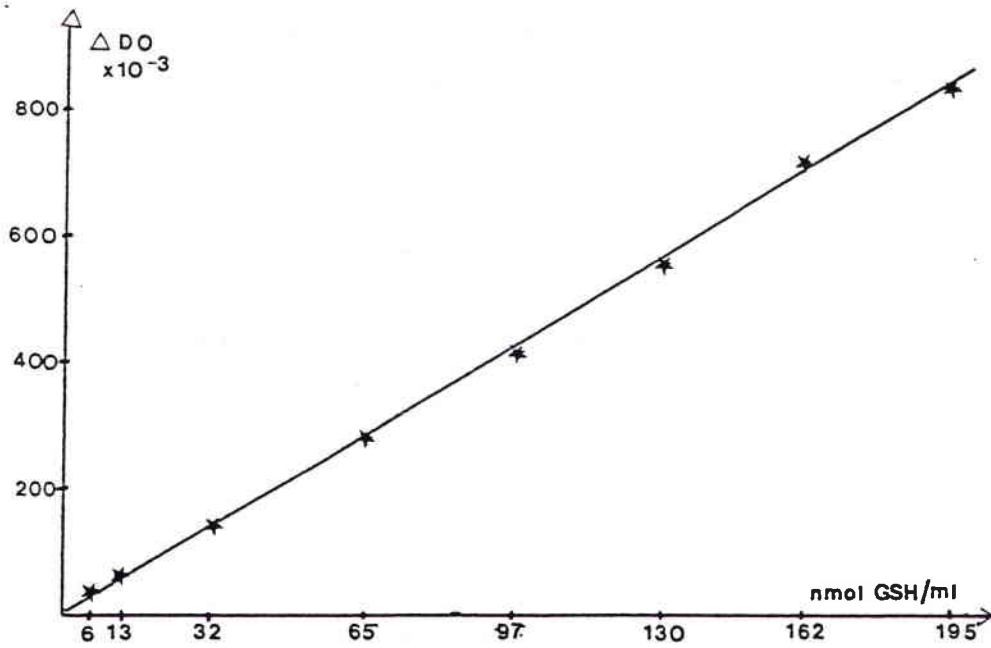


Figure 10 : Gamme étalon du **glutathion réduit** obtenue avec la méthode classique au DTNB.

### *b. Glutathion réduit.*

De même que pour le glutathion total, nous avons testé différentes concentrations en glutathion réduit entre 6 et 195  $\mu\text{M}$ , gamme de concentrations préconisées dans la méthode chimique pour l'établissement de la droite étalon.

La figure 10 représente la droite obtenue qui témoigne de la relation linéaire pour des concentrations comprises entre 6 et 195  $\mu\text{M}$ .

Le seuil de détection est de 6  $\mu\text{M}$ . La variabilité sur les mesures n'excède pas 10%.

### III.2.1.2.2. Mesures du glutathion par la méthode chromatographique (HPLC).

Les taux de glutathion oxydé et total contenus dans les échantillons sont évalués par rapport à des gammes étalons.

#### *a. Détermination du pourcentage d'acétonitrile de la phase mobile.*

Les auteurs préconisaient de travailler avec un pourcentage d'acétonitrile compris entre 5 et 10% dans la phase mobile à un débit de 1,5 ml/min afin d'obtenir le pic de glutathion entre 3 et 6 minutes après l'injection.

Après avoir testé différents pourcentages d'acétonitrile (5, 7, 10 et 15 %), nous avons décidé de travailler avec une **phase mobile contenant 5% d'acétonitrile**.

Ce pourcentage a été retenu car :

- \* il reste suffisamment faible pour ne pas entraîner de problèmes de précipitation du réactif d'appariement d'ions (sel de n-décyl sodium sulfate) qui est insoluble dans l'acétonitrile pur et a tendance à précipiter dans les têtes de pompe.

- \* il nous permet d'obtenir un pic bien symétrique aux alentours de 6 minutes,

#### *b. Etude des conditions expérimentales à l'aide des solutions étalons de glutathion réduit.*

La gamme de concentrations testées a été la suivante : 0,05-0,1-0,2-0,5-1-2  $\mu\text{g/ml}$ . Les dilutions ont été réalisées à partir d'une solution mère de GSH à 50 mg/ml. Le GSH est solubilisé dans une solution d'HCl 0,1M + Na<sub>2</sub>EDTA 2mM, les dilutions sont réalisées dans cette même solution. Il est impératif de travailler en milieu acide afin de mieux conserver le glutathion, facilement oxydable, sous sa forme réduite.

*Dans ces conditions, nous avons obtenu une relation linéaire entre les teneurs en glutathion et l'aire des pics du chromatogramme. La droite étalon obtenue en traçant l'aire des pics en fonction des concentrations de glutathion est représentée sur la figure 11. Un exemple de chromatogramme est représenté sur la figure 12. Le seuil de détection est de 65 nM. La variabilité sur une mesure réalisée en triplicat n'excède pas 7%.*

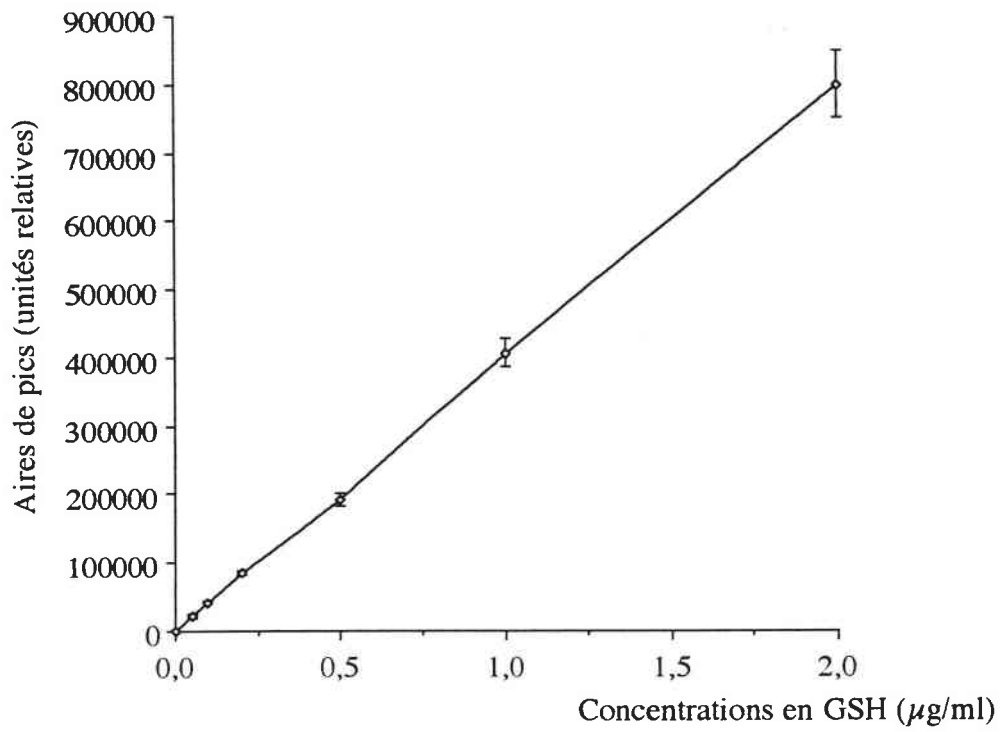


Figure 11 : Gamme étalon du **glutathion réduit** (GSH) obtenue avec la méthode HPLC.

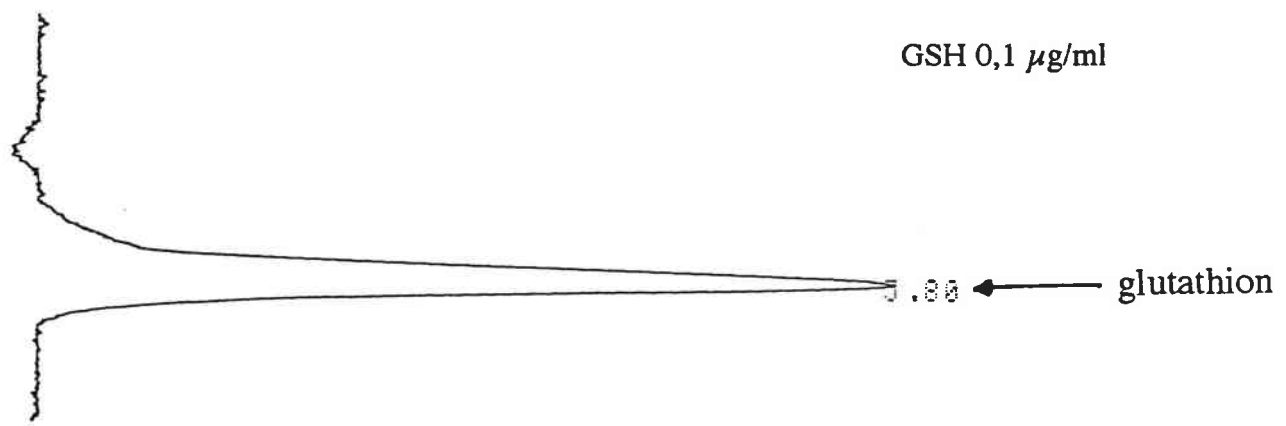


Figure 12 : Exemple de chromatogramme obtenu pour une concentration en glutathion réduit (GSH) de 0,1 µg/ml



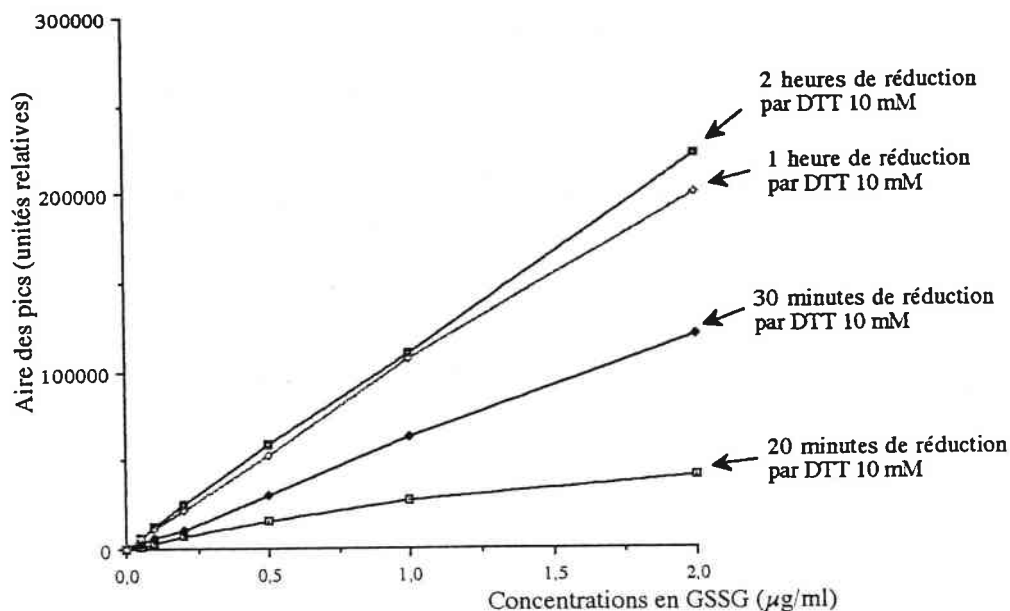


Figure 13 : Cinétique de réduction du glutathion oxydé (GSSG) par le DTT 10 mM.

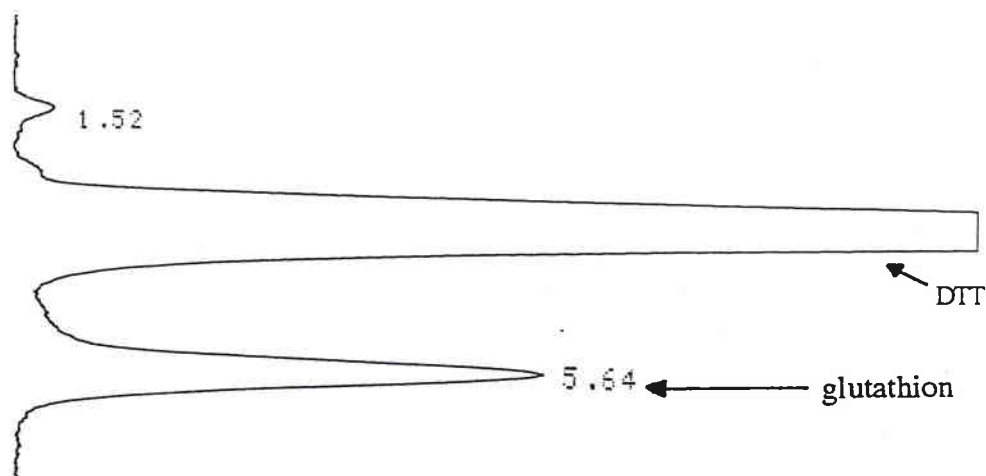


Figure 14 : Exemple de chromatogramme obtenu pour une concentration en GSSG de 0,5 µg/ml après 1 heure de réduction par le DTT 10mM.

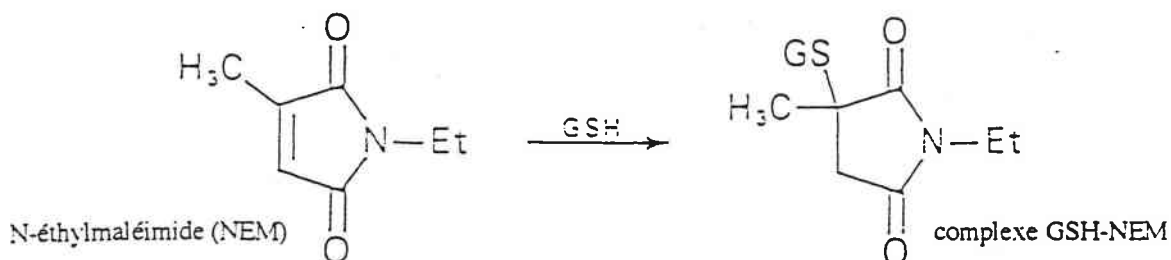


Figure 15 : Réaction entre le glutathion réduit et la N-éthylmaléimide.

*c. Etude des conditions expérimentales à l'aide des solutions étalons de glutathion oxydé.*

La gamme de concentrations testées a été la suivante : 0,05-0,1-0,2-0,5-1-2  $\mu\text{g/ml}$

Les dilutions ont été réalisées à partir d'une solution mère de GSSG à 50 mg/ml. Le GSSG est solubilisé dans une solution d'HCl 0,1M + Na<sub>2</sub>EDTA 2mM, les dilutions sont réalisées dans cette même solution.

Avant toute chose il fallait étudier la cinétique de réduction du GSSG par le DTT à 10mM et définir le temps optimal nécessaire pour obtenir la réduction totale du GSSG.

Les temps de réduction suivants ont été étudiés : 20, 30, 60 et 120 minutes. La gamme des concentrations définie ci-dessus a été testée pour chacun des temps de réduction.

Les droites obtenues sont représentées sur la figure 13. La figure 14 montre un exemple de chromatogramme pour le glutathion oxydé.

On peut constater qu'une heure de réduction à température ambiante suffit pour obtenir une relation linéaire entre l'aire des pics et les concentrations en GSSG (figure 13). Le seuil de détection est de 33 nM. La variabilité sur une mesure réalisée en triplicat est de 10%.

*d. Essais de complexation du glutathion réduit (GSH) par la N-éthylmaléimide (NEM).*

Nous avons cherché à évaluer directement le taux de glutathion oxydé (GSSG) contenu dans les échantillons biologiques plutôt que par différence entre les taux de glutathion total (GSH+GSSG) et de glutathion réduit (GSH). Pour ce faire, il était nécessaire de procéder à une étape de complexation du glutathion réduit par la N-éthylmaléimide (NEM). En effet, le complexe GSH-NEM formé ne peut pas réagir avec l'OPA ; ainsi seul le GSSG pourra être dosé après réduction par le DTT et réaction avec l'OPA.

Le schéma de la réaction entre le glutathion réduit et la NEM est donné sur la figure 15.

Dans un premier temps nous avons travaillé dans les conditions expérimentales décrites dans la littérature (Morrier-Tessier *et al.*, 1993) et qui consistent à faire réagir le GSH avec de la NEM à 2mM, à volume égal et à pH basique, pendant 5 minutes à 0°C (Redelged *et al.*, 1990).

Nous avons réalisé deux gammes de glutathion, une de GSH seul et une de GSH ayant réagi avec la NEM. Nous avons constaté qu'avec une solution de NEM à 2mM, le glutathion n'est pas totalement complexé. Des essais complémentaires nous ont permis de sélectionner une concentration en **NEM de 10 mM** pour laquelle le GSH était totalement complexé pour des concentrations comprises entre 0,05 et 5  $\mu\text{g/ml}$  et 98% du GSH étaient complexés à la concentration de 20  $\mu\text{g/ml}$ . Nous avons retenu ces conditions expérimentales puisque lors du dosage du glutathion dans les glandes digestives et les branchies de bivalves, nous travaillons avec des fractions cellulaires diluées dont les aires des pics n'excèdent pas celles obtenues avec des solutions étalons à la concentration de 1  $\mu\text{g/ml}$ .

Tableau 5 : Dosages du glutathion réduit (GSH), total (GSH+GSSG) et oxydé (GSSG) dans un mélange de solutions commerciales de GSH et de GSSG à des concentrations finales respectives de 1  $\mu\text{g/ml}$  et 0,1  $\mu\text{g/ml}$ .

	Aire du pic (unités relatives)
GSH 1 $\mu\text{g/ml}$	$28 \times 10^4$
DTT 10 mM	$23 \times 10^4$
GSSG 0,1 $\mu\text{g/ml}$ + DTT	$8 \times 10^3$
GSH + GSSG + DTT	$29 \times 10^4$
NEM 10 mM	$22 \times 10^4$
GSH 1 $\mu\text{g/ml}$ + NEM	$2 \times 10^3$
GSH + GSSG + NEM	$2 \times 10^3$
GSH +GSSG + NEM + DTT	$9 \times 10^3$

*e. Dosage d'un mélange de solutions étalons de glutathion réduit et oxydé.*

Comme les échantillons biologiques de glandes digestives et de branchies de bivalves contiennent le mélange des deux formes de glutathion, il nous fallait vérifier qu'il n'y avait pas d'interférences liées au protocole expérimental lors du dosage d'un mélange renfermant les deux formes du glutathion (réduit et oxydé).

Nous avons travaillé avec un mélange de solutions étalons qui comprenait 90% de glutathion réduit et 10% de glutathion oxydé, soit un mélange contenant 1  $\mu\text{g}$  de GSH/ml et 0,1  $\mu\text{g}$  de GSSG/ml.

Le protocole mis en œuvre est le suivant :

- \* dosage du GSH à 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  seul,
- \* dosage du GSSG à 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  seul, après réduction par le DTT 10mM pendant 1 heure,
- \* dosage du mélange après réduction par le DTT 10mM pendant 1 heure,
- \* dosage du mélange après réaction avec la NEM 10mM pendant 5 minutes à 0°C,
- \* dosage du mélange après réaction avec la NEM 10mM puis réduction par le DTT 10mM.

Les résultats, présentés dans le tableau 5, montrent que :

- le glutathion oxydé (GSSG) peut être dosé spécifiquement, même en présence de quantité 10 fois plus élevée de glutathion réduit dans l'échantillon si l'on en juge par l'aire des pics (unités relatives) de GSSG de :

$8 \times 10^3$  sans GSH

$9 \times 10^3$  avec GSH et NEM

- la NEM réagit spécifiquement avec GSH, la présence de GSSG ne modifie pas sa réactivité comme le montrent les aires des pics du complexe NEM-GSH identiques ( $2 \times 10^3$ ) avec et sans GSSG.
- le dosage de GSSG par différence des résultats du glutathion total diminués de ceux du glutathion réduit est possible. Cette méthode paraît cependant moins précise que la méthode directe passant par un blocage de GSH par le NEM.

*f. Conservation du glutathion réduit au cours du protocole de préparation des fractions.*

Afin de nous assurer de la validité du protocole expérimental, il était nécessaire de vérifier que le glutathion réduit ne s'oxydait pas au cours de la préparation des fractions tissulaires et donc que les taux de glutathion oxydé mesurés n'étaient pas surestimés.

En vue de cette vérification, nous avons divisé un homogénat en 2 fractions égales et ajouté un étalon de GSH à l'une d'elles avant de procéder au fractionnement et au dosage des fractions subcellulaires selon les techniques précédemment décrites.

Tableau 6 : Dosage des taux de glutathion réduit (GSH), total (GSH+GSSG) et oxydé (GSSG) sur un échantillon de glande digestive d'*Unio tumidus*, dopé ou non, avec une solution commerciale de GSH à 0,1  $\mu\text{g/ml}$  ajoutée lors de l'homogénéisation de l'échantillon tissulaire.

	Aire du pic détecté (unités relatives)
Etalon GSH 0,1 $\mu\text{g/ml}$	35171
Echantillon => <i>dosage de GSH</i>	15876
Echantillon + étalon GSH => <i>dosage de GSH</i>	49105
Echantillon => <i>dosage de GSH+GSSG</i>	37208
Echantillon + étalon GSH => <i>dosage de GSH+GSSG</i>	70063
Echantillon => <i>dosage de GSSG</i>	21025
Echantillon + étalon GSH => <i>dosage de GSSG</i>	21112

Les résultats, présentés dans le tableau 6 ci contre, montrent que le glutathion réduit contenu dans l'échantillon biologique n'est pas oxydé pendant la préparation des fractions subcellulaires. En effet, dans l'échantillon dopé avec l'étalon de GSH, 96% du GSH sont retrouvés lors du dosage de la forme réduite du glutathion. De plus, l'ajout de GSH dans l'échantillon ne gêne pas le dosage du glutathion oxydé (GSSG) puisque l'aire des pics est semblable, que l'échantillon contienne ou non l'étalon ; tout le GSH contenu dans l'échantillon est donc complexé par la NEM utilisée lors du protocole de dosage de la forme oxydée du glutathion ( voir matériel et méthodes, § 4.2.b).

*En conclusion de ces travaux sur la mise au point du dosage du glutathion par HPLC nous retiendrons que :*

- \* la phase mobile doit contenir 5% d'acétonitrile et être préparée extemporanément,*
- \* la réduction du glutathion oxydé se fait en présence de DTT 10mM pendant 1 heure*
- \* le glutathion réduit est totalement complexé après 5 minutes de réaction à 0°C avec de la NEM à 10 mM,*
- \* les solutions utilisées pour le dosage et plus particulièrement celles de NEM, DTT et OPA doivent être préparées extemporanément,*
- \* avant tout dosage, la colonne doit avoir été équilibrée avec la phase mobile pendant 12 heures.*

### III.2.1.2.3. Comparaison des deux méthodes de mesure des taux de glutathion.

Afin de s'assurer qu'il y avait une corrélation satisfaisante entre les deux méthodes de dosage du glutathion, nous avons réalisé les mesures sur fractions subcellulaires de glandes digestives et branchies pour la campagne d'échantillonnage d'octobre 1994. Le glutathion (total, réduit et oxydé) a été dosé en parallèle à l'aide des deux méthodes de dosage : la méthode au DTNB et la méthode HPLC.

Les taux moyens de glutathion total et réduit mesurés avec la méthode au DTNB étaient respectivement de  $528 \pm 89$  nmoles de glutathion/mg protéines et  $406 \pm 13$  nmoles de glutathion/mg protéines et ceux mesurés avec la méthode HPLC étaient respectivement de  $584 \pm 15$  nmoles de glutathion/mg protéines et  $446 \pm 14$  nmoles de glutathion/mg protéines. La corrélation entre les deux méthodes est satisfaisante (figure 16), le coefficient de corrélation étant en moyenne de 0,89.

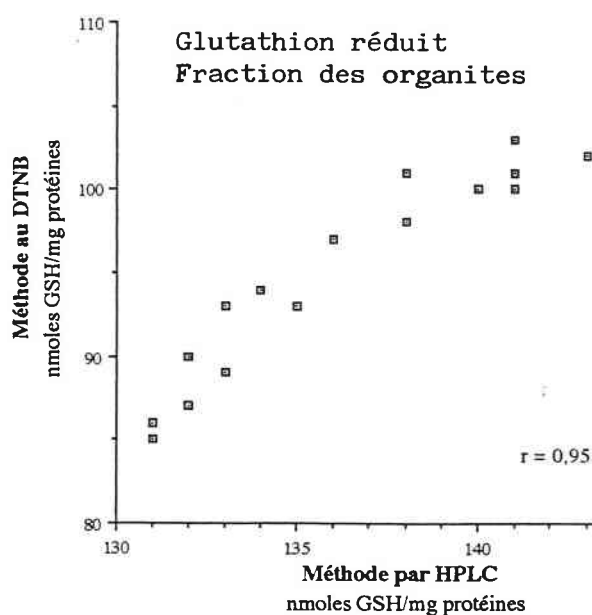
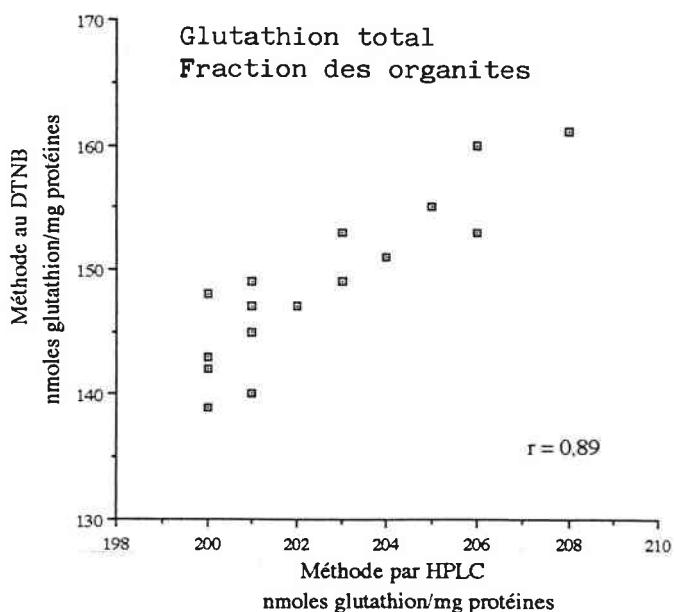
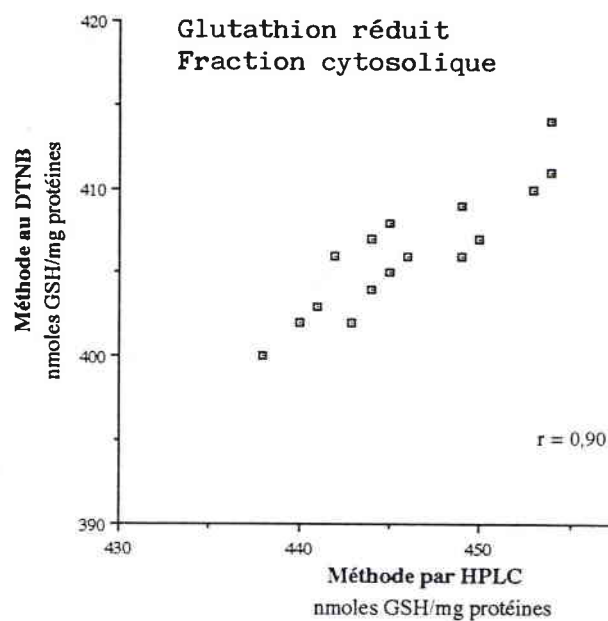
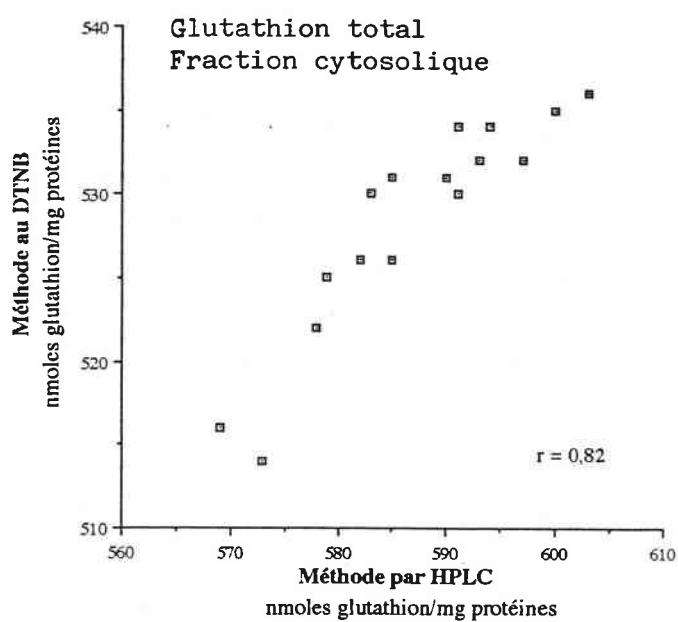
Dans la suite de l'étude, nous avons choisi de mesurer les taux de glutathion tissulaire avec la méthode HPLC seulement, car cette technique permet de doser séparément le glutathion réduit et le glutathion oxydé.

12000g des homogénats de glandes digestives d'*Unio tumidus* selon le sexe des moules, avant et après conservation des tissus pendant 1 mois dans l'azote liquide (-196°C). Les activités spécifiques des glutathion peroxydases (GPx) et de la glutathion réductase (GRd) sont exprimées en nmoles NADPH/min/mg protéines, les activités spécifiques de catalase sont exprimées en  $\mu$ moles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg protéines, les taux de glutathion sont exprimés en nmoles GSH/mg protéines.

	GPx totale	Se GPx	GPx Se ind. (par différence)	GRd	Catalase	GSH+GSSG	GSH	GSSG
moyenne des mâles (n = 5)	S 101 ± 15 * 94 ± 6 **	88 ± 16 79 ± 6	13 ± 4 16 ± 3	68 ± 6 76 ± 7	142 ± 31 115 ± 1	338 ± 101 345 ± 61	295 ± 60	50 ± 15
	C 97 ± 22 72 ± 6	85 ± 24 62 ± 5	12 ± 2 8 ± 3	16 ± 2 16 ± 2	613 ± 87 650 ± 98	129 78 ± 22	86 ± 13	25 ± 6
moyenne des femelles (n = 5)	S 82 ± 14 92 ± 6	70 ± 12 79 ± 7	12 ± 3 17 ± 2	67 ± 11 76 ± 4	143 ± 17 131 ± 37	345 ± 23 394 ± 27	331 ± 35	64 ± 21
	C 86 ± 16 77 ± 7	72 ± 14 68 ± 8	14 ± 3 9 ± 2	17 ± 5 15 ± 2	618 ± 66 612 ± 80	85 ± 9 115 ± 9	91 ± 5	25 ± 9
moyennes mâles + femelles	S 91 ± 17 93 ± 6	79 ± 17 79 ± 7	12 ± 4 17 ± 3	67 ± 9 76 ± 6	143 ± 25 122 ± 28	342 ± 74 365 ± 55	309 ± 54	56 ± 19
	C 91 ± 20 73 ± 7	79 ± 21 64 ± 7	13 ± 3 8 ± 3	16 ± 4 16 ± 7	616 ± 77 616 ± 101	81 ± 17 114 ± 11	88 ± 11	26 ± 8

\* Activités enzymatiques avant congélation

\*\*Activités enzymatiques après conservation pendant 1 mois à -196°C



**Figure 16** : Comparaison des taux de glutathion total et réduit mesurés à l'aide des deux méthodes de mesures, dans la fraction cytosolique et la fraction des organites de glandes digestives.



### **III.2.2. Conservation et préparation des tissus.**

#### **III.2.2.1. Conservation des tissus dans l'azote liquide.**

Lors d'une campagne d'échantillonnage, toutes les mesures enzymatiques ne sont pas réalisables au cours d'une seule journée. Il fallait donc trouver un mode de conservation des tissus qui n'altère pas les structures tissulaires et ne modifie les activités enzymatiques.

A la suite d'essais préliminaires, nous avons décidé de conserver les échantillons tissulaires, disséqués immédiatement après échantillonnage, dans l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Il s'agissait donc de vérifier que ce mode de conservation ne modifiait pas les mesures des différents paramètres étudiés.

Pour évaluer l'éventuelle influence de la congélation dans l'azote liquide, le protocole mis en œuvre a été le suivant : pour la moitié des individus (5 mâles et 5 femelles) les tissus ont été congelés immédiatement à  $-196^{\circ}\text{C}$  et conservés pendant 1 mois dans l'azote liquide. Pour les autres individus (5 mâles et 5 femelles) conservés au laboratoire, les analyses ont été réalisées dans les jours qui ont suivi, sur tissu frais immédiatement après dissection.

Les résultats, présentés dans le tableau 7 ci-contre, montrent que la conservation des tissus à  $-196^{\circ}\text{C}$  pendant 1 mois dans l'azote liquide n'altère pas les enzymes puisque les activités sont comparables avant et après 1 mois de conservation.

***En conclusion, nous pouvons retenir que la congélation des tissus à  $-196^{\circ}\text{C}$  dans l'azote liquide ne modifie ni les niveaux d'activités enzymatiques ni les taux de glutathion, ce qui nous permet d'utiliser ce mode de conservation des échantillons.***

**Tableau 8** : Activités spécifiques des glutathion peroxydases (GPx), de la glutathion réductase (GRd), de la catalase et taux de glutathion mesurés avant et après traitement de la fraction cytosolique (S12000) et de la fraction des organites (C12000) avec deux inhibiteurs de protéases : le PMSF et le mélange sérine-borate.

Echantillons de glandes digestives d'*Unio tumidus* prélevés en Octobre 1993.

Dosage des différentes activités enzymatiques à :

$t_0$ , juste après la centrifugation à 12000g

$t_0 + 6$  heures, les échantillons étant conservés à 4°C.

	S 12000			C 12000		
	sans traitement	traitement au PMSF	traitement sérine/borate	sans traitement	traitement au PMSF	traitement sérine/borate
GPx tot.	78 78	77 79	70 72	65 56	62 69	73 76
Se GPx	63 60	61 61	59 59	56 48	54 59	57 57
GPx Se ind.	15 18	16 18	11 13	9 7	8 9	15 19
GRd	49 46	49 43	63 60	51 47	47 43	60 62
Catalase	173 133	165 135	164 105	623 291	596 530	609 602
GSH + GSSG	338 231	367 305	391 386	273 117	207 187	290 262
GSH	233 193	234 205	204 206	191 94	124 115	191 179
GSSG	105 38	133 100	187 180	82 23	83 72	99 83

Les activités enzymatiques spécifiques sont exprimées en :

- \* nmoles NADPH/min/mg protéines pour les glutathion peroxydases et réductase
- \*  $\mu$ moles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg protéines pour la catalase
- \* nmoles GSH/mg protéines pour le glutathion

### III.2.2.2. Choix d'inhibiteurs de protéases.

Ayant noté une diminution des activités enzymatiques lors de certaines mesures réalisées à quelques heures d'intervalle, nous avons été incités à travailler dans des conditions permettant de limiter l'action des protéases contenues dans les fractions subcellulaires.

Nous avons choisi d'utiliser des inhibiteurs de protéases qui préservent les activités enzymatiques étudiées et n'interfèrent pas avec les méthodes mises en œuvre. Pour faire ce choix, nous avons étudié les effets de différents inhibiteurs de protéases connus et couramment utilisés.

- Au cours d'une première série d'essais, nous avons comparé 3 inhibiteurs de protéases :
  - \* **le benzamide**, inhibiteur des sérines protéases, utilisé à la concentration finale de 1 mM dans le tampon d'homogénéisation,
  - \* **le pCMB** (acide *p*-chloromercuribenzoïque), inhibiteur des cystéines protéases, utilisé à la concentration finale de 1 mM dans le tampon d'homogénéisation,
  - \* **la leupeptine**, dont le rôle est identique à celui du pCMB, mais qui est utilisée à la concentration finale de 1 µg/ml dans le tampon d'homogénéisation.

L'action de ces différents produits sur les enzymes étudiées a été évaluée par comparaison des échantillons non traités dosés au temps zéro avec ceux traités et conservés pendant 24 heures à 4°C, les échantillons non traités ayant été conservés dans les mêmes conditions.

*Ces premiers essais nous ont montré que seul le benzamide convenait car il permettait le maintien des activités enzymatiques après conservation des échantillons pendant 24 heures à 4°C et était compatible avec toutes les enzymes. Le pCMB et la leupeptine ne convenaient pas.*

- Dans un deuxième temps, nous avons testé deux autres inhibiteurs classiquement utilisés :
  - \* **le PMSF** (phénylméthylsulfonylfluorure) qui, comme le benzamide, inhibe les sérines protéases et qui est utilisé à la concentration finale de 1mM dans le tampon d'homogénéisation,
  - \* **le mélange L-sérine-borate** qui inhibe spécifiquement la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, utilisé à la concentration finale de 1mM dans le tampon d'homogénéisation. Cet enzyme hydrolyse le glutathion réduit ; son action peut donc entraîner un biais lors de l'évaluation du taux de glutathion contenu dans les échantillons.

Les effets de ces deux composés ont été comparés avant et après conservation des fractions à 4°C pendant 6 heures.

Les résultats de ces essais sont présentés dans le tableau 8 ci-contre.

Ces résultats montrent que :

- \* les taux de glutathion total et réduit sont diminués d'1/3 dans la fraction cytosolique (S12000) et de moitié dans la fraction mitochondriale (C12000) pour les échantillons non traités conservés à 4°C pendant 6 heures,

- \* le taux de glutathion total est plus important, au temps zéro, dans les deux fractions traitées par le mélange sérine-borate. Ce dernier permet également le maintien des différents taux de glutathion après conservation des échantillons à 4°C pendant 6 heures ,

- \* l'activité catalasique est diminuée d'environ 60% dans le culot 12000 conservé sans traitement à 4°C, alors que l'ajout de PMSF ou du mélange sérine-borate dans la fraction permet de retrouver une activité quasiment totale après 6 heures de conservation à 4°C,

- \* pour les autres paramètres étudiés, les traitements avec le PMSF et le mélange sérine-borate n'interfèrent pas avec les mesures d'activités et permettent le maintien des activités spécifiques.

*A la suite de ces différents essais, nous avons choisi de travailler en présence de PMSF et du mélange sérine-borate ajoutés ensemble dans le tampon d'homogénéisation, aux concentrations citées précédemment. Nous avons préféré le PMSF au benzamide car il permet de mieux préserver les activités enzymatiques dans la fraction des organites.*

## **IV. RESULTATS**

- 1. Activités enzymatiques et taux de glutathion dans les glandes digestives et les branchies d'*Unio tumidus* : influence des saisons, de la période de reproduction et du sexe des individus.**
- 2. Etudes de terrain : mises en cages des bivalves et transfert en amont et en aval d'une source de pollution connue.**
- 3. Intoxication des bivalves au laboratoire : évaluation de la sensibilité des paramètres face à un stress chimique.**

## 1ère partie

---

---

### **Activités enzymatiques et taux de glutathion dans les glandes digestives et les branchies d'*Unio tumidus*. Influence des saisons (printemps et automne), de la période de reproduction (présence ou absence de larves chez les femelles) et du sexe des individus (mâles et femelles).**

---

---

Les données de la littérature montrent que chez les bivalves marins tels que *Mytilus edulis*, les activités enzymatiques antioxydantes peuvent varier selon la saison au cours de laquelle sont effectués les prélèvements (Viarengo *et al.*, 1991). Ceci nous a conduit à étudier l'influence des conditions climatiques sur les activités enzymatiques et les taux de glutathion chez *Unio tumidus*.

Nous avons donc effectué différentes campagnes d'échantillonnage au cours de l'année, au printemps (mai-juin) et à l'automne (octobre), afin d'évaluer l'impact des saisons sur les différents paramètres antioxydants étudiés.

Les résultats obtenus chez les témoins pour les campagnes d'échantillonnage d'octobre 1993, d'octobre et mai 1994 sont présentés dans les tableaux 9, 10 et 11. Les valeurs obtenues sont données pour les glandes digestives et les branchies en distinguant les activités mesurées dans le surnageant 12000g (S) et dans le culot 12000g (C) chez les femelles (F) et les mâles (M). Pour les organismes femelles prélevés en automne, nous avons différencié les femelles contenant des larves (F+) de celles qui n'en contenaient pas (F-).

Ces valeurs sont les moyennes des valeurs individuelles, elles mêmes la moyenne de mesures effectuées en triplicat sur 3 aliquots d'une même fraction, ce qui permet d'apprécier la variabilité liée à l'ensemble du protocole expérimental. Les valeurs individuelles sont données en annexe dans les tableaux T1 à T6.

Les dosages en triplicat ont été réalisés à partir de la campagne d'octobre 1993, période à partir de laquelle les protocoles d'analyses étaient optimisés et intégraient l'utilisation d'inhibiteurs de protéases lors de l'homogénéisation des tissus. Le glutathion a été dosé par HPLC à partir de la campagne d'octobre 1994.

**Tableau 9** : Tableau récapitulatif des différentes activités enzymatiques mesurées au cours des campagnes d'échantillonnage d'octobre 1993 et 1994 dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites (C) obtenues après centrifugation à 12000g des homogénats de glandes digestives (GD) et de branchies (Br) d'*Unio tumidus*.

Les activités des glutathion peroxydases et réductase sont exprimées en nmoles NADPH/min/mg protéines, les activités catalasiques sont exprimées en  $\mu$ moles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg protéines.

Campagne	Sexe	n	=	GPx totale		Se GPx		GPx Se ind.		GRd		Catalase	
				GD	Br	GD	Br	GD	Br	GD	Br	GD	Br
Octobre 93	F -	4	S	99 ± 15	62 ± 4 *	72 ± 14	48 ± 7 *	27 ± 3	16 ± 2	45 ± 4	51 ± 3	126 ± 18	29 ± 5 *
			C	63 ± 6	26 ± 2 *	48 ± 5	23 ± 2 *	15 ± 2	3 ± 1	36 ± 2	10 ± 2	689 ± 41	121 ± 30 *
	F +	5	S	99 ± 13	59 ± 5 *	70 ± 9	53 ± 5 *	29 ± 5	5 ± 1	48 ± 3	50 ± 7	132 ± 3	22 ± 4 *
			C	69 ± 10	32 ± 3 *	54 ± 12	23 ± 4 *	15 ± 2	8 ± 1	34 ± 5	13 ± 3	711 ± 88	109 ± 36 *
	M	5	S	96 ± 16	63 ± 7 *	65 ± 12	60 ± 6	31 ± 5	3 ± 1	44 ± 2	46 ± 4	127 ± 17	30 ± 6 *
			C	62 ± 12	35 ± 3 *	45 ± 15	29 ± 2 *	17 ± 2	6 ± 1	33 ± 2	10 ± 1	688 ± 98	133 ± 33 *
Octobre 94	F +	7	S	99 ± 3		64 ± 4		26 ± 3		52 ± 4		168 ± 17	
			C	77 ± 5		63 ± 5		14 ± 3		42 ± 4		649 ± 27	
	M	9	S	91 ± 5		65 ± 4		26 ± 5		49 ± 3		175 ± 18	
			C	76 ± 3		61 ± 4		15 ± 3		41 ± 2		693 ± 22	

\* significativement plus faible au seuil 5%

#### **IV.1.1. Répartition intracellulaire des activités antioxydantes.**

L'examen de la répartition intracellulaire a montré que :

- \* 85% de l'activité catalasique totale sont retrouvés dans la fraction des organites intracellulaires, ce qui est en accord avec la localisation majoritairement peroxysomale de l'enzyme,

- \* l'activité glutathion peroxydase totale est importante dans les deux compartiments, cytosol et organites, avec une supériorité cependant pour la phase soluble cytosolique.

L'activité glutathion peroxydase sélénium-dépendante représente 75% de l'activité glutathion peroxydase totale et se répartit pour 60% dans la fraction cytosolique et pour 40% dans la fraction des organites.

L'activité glutathion peroxydase sélénium-indépendante est nettement plus faible (25% de l'activité totale), cette activité se trouve préférentiellement dans le compartiment cytoplasmique,

- \* l'activité glutathion réductase est importante dans les deux compartiments étudiés des glandes digestives. Au niveau branchial, cette activité est également importante dans le cytosol, mais plus faible dans la fraction des organites,

- \* le taux de glutathion total est globalement 3 fois plus élevé dans le cytosol comparativement à la fraction des organites ; plus de 80% du glutathion total se trouve sous forme réduite (tableau 11).

#### **IV.1.2 . Influence de l'état physiologique des individus : sexe et période de reproduction.**

Les campagnes d'octobre 1993 et 1994 ont montré qu'il n'y avait pas de différences significatives entre les niveaux des systèmes antioxydants mesurés chez les individus mâles et femelles, que les mesures aient été réalisées sur glandes digestives ou sur branchies (tableau 9).

L'état physiologique des femelles, c'est à dire la présence ou l'absence de larves chez les individus femelles prélevées en octobre n'a pas d'influence sur les activités antioxydantes qu'il s'agisse des glutathion peroxydases, de la glutathion réductase ou de la catalase.

Les valeurs trouvées chez les individus femelles, avec ou sans larves, ne sont pas significativement différentes de celles mesurées chez les mâles. Les activités glutathion peroxydase sélénium-dépendante mesurées en octobre 1993 dans la fraction cytosolique de glandes digestives sont de  $71 \pm 11$  nmoles NADPH/min/mg protéines chez les femelles et de  $65 \pm 12$  nmoles NADPH/min/mg protéines chez les mâles.

En octobre 1994, la comparaison entre les individus mâles et femelles montre que le sexe des individus n'induit pas non plus de différences significatives des activités antioxydantes.



**Tableau 10** : Tableau récapitulatif des différentes activités enzymatiques mesurées au cours des campagnes d'échantillonnage de mai et octobre 1994 dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites (C) obtenues après centrifugation à 12000g des homogénats de glandes digestives (GD) et de branchies (Br) d'*Unio tumidus*.  
Les activités des glutathion peroxydases et réductase sont exprimées en nmoles NADPH/min/mg protéines, les activités catalasiques sont exprimées en  $\mu$ moles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg protéines.

Campagne	Sexe	n	=	GPx totale		Se GPx		GPx Se ind.		GRd		Catalase	
				GD	Br	GD	Br	GD	Br	GD	Br	GD	Br
Mai 94	F	5	S	101 ± 3	63 ± 4 *	74 ± 3	57 ± 4 *	27 ± 3	6 ± 2 *	36 ± 3	44 ± 2 *	191 ± 33	16 ± 4 *
			C	98 ± 6	41 ± 5 *	73 ± 2	36 ± 8 *	25 ± 6	5 ± 2 *	34 ± 3	16 ± 2 *	693 ± 71	49 ± 4 *
	M	5	S	94 ± 5	64 ± 3 *	74 ± 5	57 ± 3 *	21 ± 2	7 ± 1 *	36 ± 2	46 ± 1 *	174 ± 36	16 ± 3 *
			C	80 ± 5	44 ± 3 *	65 ± 3	38 ± 2 *	15 ± 3	6 ± 1 *	33 ± 2	18 ± 2 *	627 ± 114	48 ± 4 *
Octobre 94	F +	7	S	99 ± 3		64 ± 4		26 ± 3		52 ± 4		168 ± 17	
			C	77 ± 5		63 ± 5		14 ± 3		42 ± 4		649 ± 27	
	M	9	S	91 ± 5		65 ± 4		26 ± 5		49 ± 3		175 ± 18	
			C	76 ± 3		61 ± 4		15 ± 3		41 ± 2		693 ± 22	

\* significativement plus faible au seuil 5%

L'activité glutathion réductase mesurée dans la fraction cytosolique de glandes digestives est respectivement de  $52 \pm 4$  nmoles NADPH/min/mg protéines chez les femelles avec larves et de  $49 \pm 3$  nmoles NADPH/min/mg protéines chez les mâles ; dans la fraction des organites, elle est de  $42 \pm 4$  nmoles NADPH/min/mg protéines chez les femelles et de  $41 \pm 2$  nmoles NADPH/min/mg protéines chez les mâles. Au cours de cette campagne, nous n'avons pu comparer que les mâles et les femelles avec larves, puisque nous n'avons pas trouvé de femelles sans larves parmi les bivalves que nous avons prélevés.

Pour la campagne précédente, il n'a pas été noté de différences significatives entre les taux de glutathion total et réduit mesurés dans les glandes digestives chez les individus mâles et les individus femelles.

#### **IV.1.3. Influence de la saison : printemps (mai - juin) et automne (octobre).**

Si les activités antioxydantes sont stables en octobre d'une année sur l'autre, certains paramètres sont par contre significativement différents au printemps. En particulier l'activité glutathion réductase dans les glandes digestives et l'activité catalase au niveau branchial (tableau 10).

Si l'on compare les niveaux mesurés au cours des campagnes d'octobre et de mai 1994, l'activité glutathion réductase cytosolique mesurée dans les glandes digestives des mâles et femelles confondus est de  $50 \pm 4$  nmoles NADPH/min/mg protéines en octobre et de  $36 \pm 3$  nmoles NADPH/min/mg protéines en mai . Dans la fraction des organites elle est de  $42 \pm 2$  nmoles NADPH/min/mg protéines en octobre contre  $33 \pm 3$  nmoles NADPH/min/mg protéines en mai .

Au niveau branchial, l'activité catalasique mesurée dans la fraction des organites est significativement plus faible au printemps :  $48 \pm 4$   $\mu$ moles  $H_2O_2$ /min/mg protéines en mai 1994 contre  $121 \pm 30$   $\mu$ moles  $H_2O_2$ /min/mg protéines en octobre 1993.

Au printemps, les taux de glutathion sont plus faibles dans les glandes digestives par rapport aux taux mesurés en automne dans ces tissus ; par contre les taux branchiaux sont plus importants au printemps qu'en automne. Le taux de glutathion réduit mesuré chez les mâles et les femelles confondus dans la fraction cytosolique des glandes digestives est de  $332 \pm 36$  nmoles GSH/mg protéines en mai 1994 et de  $406 \pm 13$  nmoles GSH/mg protéines en octobre 1994.

#### **IV.1.4. Influence du tissu étudié : glandes digestives ou branchies.**

Les activités enzymatiques antioxydantes ont des niveaux globalement plus faibles dans les branchies que dans les glandes digestives. Plus particulièrement, les activités catalase et glutathion peroxydase sélénium-indépendante sont bien plus faibles dans les branchies comparativement aux taux trouvés dans les glandes digestives.

L'activité catalasique moyenne mesurée dans la fraction des organites est de  $696 \pm 70$   $\mu$ moles  $H_2O_2$ /min/mg protéines dans les glandes digestives et de  $121 \pm 30$   $\mu$ moles  $H_2O_2$ /min/mg protéines dans les branchies, en octobre 1993. En mai 1994, l'activité glutathion peroxydase sélénium-indépendante moyenne mesurée dans la fraction cytosolique est de  $24 \pm 3$  nmoles NADPH/min/mg protéines dans les glandes digestives et de  $7 \pm 2$  nmoles NADPH/min/mg protéines dans les branchies ; dans la fraction des organites, l'activité est de  $20 \pm 7$  et de  $5 \pm 2$  nmoles NADPH/min/mg protéines dans les glandes digestives et les branchies respectivement.

***En conclusion, nous pouvons retenir que :***

*\* il n'y a pas de différences significatives entre les activités antioxydantes mesurées chez les individus mâles et femelles, quels que soient la saison ou le tissu étudiés,*

*\* en automne, la présence de larves chez les femelles n'a pas d'influence sur les niveaux d'activité des systèmes antioxydants, qui sont du même ordre de grandeur chez les femelles avec larves ou sans larves,*

*\* les activités antioxydantes sont plus variables au printemps qu'en automne, surtout pour l'activité glutathion réductase dans les glandes digestives et pour l'activité catalase branchiale,*

*\* les niveaux des systèmes antioxydants sont globalement plus faibles dans les branchies que dans les glandes digestives, notamment pour les activités catalase et glutathion peroxydase sélénium-indépendante. Les taux de glutathion sont plus faibles dans les branchies uniquement au printemps.*

**Tableau 11** : Tableau récapitulatif des différents taux de glutathion mesurés par la méthode au DTNB au cours des différentes campagnes d'échantillonnage dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites (C) obtenues après centrifugation à 12000g des homogénats de glandes digestives (GD) et de branchies (Br) d'*Unio tumidus*.

Les taux de glutathion sont exprimés en nmoles glutathion/mg protéines.

Campagne	Sexe	n	=	GSH + GSSG		GSH		GSSG	
				GD	Br	GD	Br	GD	Br
Octobre 93	F-	4	S	532 ± 73	542 ± 84	447 ± 65	305 ± 59 *	111 ± 29	236 ± 27
			C	153 ± 29	170 ± 27	130 ± 28	80 ± 18 *	32 ± 8	90 ± 10
	F+	5	S	607 ± 17	596 ± 70	446 ± 16	364 ± 55 *	161 ± 2	232 ± 17
			C	204 ± 45	163 ± 15	187 ± 49	73 ± 16 *	29 ± 5	89 ± 6
	M	5	S	529 ± 46	539 ± 60	421 ± 46	330 ± 55 *	108 ± 3	208 ± 8
			C	213 ± 75	215 ± 33	179 ± 27	133 ± 13 *	34 ± 2	82 ± 10
Mai 94	F	5	S	374 ± 36	727 ± 53 ◇	338 ± 34 *	585 ± 34 ◇	42 ± 4 *	142 ± 30 *
			C	192 ± 33	190 ± 60	173 ± 22	108 ± 11	19 ± 2 *	82 ± 14
	M	5	S	367 ± 36	746 ± 35 ◇	327 ± 35 *	611 ± 21 ◇	40 ± 3 *	135 ± 22 *
			C	155 ± 14	182 ± 20	136 ± 16	105 ± 13	19 ± 2 *	77 ± 10
Octobre 94	F+	7	S	531 ± 19		406 ± 13		124 ± 13	
			C	150 ± 16		93 ± 15		57 ± 8	
	M	9	S	527 ± 19		407 ± 13		120 ± 13	
			C	149 ± 14		90 ± 14		59 ± 6	

\* significativement plus faible au seuil 5%

◇ significativement plus fort au seuil 5%

## 2ème partie

---



---

### **Études de terrain : mise en cages des bivalves et transfert en amont et en aval d'une source de pollution connue.**

---



---

#### **IV.2.1. Mise en cage et transfert d'un site témoin vers un autre site témoin.**

Le but de cette étude était de voir si la mise en cages des bivalves d'une part et leur transfert dans un autre site équivalent d'autre part, induisaient un stress des organismes susceptible de modifier les activités enzymatiques et les taux de glutathion.

Cette étude a été réalisée au cours du mois d'octobre 1994. Nous avons comparé 3 groupes d'individus comprenant 16 bivalves chacun :

- les témoins libres *in situ*, c'est à dire les individus du site d'échantillonnage qui n'ont pas été mis en cages,
- les témoins mis en cages et laissés sur le site d'échantillonnage (ou "témoins *in situ*") à raison de 4 cages contenant chacune 4 bivalves,
- les témoins mis en cages mais transférés dans un autre site témoin de qualité apparemment équivalente, à raison de 4 cages transférées avec 4 organismes dans chaque cage.

Les analyses des micropolluants des sédiments et de l'eau interstitielle des deux sites (témoin et site transfert) ont été réalisées par un laboratoire spécialisé. Les résultats ne mettent pas en évidence de différence majeure entre les deux sites dont la qualité paraît équivalente (annexe).

Les cages ont été laissées en place pendant 2 semaines. Après ce laps de temps, nous avons récupéré les témoins et les individus mis en cages dans les deux sites. Chaque bivalve a été disséqué dès le prélèvement et les tissus ont été congelés à -196°C immédiatement.

Les mesures des activités enzymatiques et des taux de glutathion ont été réalisées uniquement sur les glandes digestives.

Les résultats obtenus pour chacun des paramètres étudiés sont présentés sur les graphes des figures 16 et 17. Les valeurs brutes sont données dans le tableaux T4 en annexe.

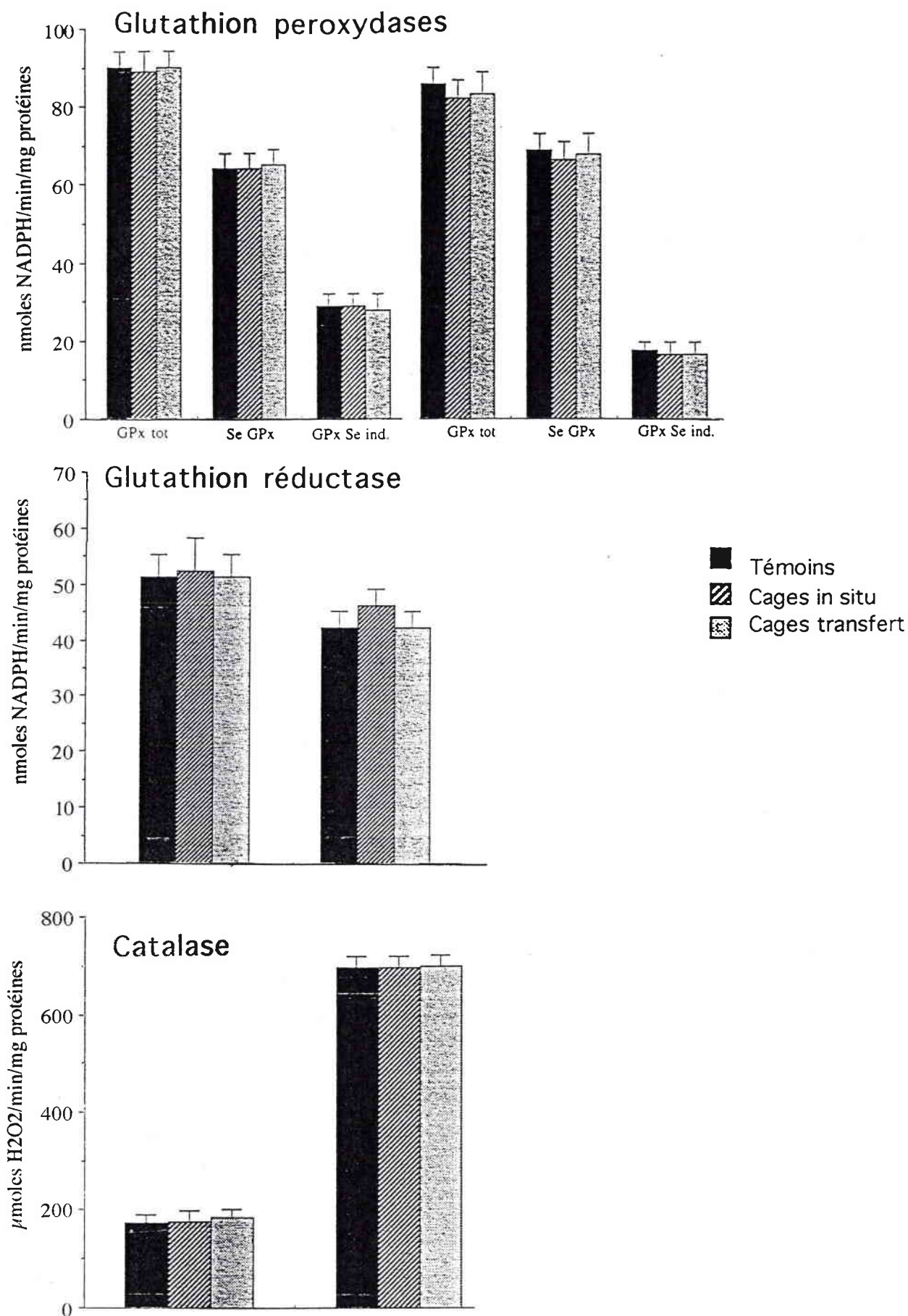
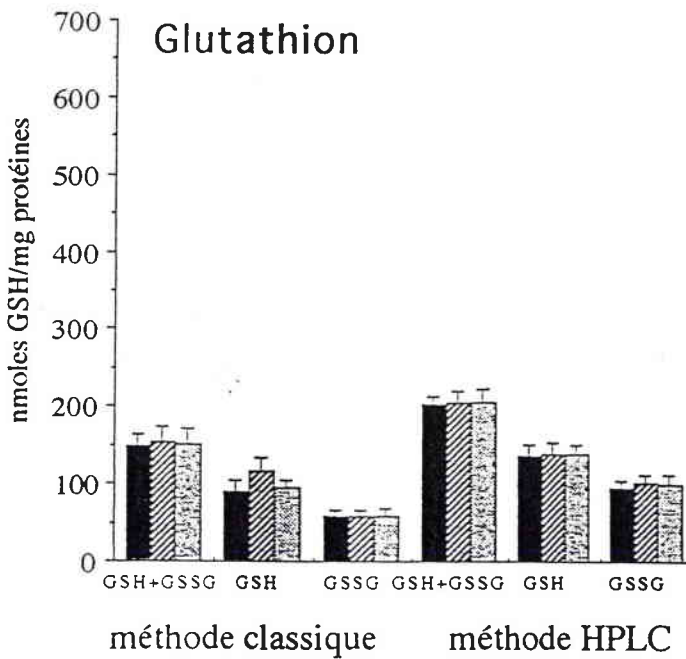
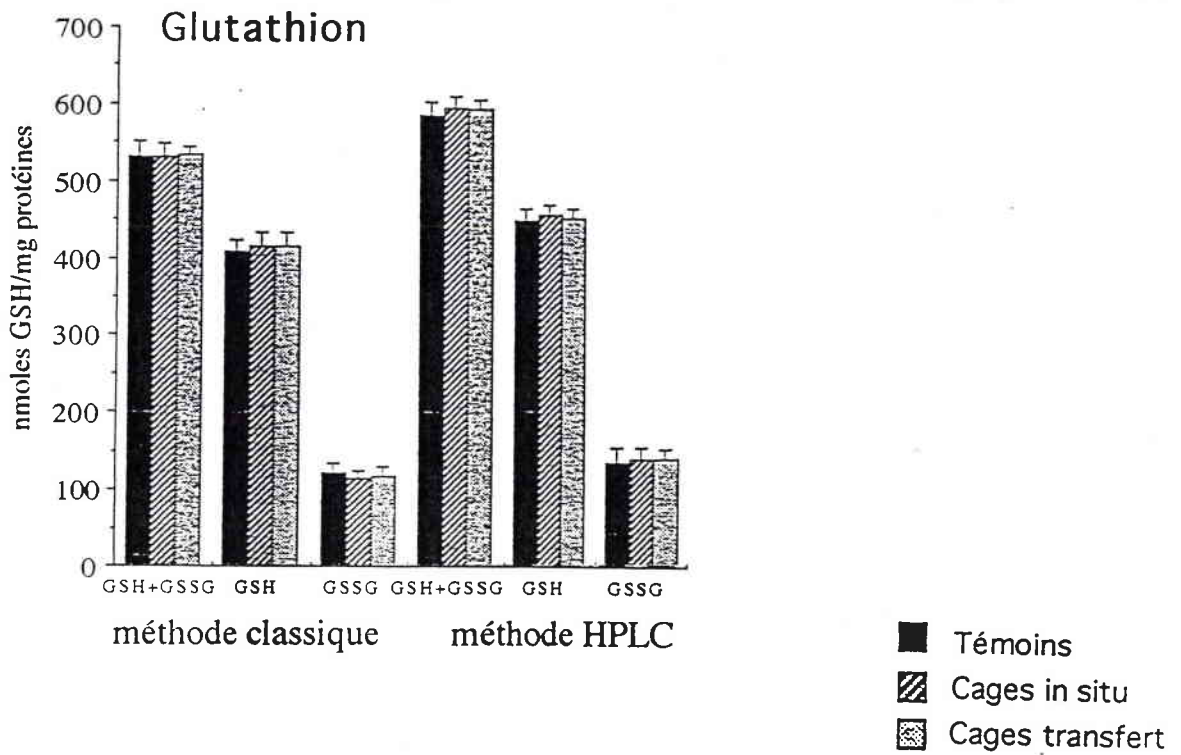


Figure 17 : Activités des **glutathion peroxydases** (totale, sélénium-dépendante et sélénium-indépendante), de la **glutathion réductase** et de la **catalase** mesurées dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **glandes digestives** des témoins et des individus mis en cages (n=16).



**Figure 18** : Taux de **glutathion** (total, réduit et oxydé) mesurée dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **glandes digestives** des témoins et des individus mis en cages (n=16).



Les résultats obtenus (figures 17 et 18) montrent que :

\* pour les activités glutathion peroxydases, glutathion réductase et catalase, il n'y a pas de différences significatives entre les témoins libres *in situ* et les individus mis en cages. Le transfert des organismes "en cages" dans un autre site ne semble pas non plus influencer les différentes activités.

On peut noter également que les variations inter-individus sont faibles pour ces différents paramètres.

\* il n'y a pas de différences significatives entre les taux de glutathion mesurés chez les témoins et les organismes mis en cages, qu'ils aient été transférés ou laissés *in situ*.

*En conclusion de ces résultats, nous retiendrons que la mise en cages n'induit pas de stress particulier des organismes et ne modifie pas les paramètres hépatiques quant aux systèmes antioxydants.*

*Le transfert des individus d'un site témoin vers un autre site témoin équivalent n'entraîne pas de variations des différents paramètres étudiés, tout au moins sur une période de 2 semaines.*

#### **IV.2.2. Transfert d'une population témoin vers un site contaminé.**

##### **IV.2.2.1. Exposition de bivalves témoins, pendant 8 jours, à une source de pollution identifiée.**

Cette étude **préliminaire** a porté sur l'étude de la sensibilité des différents paramètres étudiés à la suite de l'exposition d'individus à une source de pollution déterminée (cokerie).

Les individus ont été placés en amont et en aval de la source de pollution. En aval, deux points ont été choisis :

- \* un point proche du rejet de la cokerie (noté aval 1),
- \* un point situé à environ 2 km à vol d'oiseau du point de rejet (noté aval 2).

A chaque point d'étude (site témoin, 1 point en amont et 2 points en aval de la source de pollution) a été placée une cage contenant 3 bivalves. L'ensemble des cages a été laissé en place sur le terrain pendant 1 semaine. Au bout de cette période d'exposition, chaque bivalve a été disséqué dès le prélèvement et les tissus (glande digestive et branchies) ont été congelés immédiatement à -196°C dans l'azote liquide.

*De visu*, le site amont semblait peu contaminé, l'eau était très claire et il y avait de très nombreuses algues sur les pierres. Au point aval proche de la source de pollution, on distinguait le rejet brunâtre et huileux provenant de l'usine. L'eau du point le plus en aval était turbide et le site paraissait contaminé.

Des test microtox effectués sur des échantillons d'eau prélevés sur chacun des sites étudiés (amont et aval) avaient montré que les échantillons ne présentaient pas de toxicité aiguë.



Les données physicochimiques disponibles sur le rejet de la cokerie étaient très globales et faisaient état de concentrations de 3,9 mg/l en ions ammonium, 50 µg/l en phénols totaux et 3,2 mg/l en hydrocarbures. Nous ne possédions pas de résultats d'analyses des sédiments des sites étudiés.

Les activités enzymatiques et les taux de glutathion ont été mesurés sur les fractions subcellulaires : fraction cytosolique (S12000) et fraction des organites (C12000) de glandes digestives et de branchies.

Les résultats obtenus pour chacun des paramètres étudiés sont présentés sur les graphes des figures 19 à 21. Les valeurs brutes sont données dans le tableau T7 en annexe.

Les résultats montrent que :

- \* les activités glutathion peroxydase sélénium-dépendante et glutathion réductase sont diminuées chez les individus placés en aval de la source de pollution à la fois dans les branchies et les glandes digestives ; cette diminution est d'autant plus marquée que les individus sont proches de la source de rejet de l'effluent incriminé,

- \* les taux de glutathion réduit sont diminués au niveau hépatique et branchial chez les individus situés aux deux points en aval de la source de pollution, cette déplétion étant plus marquée au point de rejet de l'effluent. Le glutathion oxydé est augmenté uniquement au niveau branchial chez les organismes placés au deuxième point en aval de la source de pollution,

- \* la lipoperoxydation a été induite au niveau hépatique et branchial chez les individus placés le plus en aval par rapport au rejet de la cokerie ainsi que nous l'ont montré les mesures de malonaldéhyde,

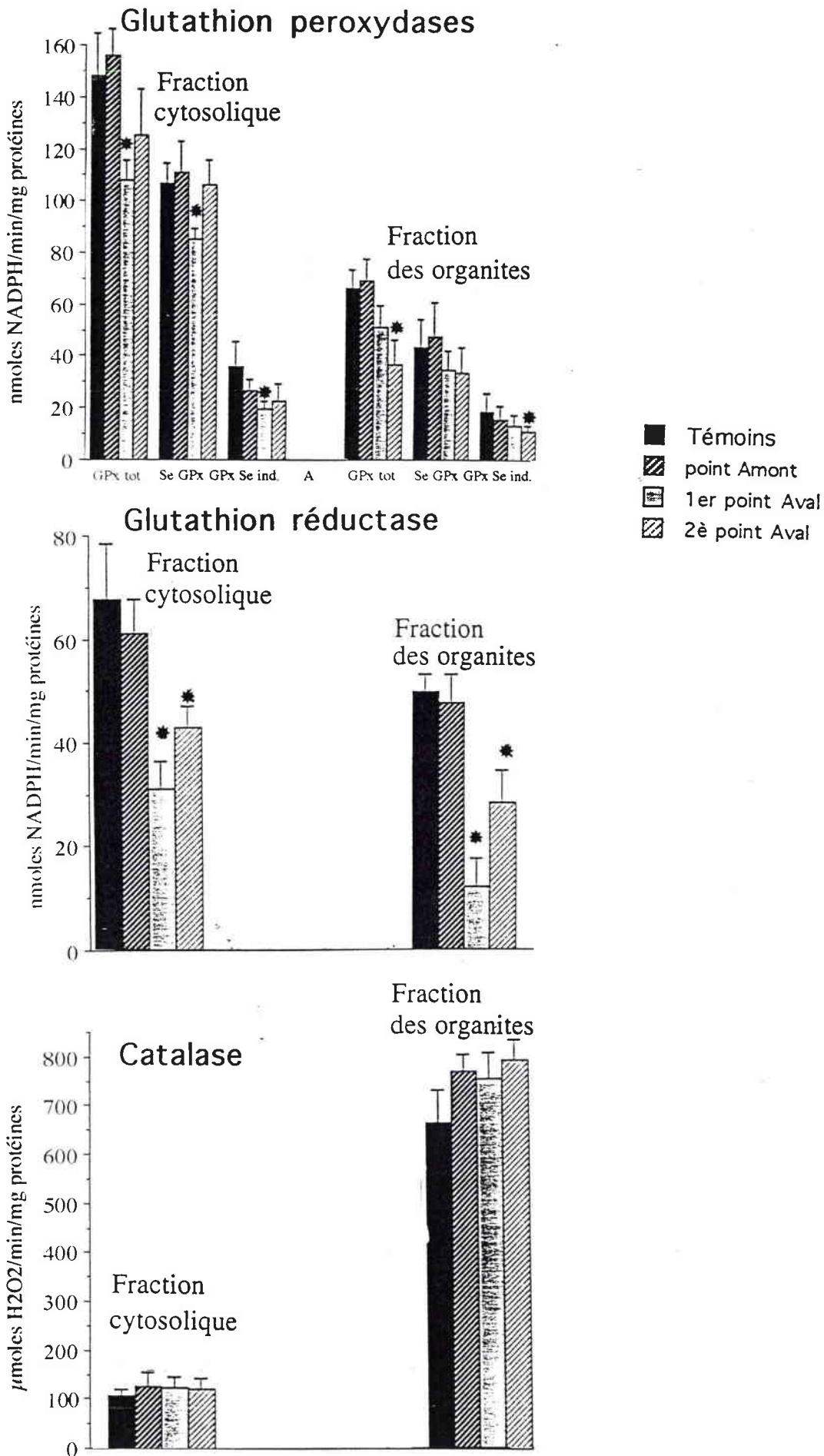
- \* par contre, les activités catalase et superoxyde dismutase ne sont pas significativement modifiées, tant au niveau branchial qu'hépatique,

- \* tous les paramètres étudiés ont des niveaux identiques chez les témoins et chez les individus placés en amont de la source de pollution.

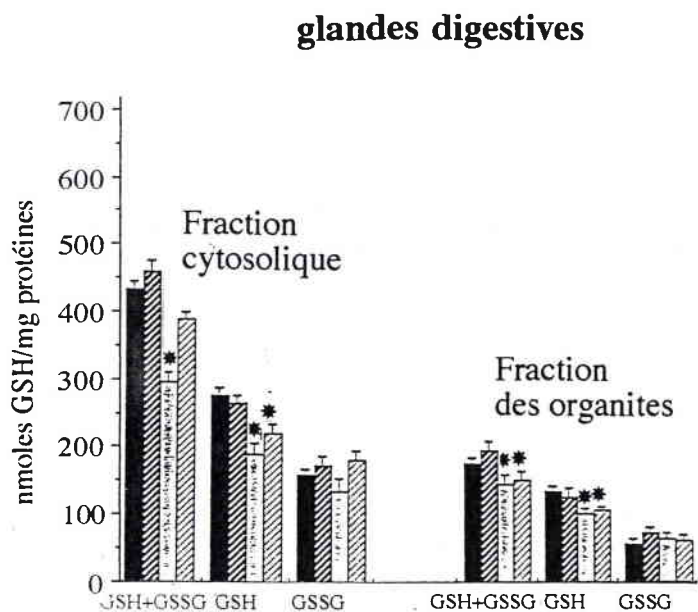
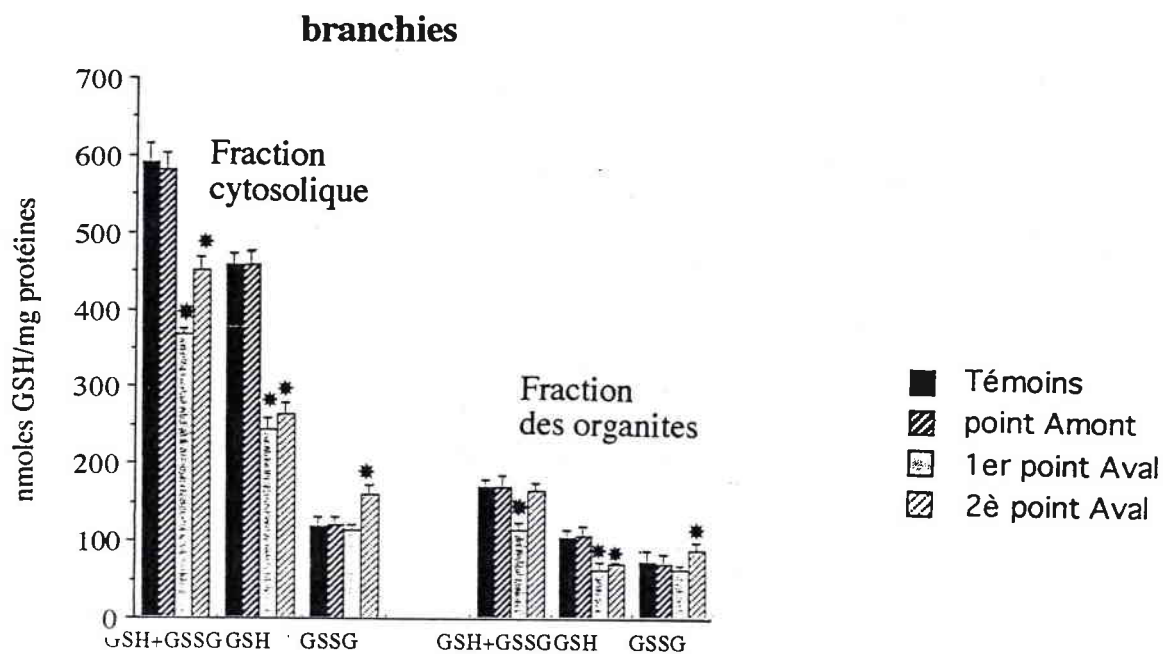
*En conclusion de ces premiers résultats, nous retiendrons que l'effet le plus marqué a été enregistré chez les individus placés au premier point en aval de la source de pollution c'est à dire au point de rejet des effluents de la cokerie. Il est important de noter que l'état de ces individus paraissait s'être détérioré après une semaine d'exposition.*

*Les paramètres ayant répondu au cours de ce faible temps d'exposition sont les activités glutathion peroxydase sélénium-dépendante et glutathion réductase ainsi que les taux de glutathion réduit.*

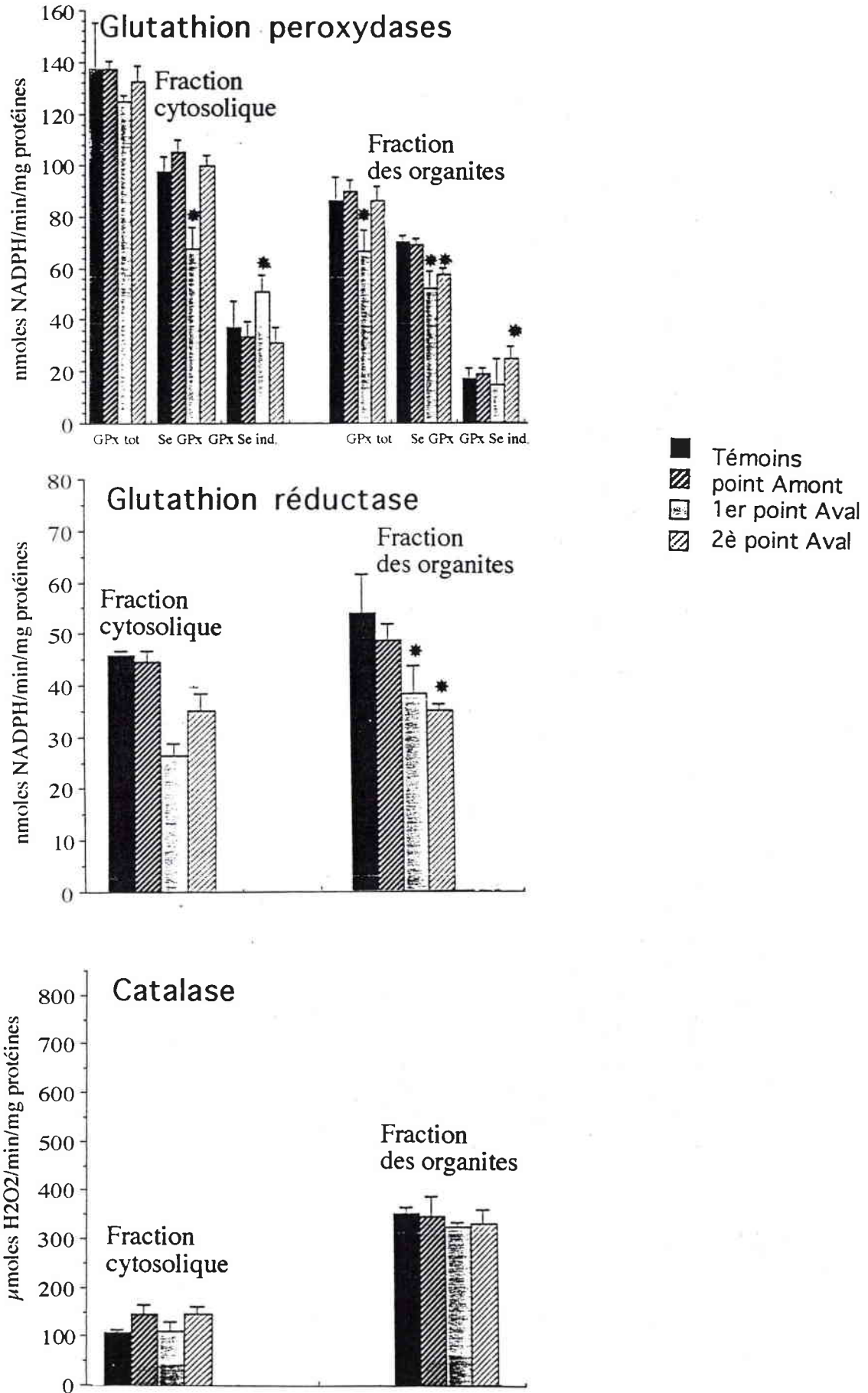
*Ces résultats partiels ne nous permettent pas de généraliser à d'autres profils de pollution ni de conclure quant au(x) paramètre(s) traduisant le mieux une altération précoce des bivalves exposés, mais cette étude nous a engagé à (1) reconduire ce type d'expérimentation tout en prolongeant la durée, (2) étudier simultanément la contamination testée par des analyses physicochimiques et (3) augmenter le nombre des individus pour avoir des résultats statistiquement exploitables.*



**Figure 19 :** Activités des **glutathion peroxydases** (totale, sélénium-dépendante et sélénium-indépendante), de la **glutathion réductase** et de la **catalase** mesurées dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **glandes digestives d'Unio tumidus** (n=3) placés en amont et en aval d'une source de pollution pendant 1 semaine.



**Figure 20** : Taux de **glutathion** (total, réduit et oxydé) mesurés dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **branchies** a) et des **glandes digestives** b) d'*Unio tumidus* (n=3) placés en amont et en aval d'une source de pollution pendant 1 semaine.



**Figure 21** : Activités des **glutathion peroxydases** (totale, sélénium-dépendante et sélénium-indépendante), de la **glutathion réductase** et de la **catalase** mesurées dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **branchies** d'*Unio tumidus* (n=3) placés en amont et en aval d'une source de pollution pendant 1 semaine.



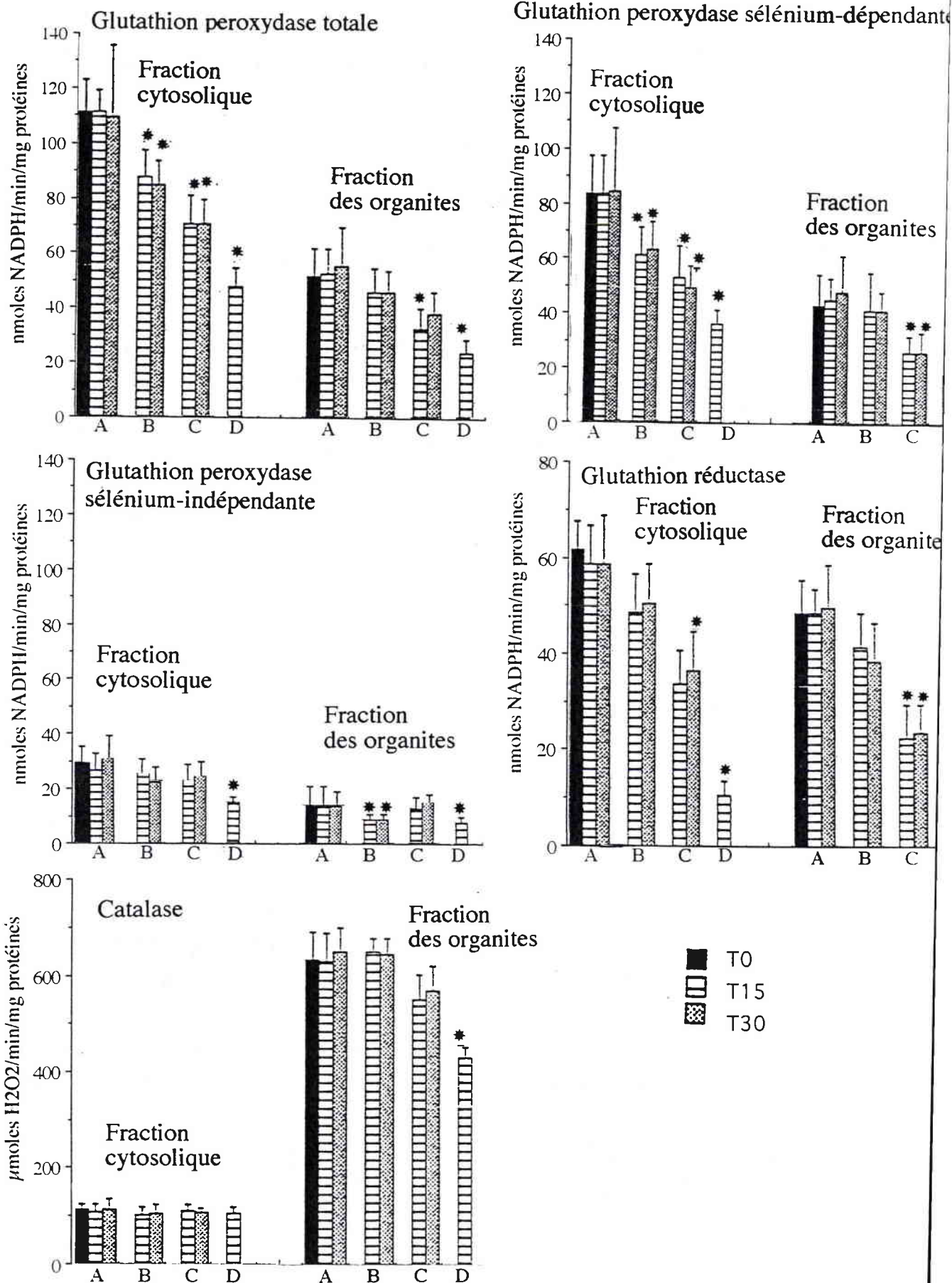


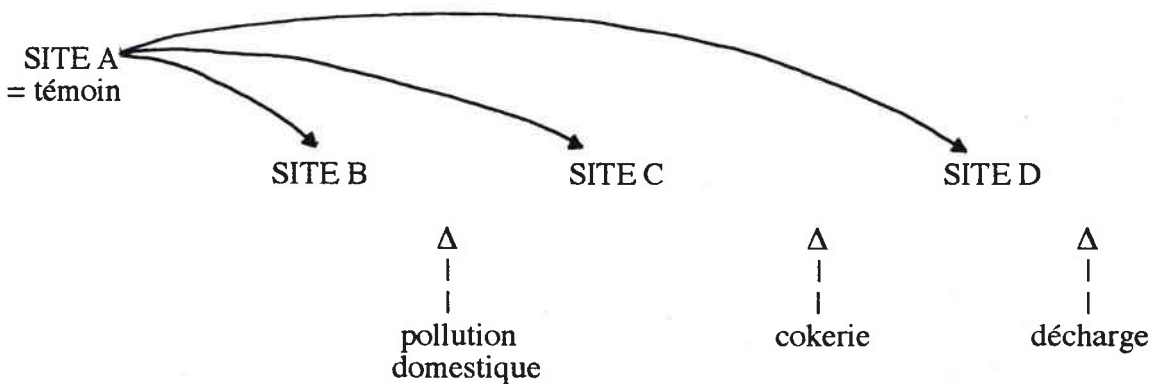
Figure 22 : Activités des **glutathion peroxydases** (totale, sélénium-dépendante et sélénium-indépendante), de la **glutathion réductase** et de la **catalase** mesurées dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **glandes digestives d'Unio tumidus** (n=5) mis en cages et transférés dans 3 sites (sites B, C et D). Les bivalves ont été exposés pendant 15 jours (T15) et 30 jours (T30).

#### IV.2.2.2. Transfert de bivalves témoins sur 3 sites contaminés : étude de la durée d'exposition.

Cette étude avait le même objectif que l'essai préliminaire précédent, à savoir : déterminer la sensibilité des différents paramètres antioxydants en réponse à l'exposition de bivalves à une source de pollution déterminée. Les sites sur lesquels ont été transférés les bivalves sont identiques à ceux qui ont servi pour l'étude précédente, mais 4 mois ont séparé les deux études. C'est pourquoi nous avons préféré nommer différemment les sites étudiés.

Dans cette étude, deux durées d'exposition ont été étudiées (15 et 30 jours) afin d'évaluer la réponse des activités enzymatiques antioxydantes et des taux de glutathion au cours du temps et de mettre en évidence une relation éventuelle entre la réponse des individus et la durée d'exposition. Les paramètres biologiques peuvent être modifiés et refléter une réponse adaptative ou compensatoire des organismes face à la pollution.

Les bivalves ont été placés sur 3 sites différents : B, C et D. Le schéma ci-dessous résume la situation des différents sites.



Cinq bivalves ont été prélevés au début de l'étude (T0), disséqués et les tissus congelés dans l'azote liquide afin d'avoir un niveau de référence pour les activités enzymatiques et les taux de glutathion et de pouvoir déceler une éventuelle variation de ces niveaux pendant la durée de l'expérimentation.

Pour les bivalves placés sur le site D, nous ne disposons que des résultats pour le premier temps d'exposition (T15), car après 30 jours d'exposition nous n'avons pas retrouvé les cages placées sur ce site.

Des sédiments ont été prélevés pour chacun des sites étudiés. Les résultats des analyses physicochimiques de ces sédiments sont présentés dans le tableau 12.

**Tableau 12 :** Analyses des micropolluants organiques et des métaux effectuées sur la fraction inférieure à 1 mm des sédiments prélevés dans chacun des sites étudiés. Les taux de composés organiques sont exprimés en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de poids sec de sédiment et ceux des métaux sont exprimés en  $\text{mg}/\text{kg}$  de poids sec de sédiment.

SITES ETUDIÉS	Site A	Site B	Site C	Site D
TAUX DES CONTAMINANTS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ poids sec de sédiment)	= site témoin			
<b>Hydrocarbures polycycliques aromatiques</b>	21.1	5781	5761	22882
fluoranthène				
benzo (b) fluoranthène	2.49	2735	1990	11418
benzo (a) fluoranthène	2.59	2587	536	383
benzo (a) pyrène	6.79	7625	2774	3954
benzo (ghi) pérylène	2.4	3072	2368	2115
indénopérylène	2.4	2207	2322	1509
<b>Chlorophénols</b>				
2, 3 - dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2, 4 - dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2, 5 - dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2, 6 - chlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
3, 4 - dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
3, 5 - dichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
2, 4, 5 - trichlorophénol	< 10	< 10	< 10	< 10
2, 4, 6 - trichlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
pentachlorophénol	< 5	< 5	< 5	< 5
<b>Pesticides organochlorés</b>				
hexachlorobutadiène	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
hexachlorobenzène	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
aldrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
dieldrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
endrine	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
OP DTT	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PP DDD	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
OP DDE	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PP DDE	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
OP DDT	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PP DDT	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
1, 2 - dichlorobenzène	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
1, 3 - dichlorobenzène	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
1, 4 - dichlorobenzène	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
1, 2, 3 - trichlorobenzène	< 0.20	< 0.20	< 0.20	< 0.20
1, 2, 4 - trichlorobenzène	< 0.20	< 0.20	< 0.20	< 0.20
1, 3, 5 - trichlorobenzène	< 0.20	< 0.20	< 0.20	< 0.20
<b>Polychlorobiphényles</b>				
PCB 28	< 0.15	< 0.15	< 0.15	< 0.15
PCB 52	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
PCB 101	< 0.15	205	207	165
PCB 118	< 0.15	307	149	254
PCB 138	0.31	569	280	357
PCB 153	0.51	558	311	288
PCB 180	0.29	420	298	229
<b>Métaux (mg/kg poids sec)</b>				
arsenic	9.9	39.3	28.6	32.6
chrome total	11	34.4	77.8	73.6
cuivre	7.9	89.3	93.5	92.6
cadmium	< 1	< 1	< 1	< 1
plomb	8	254	198	163
mercure	< 0.05	0.96	18.4	0.52
nickel	16.4	40.6	56.3	70.8

L'examen des niveaux de contamination des sédiments prélevés sur les différents sites, représentés par les taux des xénobiotiques analysés (tableau 12) montre que :

- \* le site A, qui est le site témoin présente effectivement un taux de contamination très faible si l'on en juge par les taux d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), de polychlorobiphényles (PCB) et de quelques métaux qui sont très faibles et bien inférieurs à ceux des autres sites,

- \* les sites B et C ont des niveaux de contamination identiques pour ce qui concerne les taux de HAP et de métaux. Seuls les taux de PCB sont plus élevés dans le site B comparés au site C,

- \* le site D est le plus contaminé par les HAPs parmi les trois sites étudiés.

Les activités glutathion peroxydases, glutathion réductase et catalase ainsi que les taux de glutathion ont été mesurés sur les fractions subcellulaires (fraction cytosolique S12000 et fraction des organites C12000) de glandes digestives et de branchies. Les valeurs brutes sont données en annexe dans les tableaux T8 et T9.

Les résultats, représentés sur les graphes des figures 22 à 24 montrent que :

- \* pour tous les paramètres étudiés chez les témoins, il n'y a pas de différences significatives entre les niveaux d'activités mesurées au temps T0 et ceux enregistrés après 15 et 30 jours d'exposition, tant au niveau hépatique que branchial,

- \*  **dans les glandes digestives**  (figures 22 et 23) :

- les activités glutathion peroxydase totale et sélénium-dépendante sont diminuées chez les individus transférés dans les sites C et D comparativement aux individus témoins. Ces diminutions sont de l'ordre de 30% à 50% dans la fraction cytosolique et de 50% dans la fraction des organites,

- l'activité glutathion réductase est diminuée chez les organismes placés dans les sites C et D par rapport aux témoins. Au site D, la diminution de l'activité est très importante dans les deux fractions subcellulaires cytosol et organites,

- le taux de glutathion réduit est déplété chez les bivalves placés sur les sites C et D, d'environ 40% et 60% respectivement dans les deux fractions subcellulaires.

Le taux de glutathion oxydé n'est pas modifié de façon significative,

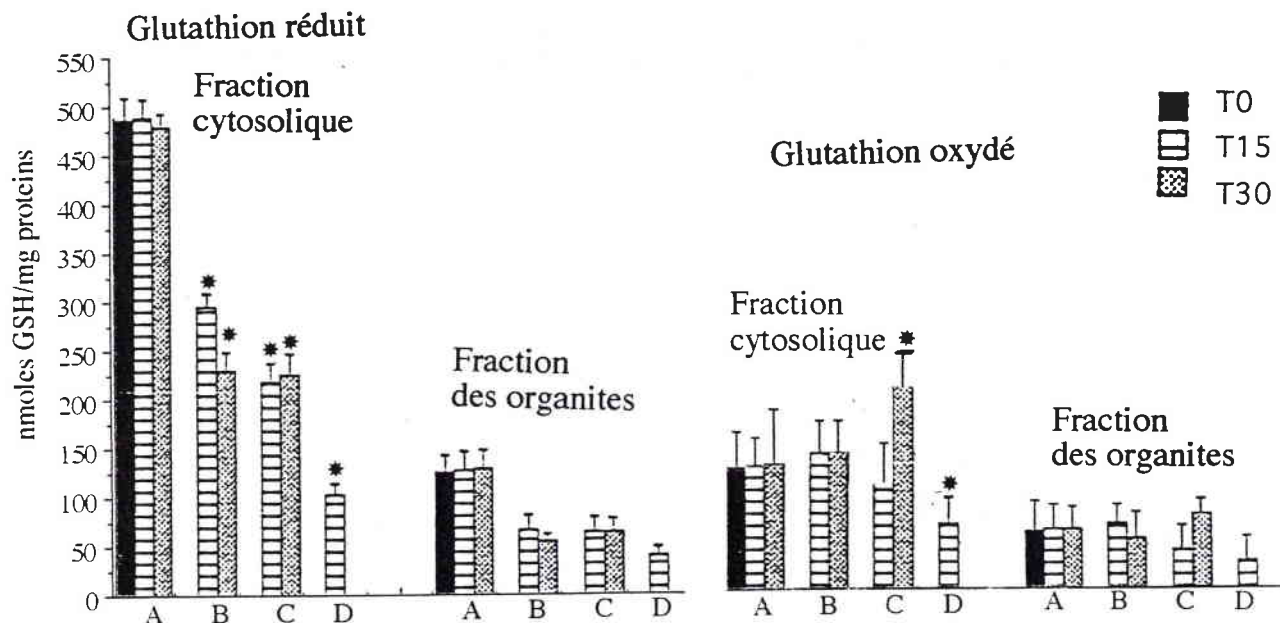
- l'activité de la catalase et celles de la SOD étaient diminuées (40%) uniquement chez les individus transférés dans le site D,

- il ne semble pas y avoir de pas de relation entre le taux de diminution des activités antioxydantes et la durée d'exposition des individus ; en effet, les valeurs mesurées sont peu différentes après 15 et 30 jours d'exposition pour le site C. La perte des cages en D ne nous permet malheureusement pas de confirmer cette constatation.

- des effets de lipoperoxydation ont été induits chez les individus transférés sur le site D.



## branchies



## glandes digestives

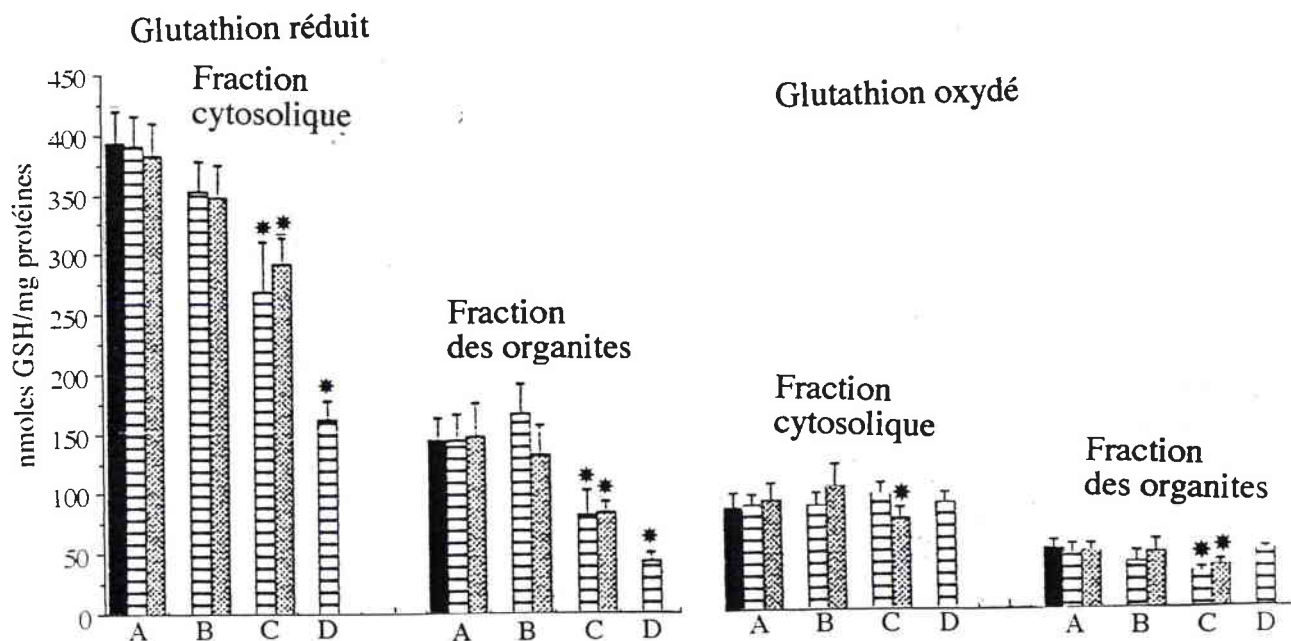


Figure 23 : Taux de **glutathion** (réduit et oxydé) mesurés dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **branchies** a) et des **glandes digestives** b) d'*Unio tumidus* (n=5) mis en cages et transférés dans 3 sites (sites B, C et D). Les bivalves ont été exposés pendant 15 jours (T15) et 30 jours (T30).

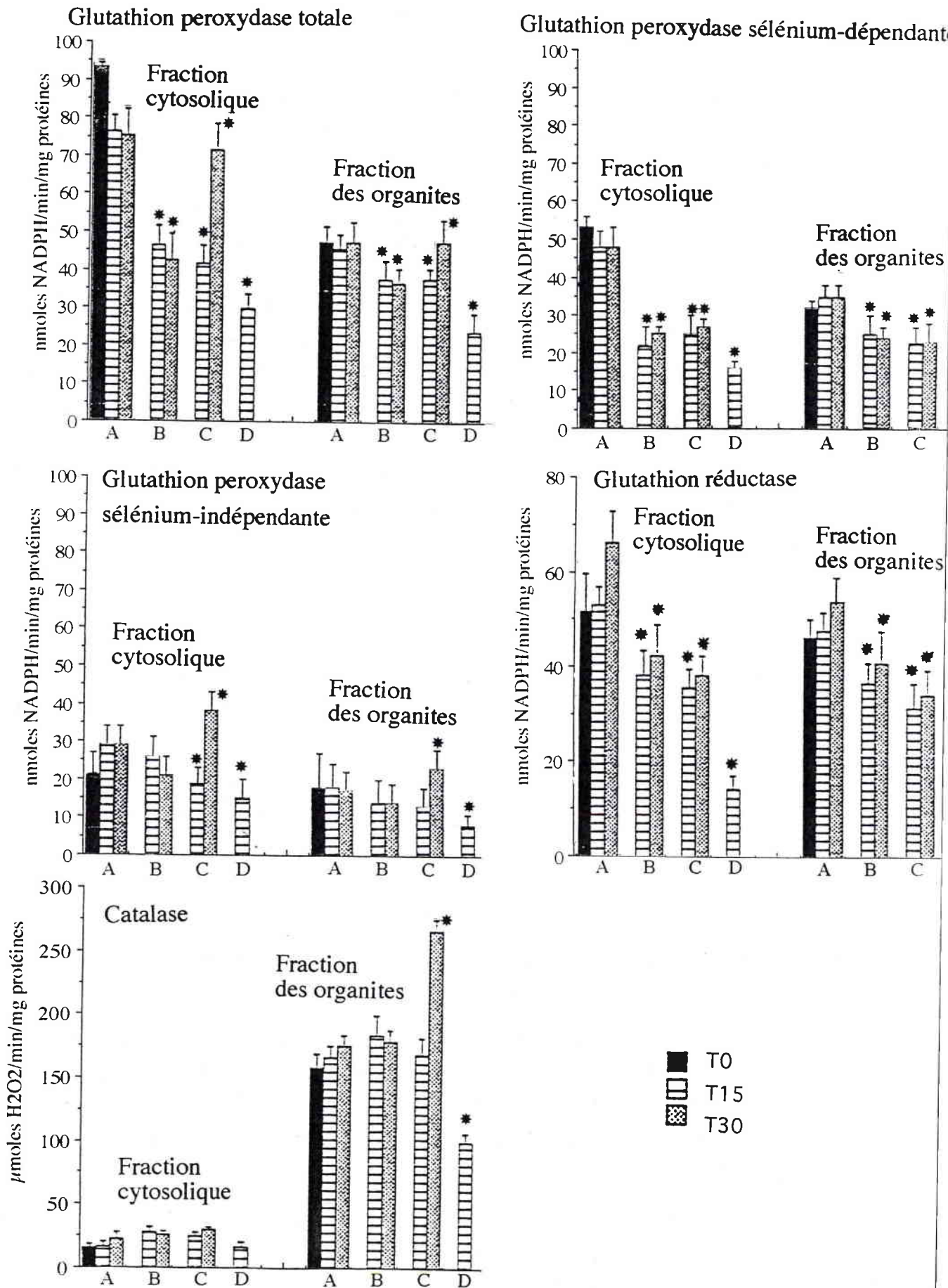


Figure 24 : Activités des **glutathion peroxydases** (totale, sélénium-dépendante et sélénium-indépendante), de la **glutathion réductase** et de la **catalase** mesurées dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **branchies** d'*Unio tumidus* (n=5) mis en cages et transférés dans 3 sites (sites B, C et D). Les bivalves ont été exposés pendant 15 jours (T15) et 30 jours (T30).

**\* au niveau des branchies (figures 24 et 23) :**

- les activités glutathion peroxydase totale et sélénium-dépendante sont diminuées de 40 et 50% dans la fraction cytosolique des individus du site B après 15 et 30 jours d'exposition, par rapport à leurs témoins respectifs.

Chez les individus du site C, ces activités sont diminuées dans des proportions identiques après 15 jours d'exposition ; par contre après 30 jours d'exposition l'activité glutathion peroxydase sélénium-indépendante est très nettement augmentée.

Chez les individus du site D, les activités glutathion peroxydase totale et sélénium-dépendante sont fortement diminuées : 70% dans le cytosol et 50% dans les organites,

- l'activité glutathion réductase est diminuée chez les individus des sites B, C et D par rapport aux témoins. La diminution est de même intensité au niveau des sites B et C (35%) alors qu'elle est beaucoup plus marquée au niveau du site D (80%),

- le taux de glutathion réduit est diminué de 40% dans les deux fractions subcellulaires après 15 et 30 jours pour les individus transférés sur le site B, mais le taux de glutathion oxydé ne change pas. La diminution du taux de glutathion réduit est du même ordre de grandeur pour le site C, mais est accompagné d'un doublement du taux de glutathion oxydé après 30 jours d'exposition. Au niveau du site D, les taux de glutathion réduit et oxydé sont fortement diminués chez les individus exposés par rapport aux témoins,

- l'activité de la catalase est augmentée de 75% au niveau peroxysomal (C12000) chez les individus du site C après 30 jours d'exposition. Aucune modification de la superoxyde dismutase n'a été trouvée chez ces organismes.

Les activités de la catalase et de la superoxyde dismutase sont diminuées uniquement en D (40% de l'activité de chacune de ces deux enzymes). Simultanément, des effets de lipoperoxydation ont été trouvés chez les individus transférés sur ce site

***En conclusion de cette étude, nous retiendrons que :***

- \* *les activités enzymatiques et les taux de glutathion ne varient pas chez les témoins mis en cages pendant toute la durée de l'expérimentation,*

- \* *les diminutions des paramètres biologiques antioxydants mises en évidence chez les bivalves transférés dans les sites B et C sont du même ordre de grandeur, ce qui est en accord avec le niveau de contamination des sédiments de ces deux sites, qui s'est révélé comparable pour les composés organiques (HAP, PCB) et les métaux. Les réponses sont cependant plus marquées en C à J15,*

- \* *les réponses des différents paramètres face au stress induit par la pollution sont plus marquées au niveau branchial qu'au niveau hépatique.*

- \* *dans les branchies des individus transférés au niveau du site C après 30 jours d'exposition, une augmentation des activités glutathion peroxydase sélénium-indépendante et catalase est associée à une augmentation des taux de glutathion oxydé ; alors qu'après 15*

*jours d'exposition les activités antioxydantes étaient diminuées, il semble donc qu'il y ait eu chez ces individus une réponse compensatoire,*

*\* les diminutions des activités antioxydantes hépatiques et branchiales sont toujours plus importantes chez les bivalves transférés en D, ce qui peut être mis en relation avec les taux élevés de HAPs au niveau de ce site,*

*\* au niveau hépatique, la durée d'exposition des individus n'accentue pas la réponse (diminution) des paramètres biologiques ,*

Tableau récapitulatif des différents essais d'intoxications réalisés au laboratoire.  
 Les toxiques testés sont le cuivre (10 et 30 $\mu$ g/l), le thiram (50 et 100 $\mu$ g/l). Ils ont été testés séparément et en mélange sur *Unio tumidus*, la durée d'exposition a été de 3 ou 10 jours.

	Test préliminaire 1	Test préliminaire 2	Test préliminaire 3	Test définitif
Témoin	1	1	3	5
Témoin DMSO	1	1		5
Cuivre 10 $\mu$ g/l	1			
Cuivre 30 $\mu$ g/l	1	1		5
Thiram 50 $\mu$ g/l	1	1		
Thiram 100 $\mu$ g/l				5
Cuivre 30 $\mu$ g/l + Thiram 50 $\mu$ g/l	1	1		
Cuivre 30 $\mu$ g/l + Thiram 100 $\mu$ g/l			3	5
Durée de l'intoxication	10 jours Mai - Juin 1993	3 jours Mai - Juin 1993	3 jours Octobre 1993	3 jours Octobre 1994
Tissus analysés	Glandes digestives + Branchies	Glandes digestives + Branchies	Glandes digestives + Branchies	Glandes digestives + Branchies

## 3ème partie

---



---

### **Intoxication des bivalves au laboratoire : évaluation de la sensibilité des paramètres face à un stress chimique.**

---



---

Parallèlement aux essais précédents, ont été conduits des expériences en laboratoire avec l'objectif de (i) vérifier si les systèmes antioxydants étaient sensibles à un stress chimique induisant des altérations physiologiques et (ii) déterminer en conditions contrôlées quels pourraient être les paramètres les plus sensibles et leur type de réponse.

Pour ces essais, nous avons choisi de tester le cuivre et le thiram à des concentrations sublétales. Ces deux substances ont été étudiés parce que des effets de synergie, évoquant des effets de stress oxydant, avaient été mis en évidence entre le cuivre et des dithiocarbamates de structure proche du thiram (Vasseur *et al.*, 1988).

Les concentrations testées susceptibles d'induire des altérations physiologiques, sont les suivantes :

\* 0 à 30  $\mu\text{g/l}$  pour le cuivre ( $\text{Cu}^{++}$ ), la  $\text{CL}_{50}$  (96 heures) pour la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) étant de 80  $\mu\text{g/l}$  (Siem *et al.*, 1984).

\* 0 à 100  $\mu\text{g/l}$  pour le thiram : des concentrations de 500  $\mu\text{g/l}$  n'induisaient pas d'effet létal à court terme (72 heures) sur des vertébrés aquatiques (*pleurodeles waltl*) (rapport final contrat SRETIE/ministère de l'environnement).

Les essais ont été réalisés par exposition des bivalves à l'eau contaminée par le cuivre, le thiram ou l'association des deux toxiques.

Les modalités des essais préliminaires d'intoxication de bivalves au laboratoire sont résumées dans le tableau ci-contre (modalités d'intoxications, nombre d'individu(s) par concentration testée et tissus analysés). Le tableau T10 donné en annexe résume les activités spécifiques et la taux de glutathion obtenus pour chacun des tests réalisés.

#### **IV.3.1. Essais préliminaires.**

Au cours des 3 essais préliminaires, les bivalves ont été exposés aux différents toxiques pendant 10 jours (test1) ou 3 jours (tests 2 et 3).

D'un point de vue qualitatif, nous pouvons retenir que les bivalves intoxiqués par le cuivre filtraient très peu et étaient incapables de refermer leurs valves après contact. Les autres ne présentaient aucun signe de faiblesse comparés aux témoins.

Lors du 1er test préliminaire, les bivalves sont morts et nous n'avons pas pu réaliser les mesures des paramètres antioxydants. Dans les deux essais suivants, les bivalves ont été analysés après 3 jours d'exposition.

Les résultats obtenus lors des essais 2 et 3 ont montré que l'exposition des bivalves au mélange de cuivre ( $30\mu\text{g/l}$ ) et de thiram ( $100\mu\text{g/l}$ ) induisait les effets suivants :

- une diminution de 50% de l'activité glutathion réductase hépatique et branchiale,
- une diminution de l'activité glutathion peroxydase sélénium-dépendante dans les glandes digestives,
- une réduction nette du glutathion réduit et du glutathion total dans les branchies.

#### **IV.3.2. Essai définitif.**

Les bivalves utilisés dans cet essai ont été prélevés au cours de la campagne d'échantillonnage d'octobre 1994. Les dosages des différents paramètres ont été réalisés sur les glandes digestives et les branchies d'individus intoxiqués pendant 3 jours par  $30\mu\text{g/l}$  de cuivre ou  $100\mu\text{g/l}$  de thiram, seuls et en association.

Les résultats obtenus pour chacun des paramètres étudiés sont représentés sur les graphes des figures 25 à 28. Les valeurs brutes sont données dans les tableaux T11 et T12 en annexe.

Les résultats mettent en évidence :

\* une diminution du taux de glutathion réduit marquée surtout lors d'exposition au mélange cuivre-thiram dans les deux tissus glandes digestives et branchies ; une diminution est également notée lors d'exposition au cuivre seul (figures 25 et 26).

\* une diminution de l'activité glutathion peroxydase sélénium-dépendante dans les branchies (figure 27) par le thiram et par le cuivre, alors qu'aucun effet n'est noté dans les glandes digestives

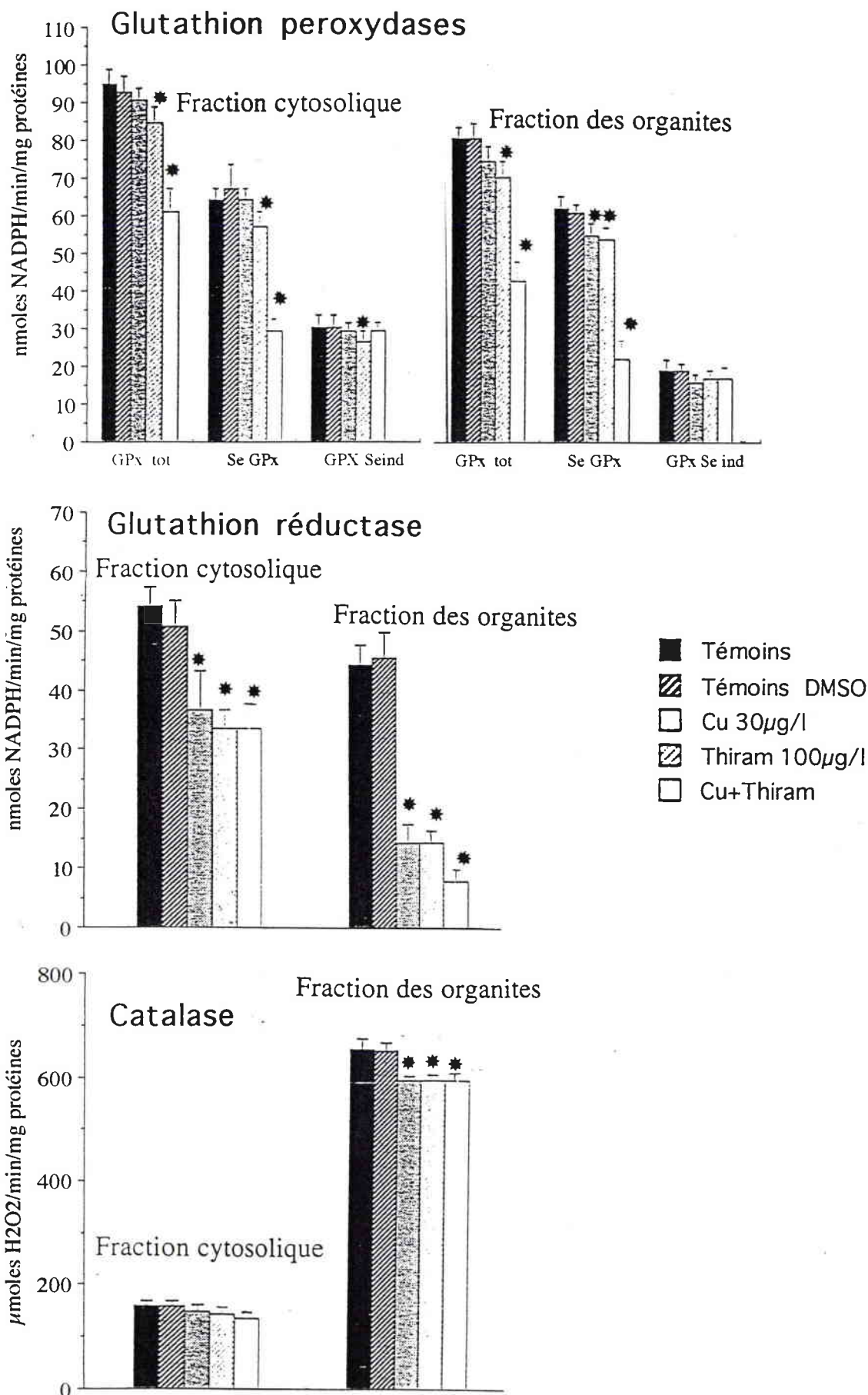
Dans les glandes digestives (figure 28), la diminution d'activité n'est marquée que lors de l'exposition au mélange cuivre-thiram. Dans ce tissu, la diminution est de 40% dans le cytosol et de 60% dans les organites ; au niveau branchial la diminution est respectivement de 80 et 70%.

\* une diminution de l'activité de la glutathion réductase dans les deux fractions, surnageant et culot 12000g, dans les glandes digestives et les branchies, que les organismes aient été intoxiqués par le cuivre, le thiram, ou l'association des deux.

La diminution d'activité est toujours plus marquée lorsque les deux substances sont associées, par suite d'une additivité des effets.

Dans les branchies, l'inhibition est plus importante dans la fraction cytosolique que dans la fraction des organites. Dans les glandes digestives au contraire, l'inhibition est observée essentiellement dans la fraction particulaire où elle est de 65% contre 30% dans le cytosol.

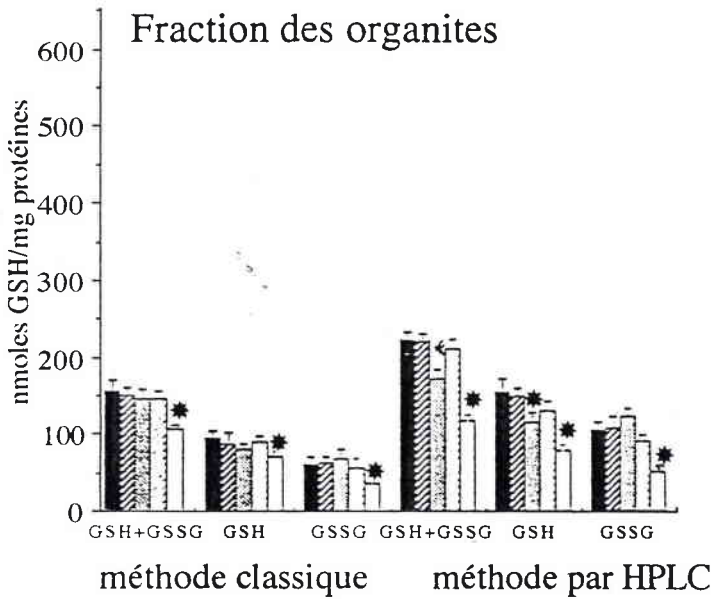
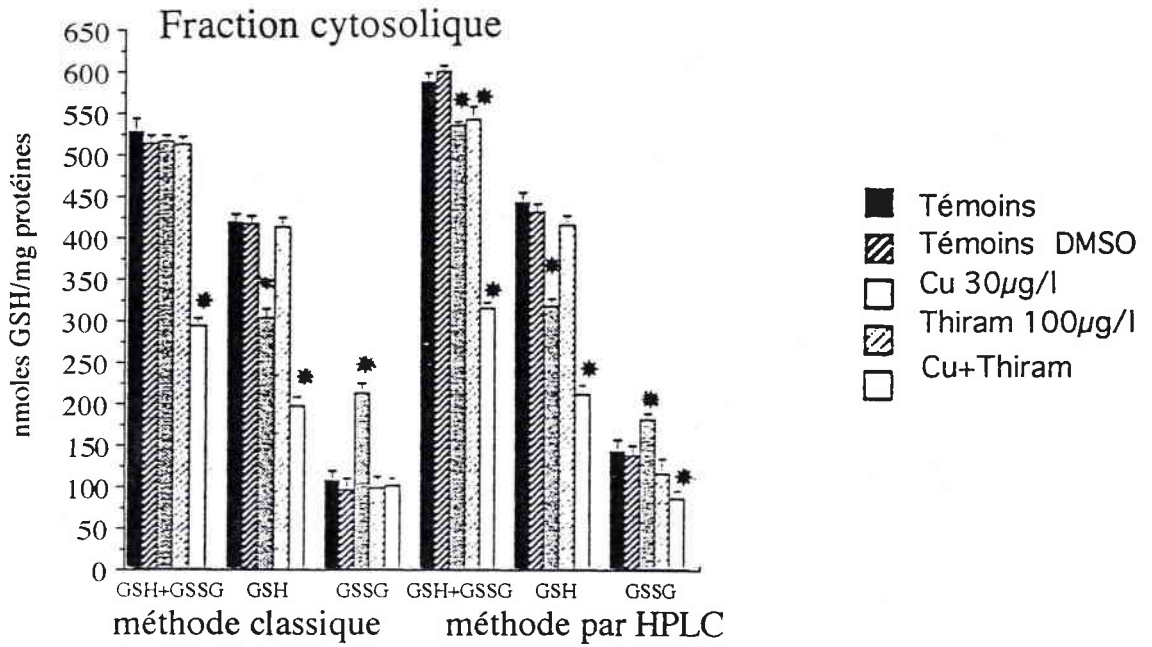




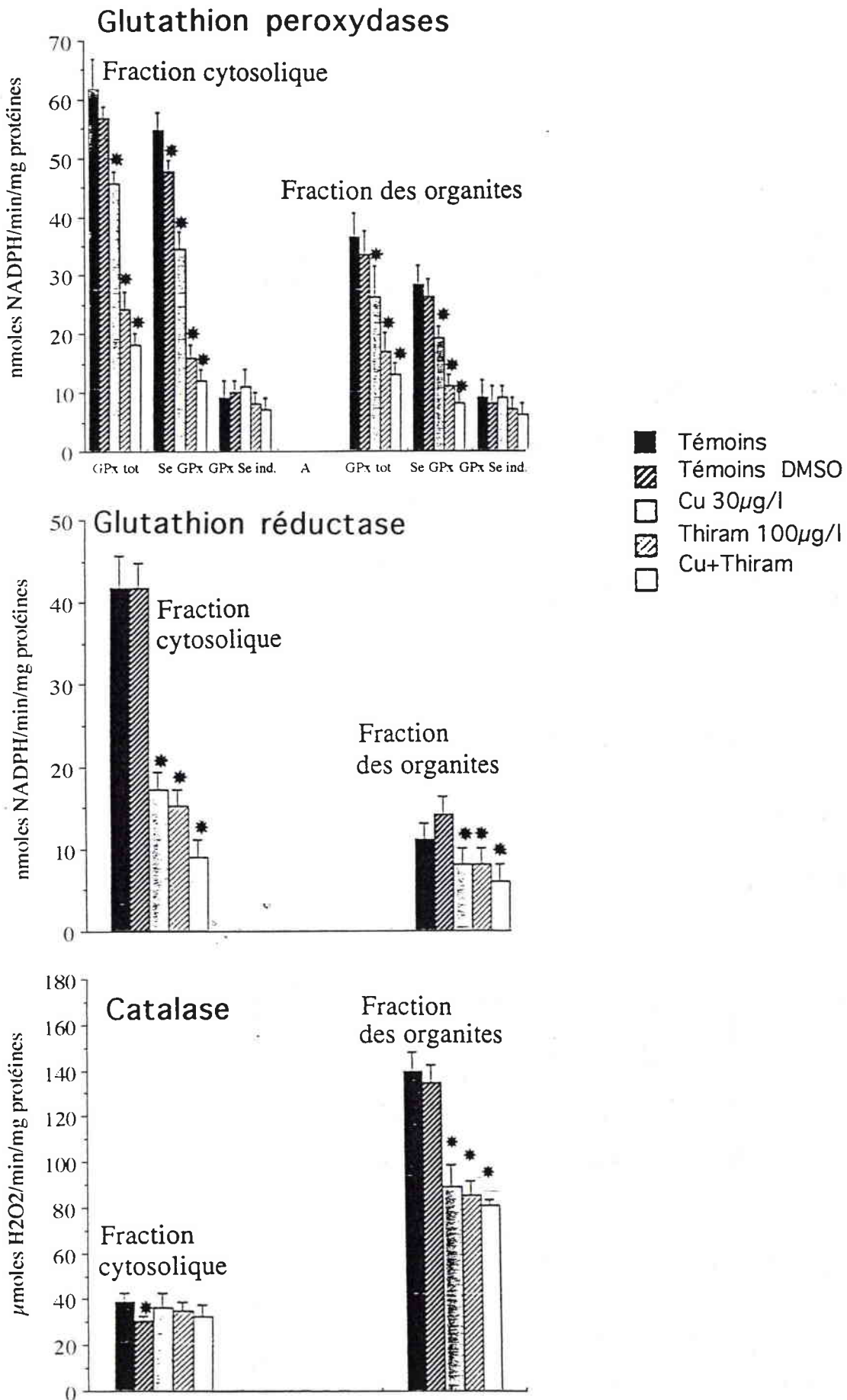
**Figure 25** : Activités des **glutathion peroxydases** (totale, sélénium-dépendante et sélénium-indépendante), de la **glutathion réductase** et de la **catalase** mesurées dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **glandes digestives** d'*Unio tumidus* (n=5) intoxiqués au laboratoire pendant 3 jours avec du cuivre (30µg/l), du thiram (100µg/l) et le mélange des deux toxiques.



# Glutathion

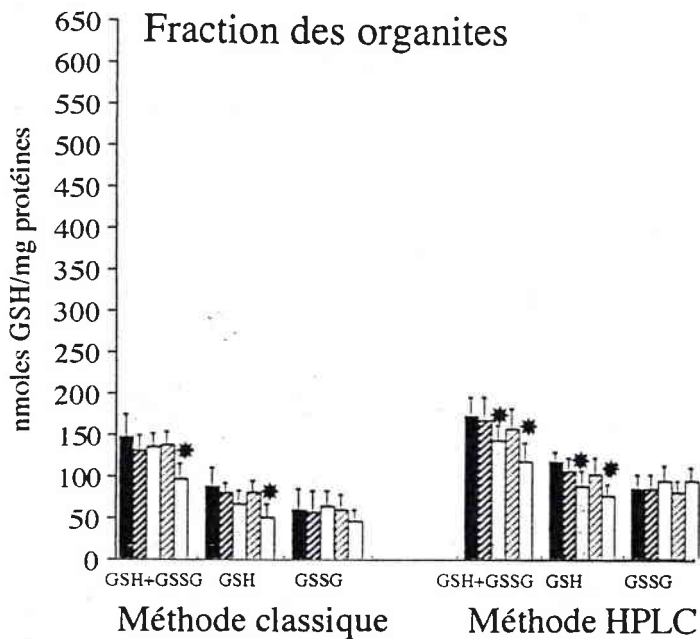
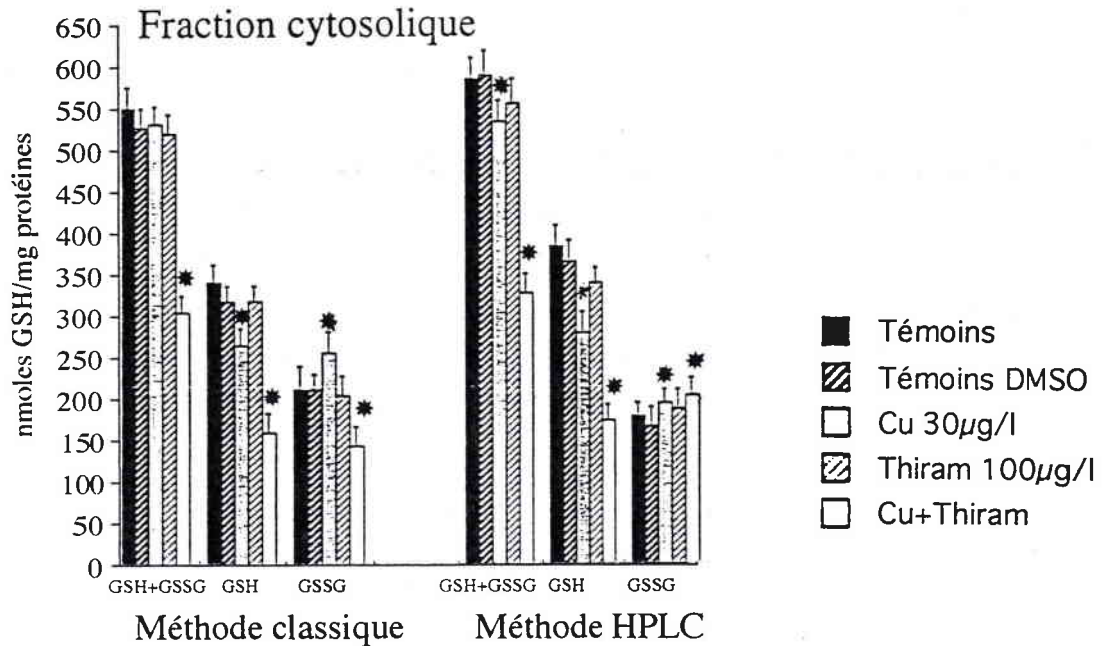


**Figure 26** : Taux de **glutathion** (total, réduit et oxydé) mesurés dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **glandes digestives** d'*Unio tumidus* (n=5) intoxiqués au laboratoire pendant 3 jours avec du cuivre (30µg/l), du thiram (100µg/l) et le mélange des deux toxiques.



**Figure 27 :** Activités des **glutathion peroxydases** (totale, sélénium-dépendante et sélénium-indépendante), de la **glutathion réductase** et de la **catalase** mesurées dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **branchies d'*Unio tumidus*** (n=5) intoxiqués au laboratoire pendant 3 jours avec du cuivre (30µg/l), du thiram (100µg/l) et le mélange des deux toxiques.

## Glutathion



**Figure 28** : Taux de **glutathion** (total, réduit et oxydé) mesurés dans la fraction cytosolique (S12000) et la fraction des organites (C12000) des **branchies** d'*Unio tumidus* (n=5) intoxiqués au laboratoire pendant 3 jours avec du cuivre (30µg/l), du thiram (100µg/l) et le mélange des deux toxiques.

Ces résultats témoigneraient d'un stress oxydant dans les glandes digestives, généré par le mélange cuivre-thiram : le cuivre serait l'élément de transition catalysant la formation d'espèces réactives de l'oxygène en présence d'un ligand organique représenté par le thiram, complétant du cuivre.

Ces effets de stress oxydant sont en liaison avec la formation de malonaldéhyde qui a été observée dans les branchies et les glandes digestives lors d'exposition au mélange cuivre-thiram. La lipoperoxydation s'expliquerait par la déplétion en glutathion réduit et par la diminution importante d'activité des systèmes antioxydants glutathion réductase et glutathion peroxydase sélénium-dépendante dans les branchies.

• **Analyse des activités dans l'homogénat total et comparaison aux résultats obtenus sur fractions.**

Les activités et les taux des systèmes antioxydants ont été analysés sur le surnageant 500g des homogénats totaux de branchies et de glandes digestives afin de comparer les résultats à ceux obtenus précédemment sur les fractions séparées et purifiées.

Le but était de voir si le fractionnement subcellulaire était indispensable pour mettre en évidence la toxicité.

Cet essai comparatif a été réalisé sur 5 individus témoins et 5 individus intoxiqués par le mélange cuivre + thiram. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau .

Les résultats obtenus montrent que les effets mesurés dans les homogénats totaux de glandes digestives et de branchies vont dans le même sens que ceux mesurés dans les deux fractions subcellulaires S12000 et C12000. Ces résultats confirment que :

- \* les activités glutathion peroxydase sélénium-dépendante sont diminuées dans des proportions identiques (60% dans les glandes digestives et 80% au niveau branchial), que les analyses soient réalisées sur surnageant d'homogénat total ou sur fractions lors d'exposition au mélange cuivre - thiram,

- \* les activités glutathion réductase sont également diminuées dans des proportions identiques dans le surnageant d'homogénat total et dans les fractions, dans les deux tissus étudiés,

- \* les taux de glutathion total et réduit sont diminués respectivement de 50 et 70% au niveau hépatique et branchial dans l'homogénat total comme dans les fractions subcellulaires,

- \* ces effets s'accompagnent de la formation de malonaldéhyde traduisant des effets de lipoperoxydation.

Dans les conditions expérimentales décrites, le fractionnement subcellulaire ne semble donc pas indispensable attendu du fait que dans les branchies le taux d'inhibition des paramètres antioxydants dans l'homogénat total était du même ordre de grandeur que sur fractions séparées. Cependant, nous sommes dans des conditions d'intoxications où les concentrations en toxiques sont relativement élevées et rien ne nous permet de dire que dans le cas d'une intoxication plus modérée les résultats seraient similaires. En effet, le fractionnement subcellulaire permettrait peut être de mettre en évidence des différences de sensibilité selon la localisation subcellulaire des isoenzymes.

*En conclusion de ces intoxications en laboratoire, nous retiendrons que :*

*\* les activités glutathion peroxydases et glutathion réductase ainsi que les taux de glutathion réduit sont diminués chez les bivalves intoxiqués par le cuivre (30 µg/l), le thiram (100 µg/l) et le mélange des deux toxiques,*

*\* les diminutions enregistrées sont toujours plus marquées lorsque les bivalves sont intoxiqués par le mélange des deux toxiques. Une additivité des effets est enregistrée pour la plupart des paramètres. Pour la glutathion peroxydase sélénium-dépendante, il semble se manifester des effets de synergie entre le cuivre et le thiram, entraînant une diminution importante de l'activité enzymatique lorsque les deux substances sont associées,*

*\* les effets sont, dans l'ensemble, plus importants au niveau branchial qu'au niveau hépatique.*

## **V. DISCUSSION**

Les taux de glutathion sont exprimés en nmoles glutathion/mg protéines.  
 ND = Non Déterminé.

			GSH + GSSG Dosage par GD Br		GSH la méthode classique au GD Br		GSSG DTNB GD Br		GSH + GSSG Dosage GD		GSH par la méthode HPLC GD		GSSG GD	
Octobre 93	F -	4	S	532 ± 73	542 ± 84	447 ± 65	305 ± 59 *	111 ± 29	236 ± 27	ND	ND	ND		
			C	153 ± 29	170 ± 27	130 ± 28	80 ± 18 *	32 ± 8	90 ± 10					
	F +	5	S	607 ± 17	596 ± 70	446 ± 16	364 ± 55 *	161 ± 2	232 ± 17					
		C	204 ± 45	163 ± 15	187 ± 49	73 ± 16 *	29 ± 5	89 ± 6						
	M	5	S	529 ± 46	539 ± 60	421 ± 46	330 ± 55 *	108 ± 3	208 ± 8					
		C	213 ± 75	215 ± 33	179 ± 27	133 ± 13 *	34 ± 2	82 ± 10						
Mai 94	F	5	S	374 ± 36	727 ± 53 $\diamond$	338 ± 34 *	585 ± 34 $\diamond$	42 ± 4 *	142 ± 30 *	ND	ND	ND		
			C	192 ± 33	190 ± 60	173 ± 22	108 ± 11	19 ± 2 *	82 ± 14					
	M	5	S	367 ± 36	746 ± 35 $\diamond$	327 ± 35 *	611 ± 21 $\diamond$	40 ± 3 *	135 ± 22 *					
		C	155 ± 14	182 ± 20	136 ± 16	105 ± 13	19 ± 2 *	77 ± 10						
Octobre 94	F +	7	S	531 ± 19		406 ± 13		124 ± 13	587 ± 16	447 ± 16	135 ± 19	135 ± 19		
			C	150 ± 16		93 ± 15		57 ± 8	202 ± 9	135 ± 9	95 ± 11	95 ± 11		
	M	9	S	527 ± 19		407 ± 13		120 ± 13	582 ± 13	446 ± 13	136 ± 20	136 ± 20		
		C	149 ± 14		90 ± 14		59 ± 6	204 ± 6	204 ± 6	139 ± 15	97 ± 10	97 ± 10		
Juin 95	F	1	S						480	601	309	470	180	117
			C	ND	ND	ND	ND	ND	210	174	158	109	56	77
	M	2	S						411 ± 9	591 ± 35	262 ± 8	455 ± 21	148 ± 7	120 ± 8
		C							161 ± 5	169 ± 17	123 ± 10	104 ± 9	55 ± 9	73 ± 19
Octobre 95	F -	1	S						487	584	410	489	83	96
			C						90	175	141	125	52	46
	F +	1	S	ND	ND	ND	ND	ND	471	582	397	490	90	91
		C						181	162	153	121	41	40	
	M	3	S						473 ± 31	586 ± 25	391 ± 31	489 ± 33	84 ± 17	101 ± 20
		C							189 ± 31	169 ± 33	145 ± 26	130 ± 27	54 ± 10	41 ± 17

\* significativement plus faible au seuil 5%

$\diamond$  significativement plus fort au seuil 5%



**Tableau 13** : Tableau récapitulatif des différentes activités antioxydantes mesurées au cours des différentes campagnes d'échantillonnage dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites (C) obtenues après centrifugation à 12000g des homogénats de glandes digestives (GD) et de branchies (Br) d'*Unio tumidus*.

Les activités des glutathion peroxydases et réductase sont exprimées en nmoles NADPH/min/mg protéines, les activités catalasiques sont exprimées en  $\mu$ moles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg protéines.

Campagne	Sexe	n	=	GPx totale		Se GPx		GPx Se ind.		GRd		Catalase	
				GD	Br	GD	Br	GD	Br	GD	Br	GD	Br
Octobre 93	F -	4	S	99 ± 15	62 ± 4 *	72 ± 14	48 ± 7 *	27 ± 3	16 ± 2	45 ± 4	51 ± 3	126 ± 18	29 ± 5 *
			C	63 ± 6	26 ± 2 *	48 ± 5	23 ± 2 *	15 ± 2	3 ± 1	36 ± 2	10 ± 2	689 ± 41	121 ± 30 *
	F +	5	S	99 ± 13	59 ± 5 *	70 ± 9	53 ± 5 *	29 ± 5	5 ± 1	48 ± 3	50 ± 7	132 ± 3	22 ± 4 *
			C	69 ± 10	32 ± 3 *	54 ± 12	23 ± 4 *	15 ± 2	8 ± 1	34 ± 5	13 ± 3	711 ± 88	109 ± 36 *
	M	5	S	96 ± 16	63 ± 7 *	65 ± 12	60 ± 6	31 ± 5	3 ± 1	44 ± 2	46 ± 4	127 ± 17	30 ± 6 *
			C	62 ± 12	35 ± 3 *	45 ± 15	29 ± 2 *	17 ± 2	6 ± 1	33 ± 2	10 ± 1	688 ± 98	133 ± 33 *
Mai 94	F	5	S	101 ± 3	63 ± 4 *	74 ± 3	57 ± 4 *	27 ± 3	6 ± 2 *	36 ± 3	44 ± 2 *	191 ± 33	16 ± 4 *
			C	98 ± 6	41 ± 5 *	73 ± 2	36 ± 8 *	25 ± 6	5 ± 2 *	34 ± 3	16 ± 2 *	693 ± 71	49 ± 4 *
	M	5	S	94 ± 5	64 ± 3 *	74 ± 5	57 ± 3 *	21 ± 2	7 ± 1 *	36 ± 2	46 ± 1 *	174 ± 36	16 ± 3 *
			C	80 ± 5	44 ± 3 *	65 ± 3	38 ± 2 *	15 ± 3	6 ± 1 *	33 ± 2	18 ± 2 *	627 ± 114	48 ± 4 *
Octobre 94	F +	7	S	99 ± 3		64 ± 4		26 ± 3		52 ± 4		168 ± 17	
			C	77 ± 5		63 ± 5		14 ± 3		42 ± 4		649 ± 27	
	M	9	S	91 ± 5		65 ± 4		26 ± 5		49 ± 3		175 ± 18	
			C	76 ± 3		61 ± 4		15 ± 3		41 ± 2		693 ± 22	
Juin 95	F	1	S	155	124	109	94	39	31	69	44	170	94
			C	69	78	40	62	20	15	50	46	707	313
	M	2	S	134 ± 13	120 ± 21	98 ± 5	81 ± 8	32 ± 8	35 ± 11	60 ± 8	42 ± 2	152 ± 21	111 ± 9
			C	60 ± 4	76 ± 14	43 ± 8	62 ± 5	18 ± 6	15 ± 6	47 ± 4	53 ± 10	639 ± 47	341 ± 24
Octobre 95	F -	1	S	119	88	83	42	29	32	60	55	116	15
			C	54	51	43	29	14	21	47	43	646	147
	F +	1	S	107	86	81	40	27	33	64	36	107	17
			C	60	44	49	28	15	23	48	32	652	115
	M	3	S	113 ± 17	98 ± 10	84 ± 18	61 ± 6	29 ± 6	30 ± 7	62 ± 7	35 ± 3	120 ± 14	16 ± 5
			C	51 ± 12	49 ± 5	40 ± 12	35 ± 4	14 ± 9	20 ± 10	50 ± 8	33 ± 5	632 ± 78	175 ± 23

\* significativement plus faible au seuil 5%



Dans la perspective d'étudier la réponse des systèmes antioxydants chez les invertébrés d'eau douce *Unio tumidus*, il était nécessaire d'optimiser les techniques de dosages de ces paramètres ainsi que les conditions de fractionnement subcellulaire des organes.

- Nous avons choisi de mesurer les activités antioxydantes sur les fractions plutôt que sur homogénat total afin de déterminer une éventuelle différence de sensibilité des isoenzymes présentes dans les différents compartiments intracellulaires et d'être en mesure de détecter des effets s'exerçant spécifiquement sur les organites.

Le protocole de fractionnement que nous avons retenu préserve la structure des organites intracellulaires. L'activité catalasique normalement localisée dans les peroxisomes reflète le degré d'altération des organites intracellulaires au cours du fractionnement et nous a servi d'indicateur lors de l'optimisation du protocole de fractionnement subcellulaire. L'intégrité des organites intracellulaires et la qualité de la séparation ont été vérifiées en microscopie électronique.

Une fois les conditions de fractionnement subcellulaires et les techniques analytiques optimisées, nous avons évalué les activités antioxydantes basales des systèmes antioxydants en fonction des paramètres physiologiques et de la saison.

Les campagnes d'échantillonnage d'octobre 1993, de mai et d'octobre 1994 ont été réalisées sur le site témoin 1. Cet étang est devenu plus fréquenté en l'espace de quelques mois, ce qui représentait un risque de contamination. Nous avons donc préféré échantillonner les témoins en juin et octobre 1995 sur le site 2, resté sauvage.

La comparaison des deux populations correspondant aux sites 1 et 2 n'a pas fait l'objet d'une étude en soi, les bivalves prélevés sur le site 2 ayant servi aux études de transfert. Il est possible cependant de comparer les activités trouvées chez les témoins à la suite de ces études à celles des bivalves prélevés sur le site 1 en 1993 et 1994.

Les valeurs obtenues pour les témoins des deux sites ont été rapportées sur les tableaux récapitulatifs 13 et 14.

Compte tenu des petits effectifs des individus témoins de juin et octobre 1995, l'étude statistique est difficile. Il apparaît cependant que les activités spécifiques et la répartition intracellulaire des enzymes dans les glandes digestives et les branchies des deux populations sont comparables dans l'ensemble. Les différences concernent : (1) l'activité spécifique de la glutathion réductase un peu plus élevée dans la population 2 (juin et octobre 1995) et (2) l'activité catalasique des branchies nettement supérieure au printemps (juin 1995) chez les individus prélevés sur le site 2 par rapport au site 1 pour la même période (mai 1994).

Il semblerait que l'activité glutathion peroxydase sélénium-dépendante soit globalement supérieure au niveau cytosolique dans la population 2 ; toutefois, l'activité globale est identique (tableau 14).

**Tableau 14 : Tableau récapitulatif des activités antioxydantes totales mesurées au cours des différentes campagnes d'échantillonnage dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites (C) obtenues après centrifugation à 12000g des homogénats de glandes digestives (GD) et de branchies (Br) d'*Unio tumidus*.**

Les activités des glutathion peroxydases et réductase sont exprimées en nmoles NADPH/min/g tissu, les activités catalasiques sont exprimées en  $\mu$ moles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/g tissu.

Campagne	n	=	GPx totale		Se GPx		GPx Se ind.		GRd		Catalase	
			GD	Br	GD	Br	GD	Br	GD	Br	GD	Br
Mai 94	10	S	260 ± 12	123 ± 12	225 ± 10	95 ± 9	40 ± 5	28 ± 5	220 ± 12	107 ± 15	223 ± 20	66 ± 6
		C	93 ± 10	115 ± 15	70 ± 6	92 ± 10	23 ± 6	22 ± 4	66 ± 6	65 ± 25	831 ± 45	215 ± 10
Octobre 94	16	S	270 ± 12		226 ± 15		46 ± 6		230 ± 15		212 ± 15	
		C	95 ± 10		72 ± 6		25 ± 5		70 ± 10		810 ± 36	
Juin 95	3	S	280 ± 21	144 ± 18	224 ± 19	92 ± 6	66 ± 10	54 ± 10	230 ± 20	112 ± 5	217 ± 15	140 ± 10
		C	91 ± 10	120 ± 10	52 ± 6	85 ± 5	40 ± 10	35 ± 5	75 ± 10	86 ± 8	886 ± 30	540 ± 33
Octobre 95	5	S	290 ± 10	150 ± 14	228 ± 12	90 ± 7	59 ± 8	47 ± 9	241 ± 13	108 ± 9	210 ± 20	110 ± 12
		C	88 ± 6	115 ± 8	55 ± 9	76 ± 8	32 ± 6	35 ± 7	70 ± 7	88 ± 6	853 ± 22	446 ± 14

Les taux de glutathion sont exprimés en nmoles glutathion/g tissu.

ND = Non Déterminé.

Campagne	n	=	GSH + GSSG		GSH		GSSG		GSH + GSSG		GSH		GSSG	
			GD	Dosage par Br	GD	la méthode classique au Br	GD	DTNB Br	GD	Dosage Br	GD	par la méthode HPLC GD	GD	GD
Mai 94	10	S	553 ± 40	965 ± 50	500 ± 34	780 ± 30	53 ± 10	185 ± 35						
		C	270 ± 23	317 ± 20	238 ± 27	218 ± 18	32 ± 5	99 ± 14			ND		ND	
Octobre 94	16	S	770 ± 17		630 ± 17		140 ± 17		850 ± 30		660 ± 30		186 ± 23	
		C	220 ± 12		150 ± 15		66 ± 10		340 ± 20		244 ± 19		93 ± 6	
Juin 95	3	S							860 ± 30	1010 ± 40	670 ± 21	824 ± 20	210 ± 15	212 ± 20
		C	ND		ND		ND		336 ± 17	340 ± 30	266 ± 17	244 ± 20	75 ± 10	90 ± 10
Octobre 95	5	S							831 ± 31	1026 ± 25	660 ± 21	830 ± 23	160 ± 17	202 ± 18
		C	ND		ND		ND		350 ± 25	338 ± 23	260 ± 16	250 ± 17	85 ± 10	86 ± 11

Au vu de ces premières constatations, il apparaît qu'une étude comparative plus poussée des deux sites serait intéressante. Les différences enregistrées entre les populations témoins de sites différents, même si elles ne sont pas majeures, justifient les études de transfert d'une population homogène d'individus pour l'étude de l'impact de sources de pollution plutôt que la comparaison de populations autochtones exposées à ces polluants.

L'ensemble des résultats permet de tirer les conclusions suivantes quant à l'activité et la répartition des systèmes antioxydants étudiés dans les glandes digestives et les branchies d'*Unio tumidus*, tous sites confondus :

- \* la glutathion peroxydase sélénium-dépendante est répartie entre le cytosol et les organites, globalement dans un rapport 3/1 pour la glande digestive et 1/1 pour les branchies. Les mitochondries constituent vraisemblablement une localisation majoritaire de l'enzyme mesurée dans la fraction des organites, en particulier au niveau branchial. Cependant on ne peut exclure une localisation lysosomiale et peroxysomale qui resterait à évaluer.

Dans les cellules animales, la répartition est de l'ordre 2/1 dans les hépatocytes (Chance *et al.*, 1979 ; Mannervik, 1985).

Les activités spécifiques chez *Unio tumidus* sont plus élevées dans la glande digestive que dans les branchies. Il serait intéressant de voir si elles correspondent à des isoenzymes différentes.

L'activité glutathion peroxydase sélénium-indépendante est nettement plus faible que la précédente et représente moins du quart de l'activité glutathion peroxydase totale dans les glandes digestives et les branchies. Son activité spécifique est également plus faible. Cette enzyme est assimilée à une glutathion transférase qu'on pourrait s'attendre à trouver dans la fraction cytosolique au niveau du réticulum endoplasmique. Chez *Unio tumidus*, elle est également présente dans les organites, en proportion non négligeable au niveau branchial,

- \* l'activité glutathion réductase présente une répartition proche de celle de la glutathion peroxydase sélénium-dépendante, majoritairement cytosolique. Toutefois l'activité spécifique est quasiment équivalente dans la fraction des organites,

- \* l'activité catalasique comme chez les mammifères, est retrouvée majoritairement dans la fraction des organites, logiquement peroxisomale (Chance *et al.* ; 1979 ; Aebi, 1984 ; Clairbone, 1985 ; Del Maestro & Mc Donald, 1987),

- \* la répartition cellulaire du glutathion chez les bivalves semble différente de celle des cellules animales : 30% du glutathion sont retrouvés dans la fraction des organites alors que chez les mammifères ce pourcentage n'excède pas 15%. Chez *Unio tumidus*, 80% du glutathion est sous forme réduite. Nous avons trouvé une proportion de glutathion oxydé plus importante que celle donnée pour les cellules animales, où elle est de l'ordre de 5% (Akerboom & Sies, 1981 ; Anderson, 1985 ; Deleve & Kaplowitz, 1991). Cette différence ne résulte pas d'un problème analytique et nous avons vérifié que le glutathion réduit ne s'oxydait pas lors de la préparation et de l'analyse des échantillons.

- Les données de la littérature montrent que les facteurs climatiques et l'âge des individus ont une influence sur les activités enzymatiques antioxydantes. Viarengo *et al.* (1990) ont montré que dans les glandes digestives de *Mytilus edulis* les activités glutathion peroxydases totale et sélénium-dépendante ainsi que les activités catalasiques diminuaient avec l'âge des bivalves. Les mêmes auteurs (1991) ont montré que les taux de glutathion et les activités glutathion peroxydase sélénium-dépendante et catalase variaient au cours de l'année. Pour ces trois paramètres, ils ont observé une diminution des activités dès l'automne jusqu'en février, suivie d'une augmentation jusqu'en été avec un maximum en mai.

Dans cette étude, pour des raisons de faisabilité, nous n'avons étudié, que deux saisons : l'automne (octobre) et le printemps (mai-juin). Nous n'avons pas étudié l'influence de l'âge des bivalves sur les paramètres antioxydants, car les méthodes d'estimation de l'âge chez ces organismes restent confuses et imprécises. Nous nous sommes cependant efforcés de toujours travailler avec des organismes de taille équivalente comprise entre 6 et 7 cm de long. Il est possible que l'âge explique des variations enregistrées, celles des l'activité catalasique par exemple.

Nos résultats ont montré que les activités enzymatiques et les taux de glutathion ne se semblaient pas influencés par le sexe des individus, ni par l'état physiologique des femelles, en période de reproduction ou non. Ribera *et al.* (1989) ont obtenu des résultats similaires sur glandes digestives et branchies de moules marines *Mytilus galloprovincialis* prélevées en octobre.

En ce qui concerne l'influence des conditions climatiques sur les divers paramètres mesurés, nous avons montré qu'en automne les activités antioxydantes étaient stables alors qu'elles étaient plus variables au printemps. Les variations concernaient l'activité catalasique branchiale essentiellement. Viarengo *et al.* (1991) avaient trouvé pour l'activité catalasique des différences importantes entre les mois de février et de mai. En hiver, les niveaux peu élevés, peuvent être dus à un changement dans le métabolisme des bivalves à cause de la disponibilité moindre de la nourriture et au phénomène de maturation des gonades. Solé *et al.* (1995) ont montré que la ponte chez *Mytilus galloprovincialis* entraînait une augmentation des activités glutathion peroxydase sélénium-dépendante et catalase en mars-avril.

La ponte et la disponibilité de la nourriture semblent être des facteurs importants susceptibles de modifier les activités enzymatiques antioxydantes. Nous n'avons pas pu réaliser d'échantillonnage pendant les mois d'hiver (décembre à février) compte tenu de notre charge de travail. Lors des prélèvements de mai et juin, les bivalves *Unio tumidus* ont déjà expulsé leurs larves : nous n'avons donc pas pu évaluer l'impact de la ponte sur les activités antioxydantes mais ceci nous a permis de nous affranchir d'une influence éventuelle.

**Tableau 15** : Comparaison des activités antioxydantes et des taux de glutathion relevés dans la littérature concernant les travaux sur foies de poissons.  
 SeGPx : glutathion peroxydase sélénium-dépendante, GRd : glutathion réductase, GSH+GSSG : glutathion total, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé.

ESPECE ETUDIEE	GPx totale nmoles NADPH par mg protéines par g tissu frais	SeGPx nmoles NADPH par mg protéines par g tissu frais	GRd nmoles NADPH par mg protéines par g tissu frais	Catalase $\mu$ moles H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> par mg protéines par g tissu frais	GSH+GSSG nmoles GSH par mg protéines par g tissu frais	GSH nmoles GSH par mg protéines par g tissu frais	GSSG nmoles GSSG par mg protéines par g tissu frais	AUTEURS
<b>Poissons marins</b>								
Maquereau	1020	/	/	9003	/	/	/	Aknes & Njaa, 1981
Colin	/	/	/	6135	/	/	/	
Limande ( <i>Limanda limanda</i> )	/	4,9 ± 0,4	/	8870 ± 80	/	/	/	Livingstone <i>et al.</i> , 1993
Mullet ( <i>Mugil sp.</i> )	26,5 ± 1,4	7,6 ± 1,1	19,7 ± 4,1	278,9 ± 12,7	1090 ± 367	/	50 ± 5	Rodriguez-Ariza <i>et al.</i> , 1993
<b>Poissons d'eau douce</b>								
Truite arc-en-ciel ( <i>Oncorhynchus myskiss</i> )	15 ± 1,6 436	/	/	25,7 ± 0,8 1173	/	/	/	Babo & Vasseur, 1992
Poisson chat ( <i>Ictalurus punctatus</i> )	/	867 ± 93	6,52 ± 0,69	/	991 ± 83	/	/	Hasspieler <i>et al.</i> , 1994
Poisson tête boule ( <i>Brown bullhead</i> )	/	3090 ± 307	0,50 ± 19	/	534 ± 46	/	/	

**Tableau 16** : Comparaison des activités antioxydantes et des taux de glutathion mesurés sur glandes digestives (GD) et branchies (Br) d'*Unio tumidus* au cours de notre étude expérimentale avec celles relevées dans la littérature concernant les travaux sur glandes digestives et/ou branchies de bivalves.  
 SeGPx : glutathion peroxydase sélénium-dépendante, GSH+GSSG : glutathion total, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, M : individus mâles, F : individus femelles.

ESPECE ETUDIEE	GPx totale nmoles NADPH par mg protéines par g tissu frais	SeGPx nmoles NADPH par mg protéines par g tissu frais	GRd nmoles NADPH par mg protéines par g tissu frais	Catalase $\mu$ moles H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> par mg protéines par g tissu frais	GSH+GSSG nmoles GSH par mg protéines par g tissu frais	GSH nmoles GSH par mg protéines par g tissu frais	GSSG nmoles GSSG par mg protéines par g tissu frais	AUTEURS	
<b>Bivalves marins</b>	/	<b>123 ± 18</b>	/	<b>1100 ± 100</b>	/	/	/	Livingstone <i>et al.</i> , 1990	
GD <i>Mytilus edulis</i>	/	<b>entre 15 et 95</b>	/	<b>entre 1200 et 3200</b>	/	/	/	Viarengo <i>et al.</i> , 1991	
	19 ± 3,6 <b>1094 ± 171</b>	7 ± 1 <b>406 ± 61</b>	41 ± 2 <b>2408 ± 90</b>	71 ± 2 <b>4160 ± 240</b>	/	/	/	Winston <i>et al.</i> , 1988	
GD <i>Mytilus galloprovincialis</i>	7,5 ± 2	11 ± 2	44 ± 2	45 ± 5	7,5 ± 1 <b>1276 ± 7</b>	/	/	Regoli & Principato, 1995	
Br	3 ± 1	8,1 ± 3	non détectable	2 ± 1	6,3 ± 1 <b>290 ± 8</b>	/	/		
GD	/	/	/	/	<b>185 ± 5</b> (M) <b>286 ± 18</b> (F)	/	/	Ribera <i>et al.</i> , 1989	
Br	/	/	/	/	<b>58 ± 2</b> (M) <b>38 ± 3</b> (F)	/	/		
GD	/	entre 2,6 et 3,6	/	<b>entre 2500 et 3700</b>	/	/	/	Solé <i>et al.</i> , 1995	
GD	/	/	/	/	/	<b>entre 200 et 550</b>	/	Viarengo <i>et al.</i> , 1991	
<i>Geukensia demissa</i>	/	/	/	15 ± 1	/	2345 ± 76	/	Wenning & Di Giulio, 1988	
GD	/	/	/	24 ± 2	/	<b>1880 ± 190</b>	/	Wenning <i>et al.</i> , 1988	
<b>Bivalves d'eau douce</b>									
<i>Unio tumidus</i>	GD S	113 ± 12	83 ± 14	62 ± 6	116 ± 11	477 ± 25	396 ± 28	85 ± 13	nos résultats (octobre 1995)
	GD C	<b>290 ± 10</b>	<b>235 ± 15</b>	<b>244 ± 11</b>	<b>210 ± 15</b>	<b>815 ± 22</b>	<b>665 ± 20</b>	<b>145 ± 13</b>	
		53 ± 10	43 ± 11	49 ± 7	639 ± 57	187 ± 26	146 ± 19	49 ± 8	
		<b>82 ± 7</b>	<b>46 ± 4</b>	<b>77 ± 8</b>	<b>871 ± 29</b>	<b>336 ± 12</b>	<b>255 ± 15</b>	<b>83 ± 6</b>	
	Br S	94 ± 4	53 ± 3	39 ± 4	16 ± 3	585 ± 19	489 ± 23	98 ± 14	
	Br C	<b>143 ± 13</b>	<b>85 ± 5</b>	<b>113 ± 8</b>	<b>108 ± 9</b>	<b>1040 ± 29</b>	<b>842 ± 29</b>	<b>206 ± 10</b>	
	48 ± 4	32 ± 2	35 ± 3	158 ± 12	169 ± 24	127 ± 18	42 ± 11		
	<b>119 ± 9</b>	<b>72 ± 6</b>	<b>83 ± 6</b>	<b>442 ± 10</b>	<b>356 ± 19</b>	<b>241 ± 12</b>	<b>89 ± 9</b>		



- Les études de terrain entreprises pour évaluer la réponse des paramètres antioxydants aux polluants ont été réalisées par transfert de moules témoins de milieux sains (sites témoins) vers des milieux plus contaminés à étudier.

La mise en cage des bivalves a facilité ces opérations. Nous avons vérifié que la mise en cage n'induisait pas de stress des bivalves, d'autant que les cages lestées s'enfoncent progressivement dans un sédiment meuble. Ceci facilitait aussi l'interprétation des résultats, l'effet cage ne pouvant pas être incriminé dans les réponses observées entre sites.

Dans une étude préliminaire, nous avons placé des bivalves en amont et en aval d'une cokerie. Les réponses des paramètres étudiés étaient d'autant plus marquées que les bivalves étaient proche de la source de pollution. Les principaux effets, tant au niveau hépatique que branchial, concernaient les activités glutathion peroxydase sélénium-dépendante et glutathion réductase ainsi que les taux de glutathion réduit qui étaient diminués.

Cependant en l'absence de données physicochimiques sur les niveaux de contamination des sédiments au moment de l'étude, il est difficile de pousser plus en avant l'interprétation des résultats.

La sensibilité de ces trois paramètres a été confirmée lors d'une seconde étude réalisée 4 mois plus tard sur les mêmes sites. Les bivalves ont été exposés pendant 15 et 30 jours afin d'évaluer un éventuel phénomène d'adaptation ou de compensation des systèmes biologiques. Les résultats ont été synthétisés dans le tableau 18 où sont reportés les taux d'inhibition ou d'augmentation par rapport aux témoins, pour les activités spécifiques et les activités par gramme de tissu. Afin de simplifier l'interprétation globale des résultats, les pourcentages de modification par rapport aux témoins sont exprimés d'après une échelle d'indices détaillée dans le tableau 17.

Cette étude prolongée jusqu'à 30 jours souligne les points suivants :

- \* la sensibilité des systèmes antioxydants des branchies supérieure à celle des glandes digestives : la diminution d'activité des enzymes et celle du glutathion réduit est plus intense et plus rapide au niveau branchial. Elle se manifeste dès J15 au site B,

- \* dans les glandes digestives, la réponse de la glutathion réductase serait plus précoce que celle des autres enzymes antioxydantes,

\* si l'analyse des contaminants des sédiments des sites B et C ne mettait pas en évidence de différences majeures, le profil de réponse des bivalves en C se distingue de celui des individus en B :

- le taux d'inhibition des systèmes antioxydants des glandes digestives est plus marqué en C,
- après 30 jours d'exposition, on observe une induction des activités glutathion peroxydase sélénium-indépendante et catalasique associées à une augmentation du glutathion oxydé,
- l'induction de cette activité glutathion peroxydasique était également observée à J15 dans les glandes digestives. Il semblerait qu'elle résulte de la synthèse d'une isoenzyme très active, si l'on en juge par l'activité spécifique augmentée alors que l'activité tissulaire globale reste faible. Cette enzyme pourrait être impliquée dans la conjugaison et l'élimination des polluants du site,

\* l'inhibition de l'activité glutathion réductase chez les individus en B paraît s'accompagner d'une diminution de la synthèse spécifique de cette enzyme. En effet, le taux d'inhibition de cette enzyme chez les moules du site B par rapport aux témoins est nettement plus marquée si l'on considère l'activité tissulaire globale (activité par gramme de tissu) plutôt que l'activité spécifique. Ceci est observé à la fois dans les branchies et dans les glandes digestives,

\* les pourcentages d'inhibition des paramètres chez les individus contaminés par rapport aux témoins sont en général un peu plus faibles quand les valeurs exprimées par gramme de tissu, ce qui peut s'expliquer par le fait que les pourcentages d'inhibition établis à partir des activités spécifiques intègrent également une diminution de la synthèse protéique non spécifique.

La sensibilité des trois paramètres - glutathion peroxydase sélénium-dépendante, glutathion réductase et glutathion réduit - a été confirmée lors des essais d'intoxication des bivalves au laboratoire avec le cuivre et le thiram.

Le cuivre entraîne une inhibition de l'activité glutathion réductase ainsi qu'une déplétion en glutathion réduit, accompagnée d'une augmentation du glutathion oxydé. L'augmentation du glutathion oxydé peut être expliquée par l'inhibition de l'activité glutathion réductase qui n'assure plus son rôle de régénération du glutathion réduit, mais peut également être due au rôle oxydant du cuivre (Christie & Costa, 1984).



Viarengo *et al.* (1988) ont mis en évidence une diminution du glutathion réduit chez *Mytilus edulis* exposé pendant 6 jours une concentration en cuivre de 40  $\mu\text{g/l}$  ; cette déplétion en glutathion était associée à des effets de lipoperoxydation importants chez la moule marine, ce qui tend à prouver que si le déficit en glutathion ne peut pas être comblé, il y aura apparition de dommages cellulaires importants.

Lorsque les toxiques ont été utilisés en mélange, nous avons noté une additivité des effets se traduisant par une diminution importante des activités glutathion réductase et glutathion peroxydase sélénium-dépendante et du glutathion réduit, associée à des phénomènes de lipoperoxydation.

L'inhibition d'activité associée aux altérations physiologiques observées dans ces essais permettrait de considérer ces paramètres comme des biomarqueurs capables de refléter une toxicité.

D'autres études sur des sites présentant un type de pollution différent devront être menées pour vérifier cette hypothèse.

Au de l'ensemble de ces résultats, il semble que les systèmes antioxydants peuvent être plus que de simples indicateurs de contamination du milieu, leur déplétion pouvant traduire des effets de toxicité induits par les contaminants.

Les activités **glutathion réductase** et **glutathion peroxydase sélénium-dépendante** et le **glutathion** semblent sensibles et répondre rapidement à la présence de contaminants et peuvent ainsi servir d'éléments de diagnostic intéressants de l'état précaire des individus. Cependant, ces paramètres ne peuvent être interprétés de façon dissociée. En effet, une déplétion en glutathion réduit peut résulter d'une mobilisation de ce cofacteur par les glutathion transférases pour l'élimination de métabolites toxiques et pas nécessairement d'une effet direct des xénobiotiques sur le glutathion . Elle sera sans conséquence si la synthèse du glutathion est accrue par ailleurs. La connaissance de l'ensemble des enzymes impliquées dans le métabolisme du glutathion est indispensable pour pouvoir interpréter une éventuelle diminution de ce cofacteur.

L'étude des relations entre les niveaux de contaminations, les réponses des systèmes antioxydants et leurs effets sur les organismes est indispensable pour connaître la signification d'une augmentation ou d'une inhibition d'activité en terme de toxicité à plus ou moins long terme.

Dans cette étude, les impacts au niveau génétiques n'ont pas été étudiés. Il est pourtant très important de pouvoir expliquer plus en détail l'inhibition ou l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes. Par exemple dans le cas de l'inhibition de l'activité glutathion réductase il serait intéressant de savoir si elle résulte de l'inhibition de la transcription des gènes impliqués dans la synthèse de cette enzyme, ou plutôt d'un effet au niveau post-transcriptionnel.

## **VI. CONCLUSION**

Notre étude consistait à déterminer si les systèmes antioxydants pouvaient être utilisés comme biomarqueurs d'exposition ou de toxicité chez des individus exposés à des xénobiotiques dans l'environnement. Nous sommes intéressés plus particulièrement aux activités des glutathion peroxydases, glutathion réductase et catalase associées aux mesures des taux de glutathion réduit et oxydé mesurés dans les glandes digestives et les branchies d'*Unio tumidus*, bivalve dulçaquicole.

Comme ces enzymes antioxydantes et le glutathion sont localisées dans des compartiments cellulaires différents, soit au niveau cytoplasmique, soit au niveau mitochondrial ou peroxysomal, nous avons choisi d'évaluer les niveaux de ces différents paramètres en fonction de leur localisation cellulaire. Pour ce faire, nous avons réalisé les différents dosages sur des fractions subcellulaires : le surnageant de centrifugation 12000g qui représente la fraction cytosolique et le culot de centrifugation 12000g dans lequel se retrouvent les mitochondries, les lysosomes et le peroxysomes.

Après avoir optimisé les méthodes de dosage des différents paramètres, nous avons optimisé le protocole de fractionnement des tissus ainsi que le mode de préparation et de conservation des organes. Nous avons retenu une homogénéisation douce des tissus à l'aide d'un potter manuel, dans du tampon phosphate 50 mM auquel sont ajoutés du PMSF (inhibiteur des sérines protéases) et un mélange sérine-borate (inhibiteur de la  $\gamma$ -glutamylcystéine transpeptidase, enzyme hydrolytique du glutathion réduit).

Les organes (glandes digestives et branchies) sont congelés dans l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$  immédiatement après prélèvement des individus.

A la suite de ces optimisations expérimentales, nous avons évalué les concentrations et les activités basales des différentes activités antioxydantes. Pour cela nous avons étudié l'impact des saisons, du sexe des individus et des conditions physiologiques des femelles sur les paramètres mesurés.

Nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives entre les individus mâles et femelles, ni entre les femelles qu'elles aient ou non des larves. Les saisons (printemps et automne) ne semblent pas influencer les paramètres antioxydants, sauf pour (i) l'activité glutathion réductase au niveau hépatique (ii) l'activité catalasique au niveau branchial qui sont toutes deux plus faibles au printemps qu'à l'automne.

Les activités antioxydantes ont des niveaux globalement plus faibles dans les branchies que dans les glandes digestives. En particulier les activités catalase et glutathion peroxydase sélénium-indépendante qui sont bien faibles au niveau branchial.

Lorsque les individus sont soumis à un stress chimique, au laboratoire ou *in situ*, nous avons remarqué que les activités glutathion réductase, glutathion peroxydase sélénium-dépendante et les taux de glutathion réduit semblaient sensibles et répondre rapidement à la présence de polluants. Ils pourraient donc constituer des indicateurs intéressants de l'état précaire des individus.

Ces trois paramètres étaient fortement diminués dans les branchies et dans les glandes digestives lors de l'intoxication des individus au laboratoire avec du cuivre et du thiram, mais également lors des études de terrain où ils étaient diminués chez les individus proche du rejet de la cokerie (étude préliminaire de terrain) ainsi que chez les bivalves transférés sur le site fortement pollué par les HAPs et les PCBs (seconde étude de terrain).

La déplétion de ces activités antioxydantes semblent traduire des effets de toxicité induits par les contaminants et pourraient être utilisés comme biomarqueurs de toxicité. Mais il est indispensable d'étudier les relations entre les réponses des systèmes antioxydants et les niveaux de contaminations pour pouvoir à plus long terme connaître la signification d'une induction ou d'une inhibition de ces systèmes.

Nous n'avons étudié *in situ* qu'un seul type de pollution à savoir une contamination par les HAPs et les PCBs. Il est nécessaire d'étudier la réponse des activités antioxydantes face à un type de pollution différent afin de s'assurer que les paramètres apparaissant les plus sensibles lors de cette première étude le soient en d'autres circonstances.

D'autre part, il serait intéressant d'approfondir sur un plan plus fondamental les réponses enzymatiques obtenues afin de déterminer si les diminutions d'activités résultent d'une action des toxiques sur l'enzyme ou au niveau de la régulation de sa synthèse, soit directement au niveau de la transcription des gènes impliqués dans la synthèse de l'enzyme ou d'un effet au niveau post-transcriptionnel.

**VII. REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

- AEBI H., 1984, Catalase *in vitro* in *Methods in enzymology*, PACKER L. (Eds), 105, 121-126 .
- AKERBOOM T.P.M. & SIES H., 1981, Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples in *Methods in enzymology*, JAKOBY W.B. (Eds), 77, 373-382.
- AKERBOOM T.P.M. & SIES H., 1990, Glutathione transport and its significance in oxidative stress in *Glutathione : metabolism and physiological functions*, VIÑA J. (Eds), 45-54.
- AKNES A. & NJAA L.R., 1981, Catalase, glutathione peroxydase and superoxide dismutase in different fish species, *Comparative biochemistry and physiology*, 69B, 893-896.
- ANDERSON M.E., 1985, Tissue glutathione in *CRC Handbook of methods for radical research*, 317-322.
- ANDERSON M.E., 1985, Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples in *Methods in enzymology*, MEISTER A. (Eds), 113, 548-555.
- BABIOR B.M., 1978, Oxygen dependent microbial killing by phagocytes, *New England Journal of Medicine*, 298, 659-668, 721-725.
- BABO S. & VASSEUR P., 1992, *In vitro* effects of Thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquatic toxicology*, 22, 61-68.
- BABSON J.R., ABELL N.S. & REED D.J., 1981, Protective role of the glutathione redox cycle against adriamycin-mediated toxicity in isolated hepatocytes, *Biochemical pharmacology*, 30 (16), 2299-2304.
- BABSON J.R. & REED D.J., 1978, Inactivation of glutathione reductase by 2-chloroethyl nitrosourea-derived isocyanates, *Biochemical and biophysical research communications*, 83 (2), 754-762.
- 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*, *Journal of Environmental Sciences and 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, *Aquatic toxicology*, 16, 311-320.
- BEERS R.F. & SIZER I.W., 1952, A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, *Journal of biological chemistry*, 195, 133-190.
- 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, *Biochemica and Biophysica Acta*, 876, 658-666.
- BEYER W., IMLAY J. & FRIDOVICH I., 1991, Superoxide dismutases, *Prog. Nucl. Ac. Res. Mol. Biol.*, 40, 221-253.
- BRADFORD M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.
- BRAMBLE L.A., BOARDMAN G.D., BEVAN D.R. & DIETRICH A.M., 1994, Rat liver mitochondrial and microsomal tests for the assessment of quinone toxicity, *Environmental toxicology and chemistry*, 13 (2), 307-316.

- BRAY T.M. & TAYLOR C.G., 1993, Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress, *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 71, 746-751.
- BURK R.F., PATEL K. & LANE J.H., 1982, Comparison of the direct and the coupled assay methods for glutathione peroxidase activity of rat liver, *Nutrition reports international*, 26 (98).
- BYCZKOWSKI J.L. & 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.
- CARLEBERG I. & MANNERVIK B., 1985, Glutathione reductase in *Methods in enzymology*, MEISTER E. (Eds), 113, 484-489.
- CARTAÑA J., ROMEU A. & AROLA L.L., 1992, Effects of copper, cadmium and nickel on liver and kidney glutathione redox cycle of rats (*Rattus sp.*), *Comparative biochemistry and physiology*, 101C (2), 209-213.
- CASINI A.F., POMPELLA A. & COMPORTI M., 1985, Liver glutathione depletion induced by bromobenzene, iodobenzene, and diethylmaleate poisoning and its relation to lipid peroxidation and necrosis, *American journal of pathology*, 118, 225-237.
- CHANCE B. & MAEHLY A.C., 1952, Assay of catalases and peroxidases in *Methods in enzymology*, COLOWICK S.P. & KAPLAN N.O. (Eds), 2, 764-775.
- CHANCE B., SIES H. & BOVERIS A., 1979, Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiological review*, 59, 527-589.
- 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 (6), 529-536.
- CHRISTIE N.T. & COSTA M., 1984, Review : *in vitro* assessment of the toxicity of metal compounds - IV. Disposition of metals in cells : interactions with membranes, glutathione, metallothionein and DNA, *Biological trace element research*, 6, 139-158.
- CLAIBORNE A., 1985, Catalase activity in *CRC Handbook of methods for radical research*, 283-295.
- COHEN G., DEMBIEC D. & MARCUS J., 1970, Measurement of catalase activity in tissue extracts, *Analytical biochemistry*, 34, 30-38.
- COMPORTI M., 1987, Glutathione depleting agents and lipid peroxidation, *Chemistry and physics of lipids*, 45, 143-169.
- COMPORTI M., MAELLARO E., DEL BELLO B. & CASINI A.F., 1991, Glutathione depletion : its effects on other antioxidant systems and hepatocellular damage, *Xenobiotica*, 21 (8), 1067-1076.
- COTGREAVE I.A., WEIS M., ATZORI L. & MOLDEUS P., 1990, Glutathione and protein function in *Glutathione : metabolism and physiological functions*, VIÑA J. (Eds), 155-176.
- DELEVE L.D. & KAPLOWITZ N., 1991, Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity, *Pharmacology & therapeutics*, 52, 287-305.
- DEL MAESTRO R. & MC DONALD W., 1987, Distribution of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in developing Rat brain, *Mechanisms of Age and Development*, 41, 29-38.
- DENEKE S.M. & FANBURG B.L., 1989, Regulation of cellular glutathione, *American journal of physiology*, 257, L163-L173.



- DENEKE S.M., LYNCH B.A. & FANBURG B.L., 1985, Transient depletion of lung glutathione by diethylmaleate enhances oxygen toxicity, *Journal of applied physiology*, 58 (2), 571-574.
- DHAUNSI G.S., SINGH I., ORAK J.K. & SINGH A.K., 1994, Antioxidant enzymes in ciprofibrate-induced oxidative stress, *Carcinogenesis*, 15 (9), 1923-1930.
- 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, *Aquatic toxicology*, 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*), *Comparative biochemistry and physiology*, 108C (1), 43-46.
- DODET B., 1991, La chasse aux radicaux libres oxygénés, *Biofutur*, 23-34.
- ESTERBAUER H., 1993, Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products, *American journal of clinical nutrition*, 57 (supplement), 779S-786S.
- ESTRELA J.M. & PALLARDÓ F.V., 1990, Role of glutathione in the regulation of protein synthesis and degradation in eukaryotes in *Glutathione : metabolism and physiological functions*, VIÑA J. (Eds), 177-185.
- FERARD J.F., VASSEUR P., DANOUX L. & LARBAIGT G., 1983, Application d'un test d'inhibition de luminescence bactérienne à l'étude toxicologique d'effluents complexes et de substances chimiques, *Revue française des sciences de l'eau*, 2, 221-237.
- FLOHE L. & GÜNZLER W.A., 1984, Assays of glutathione peroxidase in *Methods in enzymology*, PACKER L. (Eds), 105, 114-121.
- FLOHE L, GÜNZLER W.A. & LADENSTEIN R., 1976, Glutathione peroxidase in *Glutathione metabolism and function*, ARIAS I.M. & JAKOBI W.B. (Eds), 115-137.
- FRANK L. & MASSARO D., 1980, Oxygen toxicity, *The american journal of medicine*, 69, 117-126.
- FUJITA M., SANO M., TAKEDA K. & TOMITA I., 1993, Fluorescence detection of glutathione S conjugate with aldehyde high-performance liquid chromatography with post-column derivatization, *Analyst*, 118, 1289-1292.
- 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 (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, *Aquatic Toxicology*, 23, 155-168.
- GAMBLE S.C., GOLDFARB P.S., PORTE C. & LIVINGSTONE D.R., 1995, Glutathione peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*), *Marine environmental research*, 39, 191-195.
- GARCIA- ALFONSO C., LOPEZ - BAREA J., SANZ P., REPETTO G. & REPETTO M., 1995, Stimulation of antioxidative enzymes by paraquat in cultured Vero cells, *Veterinary and human toxicology*, 37 (5) : 414-421.
- GRIFFITH O.W., 1981, Depletion of glutathione by inhibition of biosynthesis in *Methods in enzymology*, JAKOBY W.B. (Eds), 77, 59- 63.



- GRIFFITH O.W., 1985, Glutathione and glutathione disulphide in *Methods of enzymatic analysis*, BERGAMEYER H.U. & GRAß H. (Eds), 8 (3), 521-529.
- GÜNZLER W.A. & FLOHE L., 1985, Glutathione peroxidase in *CRC Handbook of methods for oxygen radical research*, 285-290.
- GUTTERIDGE J.M.C. & HALLIWELL B., 1993, Transition metal ions and antioxidant proteins in extracellular fluids, in *Atmospheric oxidation and antioxidants*, SCOTT G. (Eds), 3.
- HALLIWELL B., 1987, Oxidants and human disease : some news concepts, *FASEB journal*, 1, 358-
- HALLIWELL B. & GUTTERIDGE J.M.C., 1989, Free radicals in Biology and medicine, 2nd edition.
- HARRIS E.D., 1992, Regulation of antioxidant enzymes, *FASEB Journal*, 6, 2675-2683.
- 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 (*Ameriurus nebulosus*) to oxidative stress : a comparative study, *Aquatic toxicology*, 28, 53-64.
- HE P., YAMAOKA - KOSEKI S. & YASUMOTO K., 1994, Effect of paraquat administration on antioxidative enzyme activities and oxidative damage in the blood and liver of senescence-accelerated mice, *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 58 (1), 146-150.
- HEMELRAAD J., HOLWERDA D.A., HERWIG H.J. & ZANDEE D.I., 1990, Effects of cadmium in freshwater clams. III. Interaction with energy metabolism in *Anodonta cygnea*, *Archives of environmental contamination and toxicology*, 19, 699-703.
- HISSIN P.J. & HILF R., 1976, A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues, *Analytical biochemistry*, 74, 214-226.
- HUGUES H., JAESCHKE H. & MITCHELL J.R., 1990, Measurement of oxidant stress *in vivo* in *Methods in enzymology*, 186, 681-685.
- JAMALL I.S. & SMITH J.C., 1985, Effects of cadmium on glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and lipid peroxidation in the rat heart : a possible mechanism of cadmium cardiotoxicity, *Toxicology and applied pharmacology*, 80, 33-42.
- JOENJE H., 1989, Genetic toxicology of oxygen : a review, *Mutation research*, 219, 193-208.
- JOHANSSON M., & LENNGREN S., 1988, Determination of cysteine, glutathione and N-acetylcysteine in plasma by ion-pair reversed-phase liquid chromatography and post-column derivatization, *Journal of chromatography*, 432, 65-74.
- KANG Y.J., 1992, Exogenous glutathione decreases cellular cadmium uptake and toxicity, *Drug metabolism and disposition*, 20 (5), 714-718 .
- KAPPUS H., 1987, Oxidative stress in chemical toxicity, *Archives of Toxicology*, 60, 144-149.
- KELNER M.J. & ALEXANDER N.M., 1986, Inhibition of erythrocyte superoxide dismutase by diethyldithiocarbamate also results in oxyhemoglobin-catalyzed glutathione depletion and methemoglobin production, *The journal of biological chemistry*, 261 (4), 1636-1641.
- KELNER M.J. & BAGNELL R., 1990, Glutathione-dependent enzymes alone can produce paraquat resistance, *Free radical biology & medicine*, 9, 149-153.

- 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.
- KELNER M.J., BAGNELL R.D., UGLIK S.F., MONTOYA M.A. & MULLENBACH G.T., 1995, Heterologous expression of selenium-dependent glutathione peroxidase affords cellular resistance to paraquat, *Archives of biochemistry and biophysics*, 323 (1), 40-46.
- LAWRENCE R.A. & BURK R.F., 1976, Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver, *Biochemical and biophysical research communications*, 71 (4), 952-958.
- 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.
- LEMAIRE P., VIARENGO A., CANESI L. & LIVINGSTONE D.R., 1993, Prooxidant and antioxidant processes in gas gland and other tissues of cod (*Gadus morhua*), *Journal of Comparative Physiology B*, 163, 477-486.
- LEROY P., NICOLAS A., THIOUDELLET C., OSTER T., WELLMAN M. & SIEST G., 1993, Rapid liquid chromatographic assay of glutathione in cultured cells, *Biomedical chromatography*, 7, 86-89.
- LEROY P., NICOLAS A., WELLMAN M., MICHELET F., OSTER T. & SIEST G., 1993, Evaluation of *o*-Phthalaldehyde as bifunctional fluorogenic post-column reagent for glutathione in LC, *Chromatographia*, 36, 130-134.
- LIEBROSS R.H. & WETTERHAHN K.E., 1992, *In vivo* formation of chromium (V) in chick embryo liver and red blood cells, *Carcinogenesis*, 113 (11), 2113-2120.
- LIVINGSTONE D.R., ARCHIBALD S., CHIPMAN J.K. & MARSH J.W., 1992, Antioxidant enzymes in liver of dab *Limanda limanda* from the North Sea, *Marine ecology progress Series*, 91, 97-104.
- 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., GARCIA-MARTINEZ P. & WINSTON G.W., 1989, Menadione-stimulated oxyradical formation in digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L., *Aquatic toxicology*, 15, 213-236.
- LIVINGSTONE D.R., LEMAIRES P., MATTHEWS A.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 (11), 602-606.
- LIVINGSTONE D.R., LEMAIRES 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 (*Zostericessor ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice lagoon, Italy : biochemical studies, *Marine environmental research*, 39, 235-240.

- LOPEZ-BAREA J., BARCENA J.A., BOCANEGRA J.A., FLORINDO J., GARCIA-ALFONSO C., LOPEZ-RUIS A., MARTINEZ-GALISTEO E. & PEINADO J., 1990, Structure, mechanism, functions and regulatory properties of glutathione reductase in *Glutathione : metabolism and physiological functions*, VINA J. (Eds), 105-116.
- LOPEZ-TORRES M., GIL P. & DE QUIROGA G.B., 1988, Effect of hyperoxia acclimation on catalase and glutathione peroxidase activities and *in vivo* peroxidation products in various tissues of the frog *Rana ridibunda perezii*, *The journal of experimental zoology*, 248, 7-18.
- LOPEZ-TORRES M., PEREZ-CAMPO R., ROJAS C., CADENAS S. & BARJA G., 1993, Simultaneous induction of SOD, glutathione reductase, GSH, and ascorbate in liver and kidney correlates with survival during aging, *Free radical biology & medicine*, 15, 133-142.
- MAELLARO E., CASINI A.F., DEL BELLO B. & COMPORITI M., 1990, Lipid peroxidation and antioxidant systems in the liver injury produced by glutathione depleting agents, *Biochemical pharmacology*, 39 (10), 1513-1521.
- MARTIN J. & WHITE I.N.H., 1991, Fluorimetric determination of oxidized and reduced glutathione in cells and tissues by high-performance liquid chromatography following derivatization with dansyl chloride, *Journal of chromatography*, 56 B, 219- 225.
- MCCORD J.M., 1983, The superoxide free radical in biochemistry and pathophysiology, *Surgery*, 412-414.
- MCCORD J.M. & DAY E.D., 1978, Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron EDTA complex, *FEBS letters*, 86, 139-142.
- MCCORD J.M. & FRIDOVICH I., 1969, Superoxide dismutase : an enzymatic function for erythrocyte, *The journal of biological chemistry*, 244, 6049-6055.
- MARKLUND S.L., HOLME E. & HELLNER L., 1982, Superoxide dismutase in extracellular fluids, *Clinal and Chimal Acta*, 126, 41-51.
- MATHER-MIHAICH E. & DI GIULIO R.T., 1986, Antioxidant enzyme activities and malonaldehyde, glutathione and methemoglobin concentrations in channel catfish exposed to def and n-butyl mercaptan, *Comparative biochemistry and physiology*, 85C (2), 427-432.
- MEISTER A. & ANDERSON M.E., 1983, Glutathione, *Annual reviews of biochemistry*, 52, 711-760.
- MEISTER A. & TATE S.S., 1976, Glutathione and related  $\gamma$ -glutamyl compounds : biosynthesis and utilization, *Annual reviews of biochemistry*, 45, 559-604.
- MILLS G.C., 1957, Hemoglobin catabolism. I - Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown, *Journal of biological chemistry*, 229, 189-197.
- MORIARTY P.M., PICCIANO M.F., BEARD J.L. & REDDY C.C., 1995, Classical selenium-dependent glutathione peroxidase expression is decreased secondary to iron deficiency in rats, *Journal of nutrition*, 125, 293-301.
- MORIER-TEISSIER E., MESTDAGH N., BERNIER J.-L. & HENICHART J.-P., 1993, Reduced and oxidized glutathione ratio in tumor cells : comparison of two measurement methods using HPLC and electrochemical detection, *Journal of liquid chromatography*, 16 (3), 573-596.

MORINEAU G., AZOULAY M. & FRAPPIER F., 1989, Reaction of *o*-phthaldéhyde with amino acids and glutathione. Application to high-performance liquid chromatography determination, *Journal of chromatography*, 467, 209-216.

NEUSCHWANDER-TETRI B.A. & ROLL F.J., 1989, Glutathione measurement by high-performance liquid chromatography separation and fluorimetric detection of the glutathion-orthophthalaldehyde adduct, *Analytical biochemistry*, 179, 236-241.

NISHIMOTO M., LE EBERHART B.T., SANBORN H.R., KRONE C., VARANSI 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*), *Environmental toxicology and chemistry*, 14 (3), 461-469.

PAGLIA D.E. & VALENTINE W.N., 1967, Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *Journal of laboratory clinical medicine*, 70, 158-169.

PALMEIRA C.M., MORENO A.J. & MADEIRA V.M.C., 1994, Metabolic alterations in hepatocytes promoted by the herbicides paraquat, dinoseb and 2,4-D, *Archives of toxicology*, 68, 24-31.

PATEL B., CHANDY J.P. & PATEL S., 1990, Effect of mercury, selenium and glutathione on sulphhydryl levels and glutathione reductase in blood clam *Anadara granosa* (L), *Indian journal of marine sciences*, 19, 187-190.

PEAKALL D.B., 1994, Biomarkers : the way forward in environmental assessment, *Toxicology and ecotoxicology news*, 1 (2), 55-60.

PLUMMER J.L., SMITH B.R., SIES H. & BEND J.R., 1981, Chemical depletion of glutathione *in vivo* in *Methods in enzymology*, JAKOBY W.B. (Eds), 77, 50-59.

PORTE C., SOLE M., ALBAIGES J. & LIVINGSTONE D.R., 1991, Responses of mixed-function oxygenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus* sp. to organic pollution, *Comparative biochemistry and physiology*, 100C (1/2), 183-186.

PRE J., 1991, La lipoperoxidation, *Pathologie biologique*, 39 (7), 716-736.

RADI A.A. & 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.

REDEGELD F.A.H., KOSTER A. Sj. & VAN BENNEKOM W.P., 1990, Determination of tissue glutathione in *Glutathione : metabolism and physiological functions*, VIÑA J. (Eds), 11-18.

REED D.J., BABSON J.R., BEATTY P.W., BRODIE A.E., ELLIS W.W. & POTTER D.W., 1980, High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides, *Analytical biochemistry*, 106, 55-62.

REGOLI F. & ORLANDO E., 1993, *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator of lead pollution : biological variables and cellular responses, *The science of the total environment (supplement)*, 1283-1292.

REGOLI F. & ORLANDO E., 1994, Accumulation and subcellular distribution of metals (Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) in the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* during a field transplant experiment, *Marine pollution bulletin*, 28 (10), 592-600.

- 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.
- RIBERA D., NARBONNE J.F., DAUBEZE M. & MICHEL X., 1989, Characterisation, tissue distribution and sexual differences of some parameters related to lipid peroxidation in mussels, *Marine environmental research*, 28, 279-283.
- RIBERA D., NARBONNE J.F., MICHEL X., LIVINGSTONE D.R. & O'HARA S., 1991, Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure, *Comparative biochemistry and physiology*, 100C, (1/2), 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).
- ROCHE H. & BOGE G., 1993, Effects of Cu, Zn and Cr salts on antioxidant enzyme activities *in vitro* of red blood cells of a marine fish *Dicentrarchus labrax*, *Toxicology in vitro*, 7 (5), 623-629.
- RODRIGUEZ R.E, MISRA M. & KASPRZAK K.S., 1990, Effects of nickel on catalase activity *in vitro* and *in vivo*, *Toxicology*, 63, 45-52.
- RODRIGUEZ-ARIZA A., PEINADO J., PUEYO C. & LOPEZ-BAREA J., 1993, Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas, *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, 50, 2568-2573.
- ROMERO F.J., & GALARIS D., 1990, Compartmentation of cellular glutathione in mitochondrial and cytosolic pools in *Glutathione : metabolism and physiological functions*, VIÑA J. (Eds), 29-38.
- ROMERO F.J. & ROMA J., 1989, Careful consideration of the effects induced by glutathione depletion in rat liver and heart. The involvement of cytosolic and mitochondrial glutathione pools, *Chemical and biological interactions*, 70, 29-37.
- ROVERI A., MAIORINO M. & URSINI F., 1994, Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase in *Methods in enzymology, Part C : Oxygen radicals in biological systems*, PACKER L. (Eds), 233, 202-212.
- SAEZ G.T., BANNISTER W.H., & BANNISTER J.V., 1990, Free radicals and thiols compounds - the role of glutathione against free radical toxicity in *Glutathione : metabolism and physiological functions*, VIÑA J. (eds), 237-254.
- SCHELLHORN H.E., 1994, Regulation of hydroperoxidase (catalase) expression in *Escherichia coli*, *FEMS microbiology letters*, 131, 113-119.
- SCOTT E.M. & HARRINGTON J.P., 1990, Comparative studies of catalase and superoxide dismutase activity within salmon fish erythrocytes, *Comparative biochemistry and physiology*, 95B (1), 91-93.
- SIES H., 1981, Measurement of hydrogen peroxide formation *in situ* in *Methods in enzymology*, JAKOBY W.B. (Eds), 77, 15-20.
- SIES H., 1991, Oxidative stress : introduction in oxidative stress, oxidants and antioxidants, SIES H. (Eds)
- SIMMONS T.W. & JAMALL I. S., 1988, Significance of alterations in hepatic antioxidant enzymes, *Biochemistry journal*, 251, 913-917.
- SNELL K. & MULLOCK B., 1987, Biochemical toxicology a practical approach, IRL press.



- SOLE M., PORTE C. & ALBAIGES J., 1995, Seasonal variation in the mixed-function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Environmental toxicology and chemistry*, 14 (1), 157-164.
- SOLE M., PORTE C. & ALBAIGES J., 1995, The use of biomarkers for assessing the effects of organic pollution in mussels, *The science of the total environment*, 159, 147-153.
- SPALLHOLZ J.E. & BOYLAN L.M., 1991, Glutathione peroxidase : the two selenium enzymes, *Peroxidases in chemistry and biology*, 1, 259-272.
- STEIN J.E., COLLIER T.K., REICHERT W.L., CASILLAS E., HOM T. & VARASINA U., 1992, Biondicators of contaminant exposure and sublethal effects : studies with benthic fish in Puget Sound, Washington, *Environmental toxicology and chemistry*, 11, 701-714.
- STEIN A.F., DILLS R.L. & KLAASSEN C.D., 1986, High-performance liquid chromatographic analysis of glutathione and its thiol and disulfide degradation products, *Journal of chromatography*, 381, 259-270.
- TAPPEL M.E., CHAUDIERE J. & TAPPEL A.L., 1982, Glutathione peroxidase activities of animal tissues, *Comparative biochemistry and physiology*, 73B (4), 945-949.
- TATE T.M., & FLORY W., 1993, Effect of 2-thiothiazone (TTZ) on hepatic and pulmonary glutathione (GSH) concentrations in rats, *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 50, 554-560.
- TATE S.S., & MEISTER A., 1978, Serine-borate complex as a transition-state inhibitor of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, *Proceedings of the national academy of sciences of the United states of America*, 75 (10), 4806-4809.
- THOMAS P. & JUEDES M.J., 1992, Influence of lead on the glutathione status of Atlantic croaker tissues, *Aquatic toxicology*, 23, 11-30.
- 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, *Aquatic toxicology*, 27, 159-178.
- TIMBRELL J.A., DRAPER R. & WATERFIELD C.J., 1994, Biomarkers in toxicology : new uses for some old molecules, *Toxicology and ecotoxicology news*, 1 (1), 4-14.
- VASSEUR P., DIVE D., SOKAR Z. & BONNEMAIN H., 1988, Interactions between copper and some carbamates used in phytosanitary treatments, *Chemosphere*, 17 (4), 762-782.
- VIARENGO A., CANESI L., PERTICA M. & LIVINGSTONE D.R., 1991, Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels, *Comparative biochemistry and physiology*, 100C (1/2), 187-190.
- VIARENGO A., PERTICA M., CANESI L., BIASI F., CECCHINI J., ORUNESU M., 1988, Effects of heavy metals on lipid peroxidation in mussel tissues, *Marine environmental research*, 24, 354.
- WENDEL A., 1981, Glutathione peroxidase in *Methods in enzymology*, JAKOBY W.B. (Eds), 77, 325-332.
- WENNING R.J. & DI GIULIO R.T., 1988, Microsomal enzyme activities, superoxide production, and antioxidant defenses in ribbed mussels (*Geukensia demissa*) and wedge clams (*Rangia cuneata*), *Comparative biochemistry and physiology*, 90C (1), 21-28.

WENNING R.J., DI GIULIO R.T. & GALLAGHER E.P., 1988, Oxidant-mediated biochemical effects of paraquat in the ribbed mussel, *Geukensia demissa*, *Aquatic toxicology*, 12, 157-170.

WINSTON G.W. & DI GIULIO R.T., 1991, prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms, *Aquatic toxicology*, 19, 137-161.

WINSTON G.W., LIVINGSTONE D.R., & LIPS F., 1990, Oxygen reduction metabolism by the digestive gland of the common marine mussel, *Mytilus edulis* L., *The journal of experimental zoology*, 255, 296-308.

WOFFORD H.W. & THOMAS P., 1988, Peroxidation of mullet and rat liver lipids *in vitro* : effects of pyridine nucleotides, iron, incubation buffer, and xenobiotics, *Comparative biochemistry and physiology*, 89C (2), 201-205.

YU B.P., 1994, Cellular defenses against damage from reactive oxygen species, *Physiological reviews*, 74 (1), 139-163.

Analyses des micropolluants des sédiments prélevés sur le site témoin de Gavisse.

Désignation du paramètre	Résultat	Unité
<b>PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES</b>		
MATIERES SECHES	76,7	%
CARBONE ORGANIQUE TOTAL (C)	12,40	g/kg M.S.
<b>HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES AROMATIQUES</b>		
FLUORANTHENE	214,00	µg/kg M.S.
BENZO(B)FLUORANTHENE	97,50	µg/kg M.S.
BENZO(K)FLUORANTHENE	84,80	µg/kg M.S.
BENZO(A)PYRENE	272,00	µg/kg M.S.
BENZO(GHI)PERYLENE	73,2	µg/kg M.S.
INDENOPYRENE	80,5	µg/kg M.S.
<b>CHLOROPHENOLS</b>		
2,3-DICHLOROPHENOL	<5	µg/kg M.S.
2,4-DICHLOROPHENOL	<5	µg/kg M.S.
2,5-DICHLOROPHENOL	<5	µg/kg M.S.
2,6-CHLOROPHENOL	<5	µg/kg M.S.
3,4-DICHLOROPHENOL	<5	µg/kg M.S.
3,5-DICHLOROPHENOL	<5	µg/kg M.S.
2,4,5-TRICHLOROPHENOL	<10	µg/kg M.S.
2,4,6-TRICHLOROPHENOL	<5	µg/kg M.S.
PENTACHLOROPHENOL	<5	µg/kg M.S.
<b>PESTICIDES ORGANOCHLORES</b>		
HEXACHLOROBUTADIENE	<0,05	µg/kg M.S.
HEXACHLOROBENZENE	<0,05	µg/kg M.S.
ALDRINE	<0,25	µg/kg M.S.
DIELDRINE	<0,25	µg/kg M.S.
ENDRINE	<0,25	µg/kg M.S.
OP DDD	<0,25	µg/kg M.S.
PP DDD	<0,25	µg/kg M.S.
OP DDE	<0,25	µg/kg M.S.
PP DDE	<0,25	µg/kg M.S.
OP DDT	<0,25	µg/kg M.S.
PP DDT	<0,25	µg/kg M.S.
1,2 DICHLOROBENZENE	<0,5	µg/kg M.S.
1,3DICHLOROBENZENE	<0,5	µg/kg M.S.
1,4 DICHLOROBENZENE	<0,5	µg/kg M.S.
1,2,3 TRICHLOROBENZENE	<0,20	µg/kg M.S.
1,2,4 TRICHLOROBENZENE	<0,20	µg/kg M.S.
1,3,5 TRICHLOROBENZENE	<0,20	µg/kg M.S.
<b>POLYCHLOROBIPHENYLS (PCB)</b>		
PCB 28	<0,15	µg/kg M.S.
PCB 52	<0,25	µg/kg M.S.
PCB 101	5,57	µg/kg M.S.
PCB 118	2,59	µg/kg M.S.
PCB 138	2,33	µg/kg M.S.
PCB 153	2,70	µg/kg M.S.
PCB 180	1,92	µg/kg M.S.
<b>METAUX</b>		
ARSENIC (As)	12,7	mg/kg M.S.
CHROME TOTAL (Cr)	17,5	mg/kg M.S.
CUIVRE (Cu)	9,4	mg/kg M.S.
CADMIUM (Cd)	<1	mg/kg M.S.
PLOMB (Pb)	11,2	mg/kg M.S.
MERCURE (Hg)	<0,05	mg/kg M.S.
NICKEL (Ni)	19,0	mg/kg M.S.



Analyses des micropolluants des sédiments prélevés sur le site témoin de Manom.

Désignation du paramètre	Résultat	Unité
<b>PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES</b>		
MATIERES SECHES	68.3	%
CARBONE ORGANIQUE TOTAL (C)	18.00	g/kg M.S.
<b>HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES AROMATIQUES</b>		
FLUORANTHENE	21.10	µg/kg M.S.
BENZO(B)FLUORANTHENE	2.49	µg/kg M.S.
BENZO(K)FLUORANTHENE	2.59	µg/kg M.S.
BENZO(A)PYRENE	6.79	µg/kg M.S.
BENZO(GHI)PERYLENE	2.4	µg/kg M.S.
INDENOPYRENE	2.4	µg/kg M.S.
<b>CHLOROPHENOLS</b>		
2,3-DICHLOROPHENOL	<5	µg/kg M.S.
2,4-DICHLOROPHENOL	<5	µg/kg M.S.
2,5-DICHLOROPHENOL	<5	µg/kg M.S.
2,6-CHLOROPHENOL	<5	µg/kg M.S.
3,4-DICHLOROPHENOL	<5	µg/kg M.S.
3,5-DICHLOROPHENOL	<5	µg/kg M.S.
2,4,5-TRICHLOROPHENOL	<10	µg/kg M.S.
2,4,6-TRICHLOROPHENOL	<5	µg/kg M.S.
PENTACHLOROPHENOL	<5	µg/kg M.S.
<b>PESTICIDES ORGANOCHLORES</b>		
HEXACHLOROBUTADIENE	<0.05	µg/kg M.S.
HEXACHLOROBENZENE	<0.05	µg/kg M.S.
ALDRINE	<0.25	µg/kg M.S.
DIELDRINE	<0.25	µg/kg M.S.
ENDRINE	<0.25	µg/kg M.S.
OP DDD	<0.25	µg/kg M.S.
PP DDD	<0.25	µg/kg M.S.
OP DDE	<0.25	µg/kg M.S.
PP DDE	<0.25	µg/kg M.S.
OP DDT	<0.25	µg/kg M.S.
PP DDT	<0.25	µg/kg M.S.
1,2 DICHLOROBEZENE	<0,5	µg/kg M.S.
1,3DICHLOROBEZENE	<0,5	µg/kg M.S.
1,4 DICHLOROBEZENE	<0,5	µg/kg M.S.
1,2,3 TRICHLOROBEZENE	<0,20	µg/kg M.S.
1,2,4 TRICHLOROBEZENE	<0,20	µg/kg M.S.
1,3,5 TRICHLOROBEZENE	<0,20	µg/kg M.S.
<b>POLYCHLOROBIPHENYLS (PCB)</b>		
PCB 28	<0,15	µg/kg M.S.
PCB 52	<0,25	µg/kg M.S.
PCB 101	<0,15	µg/kg M.S.
PCB 118	<0,15	µg/kg M.S.
PCB 138	0,31	µg/kg M.S.
PCB 153	0,51	µg/kg M.S.
PCB 180	0,29	µg/kg M.S.
<b>METAUX</b>		
ARSENIC (As)	9,9	mg/kg M.S.
CHROME TOTAL (Cr)	11,0	mg/kg M.S.
CUIVRE (Cu)	7,9	mg/kg M.S.
CADMIUM (Cd)	<1	mg/kg M.S.
PLOMB (Pb)	8,0	mg/kg M.S.
MERCURE (Hg)	<0,05	mg/kg M.S.
NICKEL (Ni)	16,4	mg/kg M.S.

**Tableau T1 : Valeurs moyennes des activités spécifiques et des taux de glutathion mesurés dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites de glandes digestives d'*Unio tumidus*.. Echantillonnage d'octobre 1993.**

		GSH+GSSG	GSH	GSSG	GPx totale	Se GPx	GPx Se ind.	GRd	Catalase
moyenne des mâles (n = 5)	S	529 ± 46	421 ± 46	108 ± 3	96 ± 16	65 ± 12	31 ± 5	44 ± 2	127 ± 17
	C	213 ± 75	179 ± 77	34 ± 2	62 ± 12	45 ± 15	17 ± 2	33 ± 3	688 ± 98
moyenne des femelles avec larves (n = 5)	S	607 ± 17	446 ± 16	161 ± 2	99 ± 13	70 ± 9	29 ± 5	48 ± 3	132 ± 32
	C	204 ± 45	187 ± 49	29 ± 5	69 ± 10	54 ± 12	15 ± 2	34 ± 5	711 ± 88
moyennes des femelles sans larves (n = 4)	S	532 ± 73	447 ± 65	111 ± 29	99 ± 15	72 ± 14	27 ± 3	45 ± 4	126 ± 18
	C	153 ± 29	130 ± 28	32 ± 8	63 ± 6	48 ± 5	15 ± 2	36 ± 2	689 ± 41

Les activités spécifiques sont exprimées :

\* en nmoles NADPH/min/mg protéines pour les glutathion peroxydases et réductases

\* en  $\mu$ moles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg protéines pour la catalase

\* en nmoles GSH/mg de protéines pour le glutathion

**Tableau T2 : Valeurs moyennes des activités spécifiques et des taux de glutathion mesurés dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites de branchies d'*Unio tumidus*.. Echantillonnage d'octobre 1993.**

		GSH+GSSG	GSH	GSSG	GPx totale	Se GPx	GPx Se ind.	GRd	Catalase
moyenne des mâles (n = 5)	S	539 ± 60	330 ± 55	208 ± 8	63 ± 7	60 ± 6	3 ± 1	46 ± 4	30 ± 6
	C	215 ± 23	133 ± 13	82 ± 10	35 ± 3	29 ± 2	6 ± 1	10 ± 1	133 ± 33
moyenne des femelles avec larves (n = 5)	S	596 ± 70	364 ± 55	232 ± 17	59 ± 5	53 ± 5	5 ± 1	50 ± 7	22 ± 4
	C	163 ± 15	73 ± 16	89 ± 6	32 ± 3	23 ± 4	8 ± 1	13 ± 3	109 ± 36
moyennes des femelles sans larves (n = 4)	S	542 ± 84	305 ± 59	236 ± 27	62 ± 4	48 ± 7	16 ± 2	51 ± 3	25 ± 5
	C	170 ± 27	80 ± 18	90 ± 10	26 ± 2	23 ± 2	3 ± 1	10 ± 2	121 ± 30

Les activités spécifiques sont exprimées :

- \* en nmoles NADPH/min/mg protéines pour les glutathion peroxydases et réductases
- \* en  $\mu$ moles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg protéines pour la catalase
- \* en nmoles GSH/mg de protéines pour le glutathion

**Tableau T3 :** Activités enzymatiques et taux de glutathion mesurés dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites (C) d'*Unio tumidus* prélevés sur le site de Gavisse (Campagne de mai 1994).

Les glutathion peroxydases (GPx) et la glutathion réductase (GRd) sont exprimées en nmoles NADPH/min/mg protéines ; la catalase est exprimée en  $\mu$ moles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg protéines ; les taux de glutathion sont exprimés en nmoles glutathion/mg protéines.

Les valeurs en italique représentent les taux exprimés par g de tissu frais.

**\* Glandes digestives.**

		GPx totale	Se GPx	GPx Se ind.	GRd	Catalase	GSH + GSSG Dosage par	GSH la méthode	GSSG classique
Femelles (n = 6)	S	101 ± 3 <i>270 ± 10</i>	74 ± 3 <i>230 ± 10</i>	27 ± 3 <i>40 ± 6</i>	36 ± 3 <i>220 ± 10</i>	191 ± 33 <i>226 ± 20</i>	374 ± 36 <i>565 ± 30</i>	338 ± 34 <i>510 ± 27</i>	42 ± 4 <i>55 ± 10</i>
	C	98 ± 6 <i>95 ± 10</i>	73 ± 2 <i>70 ± 6</i>	15 ± 6 <i>25 ± 5</i>	34 ± 3 <i>65 ± 10</i>	693 ± 71 <i>870 ± 50</i>	192 ± 23 <i>301 ± 26</i>	173 ± 22 <i>266 ± 34</i>	19 ± 2 <i>35 ± 5</i>
Mâles (n = 6)	S	94 ± 5 <i>250 ± 15</i>	74 ± 5 <i>221 ± 12</i>	21 ± 2 <i>39 ± 6</i>	36 ± 2 <i>220 ± 12</i>	174 ± 36 <i>220 ± 15</i>	367 ± 36 <i>542 ± 45</i>	327 ± 35 <i>490 ± 44</i>	40 ± 3 <i>52 ± 6</i>
	C	80 ± 5 <i>91 ± 10</i>	65 ± 3 <i>70 ± 8</i>	15 ± 3 <i>21 ± 6</i>	33 ± 2 <i>67 ± 9</i>	627 ± 114 <i>812 ± 45</i>	155 ± 14 <i>240 ± 25</i>	136 ± 13 <i>210 ± 20</i>	19 ± 2 <i>30 ± 6</i>

**\* Branchies.**

		GPx totale	Se GPx	GPx Se ind.	GRd	Catalase	GSH + GSSG Dosage par	GSH la méthode	GSSG classique
Femelles (n = 6)	S	63 ± 4 <i>121 ± 10</i>	57 ± 4 <i>95 ± 10</i>	6 ± 2 <i>26 ± 6</i>	44 ± 2 <i>100 ± 15</i>	16 ± 4 <i>66 ± 6</i>	727 ± 53 <i>946 ± 17</i>	585 ± 34 <i>766 ± 15</i>	142 ± 30 <i>180 ± 20</i>
	C	41 ± 5 <i>110 ± 15</i>	36 ± 8 <i>90 ± 12</i>	5 ± 2 <i>20 ± 5</i>	16 ± 2 <i>60 ± 6</i>	49 ± 4 <i>220 ± 10</i>	190 ± 18 <i>321 ± 20</i>	108 ± 11 <i>221 ± 26</i>	82 ± 14 <i>100 ± 17</i>
Mâles (n = 6)	S	64 ± 3 <i>126 ± 15</i>	57 ± 3 <i>96 ± 6</i>	7 ± 1 <i>30 ± 5</i>	46 ± 1 <i>115 ± 15</i>	16 ± 3 <i>67 ± 8</i>	746 ± 35 <i>964 ± 35</i>	611 ± 21 <i>794 ± 40</i>	135 ± 22 <i>170 ± 30</i>
	C	44 ± 3 <i>120 ± 13</i>	38 ± 2 <i>95 ± 6</i>	6 ± 1 <i>25 ± 4</i>	18 ± 2 <i>70 ± 7</i>	48 ± 4 <i>210 ± 12</i>	182 ± 20 <i>313 ± 10</i>	105 ± 13 <i>215 ± 10</i>	77 ± 10 <i>98 ± 10</i>

**Tableau T4** : Activités enzymatiques et taux de glutathion mesurés dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites (C) d'*Unio tumidus*, les individus ont été mis en cages et transférés dans un autre site témoin. (Campagne d'**octobre 1994**).

Les glutathion peroxydases (GPx) et la glutathion réductase (GRd) sont exprimées en nmoles NADPH/min/mg protéines ; la catalase est exprimée en  $\mu$ moles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg protéines ; les taux de glutathion sont exprimés en nmoles glutathion/mg protéines.

Les valeurs en italique représentent les taux exprimés par g de tissu frais.

**\* Glandes digestives.**

		GPx totale	Se GPx	GPx Se ind.	GRd	Catalase
Témoins libres (n = 16)	S	90 ± 5 <b>271 ± 15</b>	65 ± 3 <b>224 ± 10</b>	29 ± 2 <b>46 ± 6</b>	51 ± 3 <b>240 ± 13</b>	172 ± 13 <b>217 ± 20</b>
	C	77 ± 3 <b>95 ± 10</b>	62 ± 2 <b>54 ± 6</b>	16 ± 1 <b>42 ± 6</b>	42 ± 3 <b>81 ± 10</b>	674 ± 77 <b>892 ± 50</b>
Témoins en cages <i>in situ</i> (n = 16)	S	89 ± 5 <b>267 ± 10</b>	64 ± 4 <b>226 ± 12</b>	29 ± 1 <b>43 ± 6</b>	52 ± 3 <b>234 ± 10</b>	172 ± 22 <b>220 ± 15</b>
	C	74 ± 3 <b>96 ± 10</b>	60 ± 3 <b>50 ± 8</b>	15 ± 1 <b>46 ± 5</b>	46 ± 3 <b>78 ± 10</b>	693 ± 15 <b>894 ± 37</b>
Témoins en cages transférés (n = 16)	S	91 ± 3 <b>276 ± 12</b>	65 ± 3 <b>221 ± 12</b>	28 ± 1 <b>43 ± 6</b>	51 ± 4 <b>247 ± 14</b>	184 ± 13 <b>210 ± 24</b>
	C	75 ± 3 <b>96 ± 6</b>	61 ± 3 <b>51 ± 7</b>	15 ± 2 <b>46 ± 6</b>	42 ± 3 <b>79 ± 9</b>	697 ± 11 <b>877 ± 35</b>

		GSH + GSSG Dosage par	GSH la méthode	GSSG classique	GSH + GSSG Dosage par	GSH la méthode	GSSG par HPLC
Témoins libres (n = 16)	S	528 ± 10 <b>755 ± 15</b>	407 ± 7 <b>600 ± 15</b>	120 ± 9 <b>155 ± 17</b>	584 ± 19 <b>880 ± 30</b>	447 ± 9 <b>675 ± 26</b>	135 ± 13 <b>180 ± 15</b>
	C	149 ± 7 <b>267 ± 15</b>	92 ± 8 <b>190 ± 20</b>	58 ± 3 <b>77 ± 5</b>	203 ± 7 <b>370 ± 20</b>	137 ± 10 <b>280 ± 17</b>	96 ± 7 <b>85 ± 12</b>
Témoins en cages <i>in situ</i> (n = 16)	S	529 ± 13 <b>770 ± 15</b>	415 ± 12 <b>620 ± 20</b>	114 ± 8 <b>150 ± 12</b>	593 ± 10 <b>875 ± 20</b>	453 ± 10 <b>685 ± 20</b>	138 ± 11 <b>181 ± 17</b>
	C	155 ± 13 <b>287 ± 12</b>	99 ± 11 <b>210 ± 15</b>	59 ± 5 <b>77 ± 6</b>	206 ± 9 <b>340 ± 30</b>	140 ± 10 <b>261 ± 21</b>	102 ± 7 <b>85 ± 10</b>
Témoins en cages transférés (n = 16)	S	532 ± 14 <b>782 ± 25</b>	414 ± 11 <b>615 ± 20</b>	119 ± 9 <b>157 ± 16</b>	590 ± 9 <b>892 ± 31</b>	448 ± 9 <b>680 ± 25</b>	138 ± 10 <b>190 ± 25</b>
	C	153 ± 13 <b>290 ± 10</b>	94 ± 8 <b>205 ± 18</b>	59 ± 11 <b>77 ± 9</b>	205 ± 8 <b>376 ± 24</b>	138 ± 9 <b>285 ± 26</b>	101 ± 8 <b>86 ± 12</b>

**Tableau T5** : Activités enzymatiques et taux de glutathion mesurés dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites (C) d'*Unio tumidus* (Campagne de **juin 1995**). Les glutathion peroxydases (GPx) et la glutathion réductase (GRd) sont exprimées en nmoles NADPH/min/mg protéines ; la catalase est exprimée en  $\mu$ moles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg protéines ; les taux de glutathion sont exprimés en nmoles glutathion/mg protéines. Les valeurs en italique représentent les taux exprimés par g de tissu frais.

**\* Glandes digestives.**

		GPx totale	Se GPx	GPx Se ind.	GRd	Catalase	GSH+GSSG Dosage	GSH par la méthode	GSSG HPLC
Témoins (n = 3)	S	141 ± 15 <b>280 ± 21</b>	102 ± 7 <b>224 ± 19</b>	35 ± 9 <b>66 ± 10</b>	63 ± 10 <b>230 ± 20</b>	141 ± 1 <b>217 ± 15</b>	434 ± 10 <b>860 ± 30</b>	278 ± 11 <b>670 ± 21</b>	119 ± 12 <b>210 ± 15</b>
	C	63 ± 7 <b>91 ± 10</b>	42 ± 10 <b>52 ± 6</b>	19 ± 7 <b>40 ± 10</b>	48 ± 3 <b>75 ± 10</b>	661 ± 62 <b>886 ± 30</b>	177 ± 9 <b>336 ± 17</b>	135 ± 8 <b>266 ± 17</b>	55 ± 8 <b>75 ± 10</b>

**\* Branchies.**

		GPx totale	Se GPx	GPx Se ind.	GRd	Catalase	GSH+GSSG Dosage	GSH par la méthode	GSSG HPLC
Témoins (n = 3)	S	121 ± 12 <b>144 ± 18</b>	86 ± 5 <b>92 ± 6</b>	33 ± 9 <b>54 ± 10</b>	43 ± 1 <b>112 ± 5</b>	105 ± 4 <b>140 ± 10</b>	594 ± 26 <b>1010 ± 40</b>	460 ± 16 <b>824 ± 20</b>	119 ± 12 <b>210 ± 15</b>
	C	76 ± 8 <b>120 ± 10</b>	62 ± 2 <b>85 ± 5</b>	15 ± 4 <b>35 ± 5</b>	51 ± 7 <b>86 ± 8</b>	332 ± 14 <b>540 ± 33</b>	171 ± 11 <b>340 ± 30</b>	106 ± 10 <b>244 ± 20</b>	74 ± 14 <b>90 ± 10</b>



Tableau T6 : Activités enzymatiques et taux de glutathion mesurés dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites (C) d'*Unio tumidus* (Campagne d'octobre 1995).

Les glutathion peroxydases (GPx) et la glutathion réductase (GRd) sont exprimées en nmoles NADPH/min/mg protéines ; la catalase est exprimée en  $\mu$ moles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg protéines ; les taux de glutathion sont exprimés en nmoles glutathion/mg protéines.

Les valeurs en italique représentent les taux exprimés par g de tissu frais.

\* **Glandes digestives.**

		GPx totale	Se GPx	GPx Se ind.	GRd	Catalase	GSH+GSSG Dosage	GSH par la méthode	GSSG HPLC
Témoins (n = 5)	S	113 ± 12 <i>290 ± 10</i>	83 ± 14 <i>228 ± 12</i>	29 ± 6 <i>59 ± 8</i>	62 ± 6 <i>241 ± 13</i>	116 ± 11 <i>210 ± 20</i>	477 ± 25 <i>831 ± 31</i>	396 ± 28 <i>660 ± 21</i>	85 ± 13 <i>160 ± 17</i>
	C	53 ± 10 <i>88 ± 6</i>	43 ± 11 <i>55 ± 9</i>	14 ± 7 <i>32 ± 6</i>	49 ± 7 <i>70 ± 7</i>	639 ± 57 <i>853 ± 22</i>	187 ± 26 <i>350 ± 25</i>	146 ± 19 <i>260 ± 16</i>	49 ± 8 <i>85 ± 10</i>

\* **Branchies.**

		GPx totale	Se GPx	GPx Se ind.	GRd	Catalase	GSH+GSSG Dosage	GSH par la méthode	GSSG HPLC
Témoins (n = 5)	S	94 ± 1 <i>150 ± 14</i>	53 ± 3 <i>90 ± 7</i>	31 ± 6 <i>47 ± 9</i>	39 ± 4 <i>109 ± 8</i>	16 ± 3 <i>110 ± 12</i>	585 ± 19 <i>1026 ± 25</i>	489 ± 23 <i>830 ± 23</i>	98 ± 14 <i>202 ± 18</i>
	C	48 ± 8 <i>115 ± 8</i>	32 ± 2 <i>76 ± 8</i>	21 ± 9 <i>35 ± 7</i>	35 ± 3 <i>88 ± 6</i>	158 ± 12 <i>446 ± 14</i>	169 ± 24 <i>338 ± 23</i>	127 ± 18 <i>250 ± 17</i>	42 ± 11 <i>86 ± 11</i>

**Tableau T7 : Activités enzymatiques et taux de glutathion mesurés dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites (C) d'*Unio tumidus*, les individus ayant été transférés en amont et en aval d'une source de pollution connue (Cokerie - Campagne de juin 1995).**  
 Les glutathion peroxydases (GPx) et la glutathion réductase (GRd) sont exprimées en nmoles NADPH/min/mg protéines ; la catalase est exprimée en  $\mu$ moles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg protéines ; les taux de glutathion sont exprimés en nmoles glutathion/mg protéines.  
 Les valeurs en italique représentent les taux exprimés par g de tissu frais.

**\* Glandes digestives.**

		GPx totale	Se GPx	GPx Se ind.	GRd	Catalase	GSH+GSSG Dosage	GSH par la méthode	GSSG HPLC
Témoins (n = 3)	S	141 ± 15 <b>280 ± 21</b> 63 ± 7	102 ± 7 <b>224 ± 19</b> 42 ± 10	35 ± 9 <b>66 ± 10</b> 19 ± 7	63 ± 10 <b>230 ± 20</b> 48 ± 3	141 ± 1 <b>217 ± 15</b> 661 ± 62	434 ± 10 <b>860 ± 30</b> 177 ± 9	278 ± 11 <b>670 ± 21</b> 135 ± 8	119 ± 12 <b>210 ± 15</b> 55 ± 8
	C	<b>91 ± 10</b>	<b>52 ± 6</b>	<b>40 ± 10</b>	<b>75 ± 10</b>	<b>886 ± 30</b>	<b>336 ± 17</b>	<b>266 ± 17</b>	<b>75 ± 10</b>
Point amont (n = 3)	S	148 ± 10 <b>286 ± 20</b> 66 ± 8	106 ± 11 <b>230 ± 21</b> 46 ± 12	27 ± 4 <b>59 ± 9</b> 16 ± 5	57 ± 6 <b>226 ± 17</b> 46 ± 5	159 ± 25 <b>221 ± 10</b> 757 ± 35	459 ± 17 <b>846 ± 34</b> 197 ± 14	266 ± 11 <b>645 ± 34</b> 127 ± 14	173 ± 15 <b>186 ± 17</b> 73 ± 8
	C	<b>90 ± 15</b>	<b>51 ± 8</b>	<b>37 ± 6</b>	<b>71 ± 9</b>	<b>894 ± 45</b>	<b>344 ± 20</b>	<b>344 ± 20</b>	<b>89 ± 10</b>
1er point aval (n = 3)	S	103 ± 7 <b>212 ± 15</b> 49 ± 8	81 ± 4 <b>174 ± 10</b> 34 ± 7	20 ± 3 <b>41 ± 7</b> 14 ± 4	29 ± 5 <b>150 ± 15</b> 13 ± 5	159 ± 25 <b>221 ± 10</b> 742 ± 52	297 ± 13 <b>624 ± 25</b> 146 ± 14	189 ± 19 <b>466 ± 41</b> 146 ± 1	134 ± 19 <b>150 ± 22</b> 65 ± 9
	C	<b>69 ± 10</b>	<b>40 ± 5</b>	<b>30 ± 6</b>	<b>24 ± 5</b>	<b>870 ± 36</b>	<b>300 ± 12</b>	<b>300 ± 12</b>	<b>81 ± 12</b>
2ème point aval (n = 3)	S	119 ± 17 <b>221 ± 20</b> 36 ± 9	101 ± 9 <b>180 ± 12</b> 12 ± 2	23 ± 6 <b>44 ± 8</b> 12 ± 2	40 ± 4 <b>186 ± 10</b> 28 ± 6	153 ± 19 <b>224 ± 10</b> 778 ± 40	389 ± 12 <b>726 ± 30</b> 151 ± 15	389 ± 12 <b>726 ± 30</b> 151 ± 15	182 ± 15 <b>197 ± 20</b> 61 ± 10
	C	<b>50 ± 6</b>	<b>26 ± 4</b>	<b>26 ± 4</b>	<b>45 ± 8</b>	<b>889 ± 50</b>	<b>306 ± 17</b>	<b>306 ± 17</b>	<b>87 ± 10</b>

**\* Branchies.**

		GPx totale	Se GPx	GPx Se ind.	GRd	Catalase	GSH+GSSG Dosage	GSH par la méthode	GSSG HPLC
Témoins (n = 3)	S	121 ± 12 <b>144 ± 18</b> 76 ± 8	86 ± 5 <b>92 ± 6</b> 62 ± 2	33 ± 9 <b>54 ± 10</b> 15 ± 4	43 ± 1 <b>112 ± 5</b> 51 ± 7	105 ± 4 <b>140 ± 10</b> 332 ± 14	594 ± 26 <b>1010 ± 40</b> 171 ± 11	460 ± 16 <b>824 ± 20</b> 106 ± 10	119 ± 12 <b>212 ± 20</b> 74 ± 14
	C	<b>120 ± 10</b>	<b>85 ± 5</b>	<b>35 ± 5</b>	<b>86 ± 8</b>	<b>540 ± 33</b>	<b>340 ± 30</b>	<b>244 ± 20</b>	<b>90 ± 10</b>
Point amont (n = 3)	S	121 ± 3 <b>140 ± 10</b> 79 ± 4	93 ± 4 <b>97 ± 12</b> 61 ± 2	30 ± 5 <b>46 ± 6</b> 17 ± 2	42 ± 2 <b>117 ± 9</b> 46 ± 3	140 ± 17 <b>160 ± 17</b> 327 ± 38	585 ± 23 <b>1044 ± 37</b> 171 ± 16	461 ± 17 <b>829 ± 25</b> 108 ± 12	123 ± 10 <b>230 ± 40</b> 71 ± 13
	C	<b>118 ± 15</b>	<b>88 ± 10</b>	<b>34 ± 6</b>	<b>75 ± 7</b>	<b>518 ± 34</b>	<b>352 ± 27</b>	<b>256 ± 19</b>	<b>95 ± 12</b>
1er point aval (n = 3)	S	110 ± 2 <b>121 ± 9</b> 59 ± 7	60 ± 7 <b>70 ± 6</b> 46 ± 6	45 ± 6 <b>52 ± 8</b> 13 ± 9	25 ± 2 <b>65 ± 9</b> 36 ± 5	108 ± 17 <b>134 ± 18</b> 306 ± 9	370 ± 8 <b>740 ± 26</b> 115 ± 10	248 ± 13 <b>517 ± 25</b> 63 ± 10	114 ± 8 <b>220 ± 20</b> 63 ± 6
	C	<b>95 ± 10</b>	<b>54 ± 9</b>	<b>30 ± 3</b>	<b>56 ± 5</b>	<b>507 ± 41</b>	<b>246 ± 24</b>	<b>170 ± 25</b>	<b>70 ± 7</b>
2ème point aval (n = 3)	S	117 ± 5 <b>130 ± 10</b> 76 ± 5	88 ± 4 <b>95 ± 7</b> 51 ± 2	28 ± 5 <b>37 ± 8</b> 22 ± 4	33 ± 3 <b>84 ± 6</b> 33 ± 1	141 ± 14 <b>164 ± 20</b> 313 ± 27	453 ± 17 <b>846 ± 35</b> 166 ± 10	266 ± 16 <b>560 ± 35</b> 70 ± 4	162 ± 12 <b>280 ± 20</b> 87 ± 10
	C	<b>110 ± 12</b>	<b>60 ± 6</b>	<b>44 ± 6</b>	<b>54 ± 8</b>	<b>546 ± 45</b>	<b>297 ± 34</b>	<b>181 ± 17</b>	<b>102 ± 12</b>



**Tableau T8 : Activités antioxydantes mesurées dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites (C) de glandes digestives d'*Unio tumidus* transférés dans les sites contaminés B, C et D pendant 15 et 30 jours.**

Les activités glutathion peroxydases (GPx) et glutathion réductase (GRd) sont exprimées en nmoles NADPH/min/mg protéines, l'activité catalasique est exprimée en  $\mu$ moles  $H_2O_2$ /min/mg protéines et les taux de glutathion sont exprimés en nmoles glutathion/mg protéines.

Les valeurs en italique représentent les taux exprimés par gramme de tissu.

		Site A		Site B		Site C		Site D
		T15	T30	T15	T30	T15	T30	T15
GPx totale	S	113 ± 8 <i>294±12</i>	111 ± 26 <i>281±15</i>	89 ± 10 <i>239±10</i>	86 ± 9 <i>171±12</i>	72 ± 10 <i>181±17</i>	72 ± 9 <i>182±15</i>	49 ± 7 <i>110±18</i>
	C	54 ± 9 <i>80±13</i>	57 ± 14 <i>95±15</i>	47 ± 9 <i>72±13</i>	46 ± 8 <i>66±8</i>	35 ± 7 <i>59±15</i>	39 ± 8 <i>44±11</i>	25 ± 5 <i>33±10</i>
Se GPx	S	83 ± 14 <i>238±17</i>	84 ± 23 <i>220±16</i>	61 ± 10 <i>173±9</i>	63 ± 10 <i>142±12</i>	53 ± 11 <i>129±7</i>	49 ± 8 <i>113±20</i>	36 ± 5 <i>73±13</i>
	C	45 ± 8 <i>45±5</i>	48 ± 13 <i>51±10</i>	41 ± 14 <i>39±5</i>	41 ± 7 <i>37±5</i>	26 ± 6 <i>38±5</i>	26 ± 6 <i>37±3</i>	28 ± 5 <i>17±4</i>
GPx Se ind.	S	26 ± 7 <i>63±8</i>	31 ± 8 <i>68±9</i>	25 ± 6 <i>57±15</i>	23 ± 5 <i>48±11</i>	34 ± 7 <i>49±5</i>	24 ± 6 <i>47±9</i>	15 ± 2 <i>22±5</i>
	C	14 ± 7 <i>36±7</i>	14 ± 5 <i>42±16</i>	9 ± 2 <i>26±5</i>	9 ± 2 <i>21±6</i>	23 ± 7 <i>21±6</i>	15 ± 3 <i>15±5</i>	8 ± 2 <i>12±3</i>
GRd	S	59 ± 8 <i>255±17</i>	59 ± 10 <i>264±14</i>	49 ± 8 <i>182±15</i>	51 ± 8 <i>178±10</i>	34 ± 7 <i>145±12</i>	37 ± 8 <i>132±10</i>	11 ± 3 <i>72±8</i>
	C	49 ± 5 <i>74±7</i>	50 ± 9 <i>76±6</i>	42 ± 7 <i>44±7</i>	39 ± 8 <i>40±5</i>	23 ± 7 <i>31±6</i>	14 ± 6 <i>35±5</i>	8 ± 3 <i>5±1</i>
Catalase	S	110 ± 15 <i>219±22</i>	111 ± 26 <i>250±19</i>	104 ± 15 <i>253±12</i>	106 ± 19 <i>230±18</i>	111 ± 14 <i>274±21</i>	108 ± 9 <i>260±17</i>	106 ± 15 <i>178±15</i>
	C	634 ± 59 <i>869±38</i>	654 ± 50 <i>860±28</i>	655 ± 28 <i>885±37</i>	650 ± 33 <i>906±38</i>	555 ± 53 <i>834±27</i>	574 ± 51 <i>843±32</i>	430 ± 22 <i>509±26</i>
GSH	S	394 ± 25 <i>670±21</i>	386 ± 27 <i>661±19</i>	356 ± 25 <i>600±21</i>	351 ± 27 <i>589±17</i>	271 ± 42 <i>460±14</i>	294 ± 22 <i>446±18</i>	163 ± 16 <i>280±16</i>
	C	146 ± 22 <i>260±14</i>	150 ± 28 <i>266±18</i>	139 ± 23 <i>251±15</i>	133 ± 26 <i>260±16</i>	84 ± 20 <i>170±15</i>	85 ± 9 <i>166±17</i>	44 ± 8 <i>90±13</i>
GSSG	S	86 ± 10 <i>150±10</i>	92 ± 13 <i>140±17</i>	87 ± 11 <i>180±13</i>	103 ± 18 <i>171±15</i>	94 ± 11 <i>160±20</i>	75 ± 10 <i>166±30</i>	88 ± 9 <i>150±11</i>
	C	43 ± 10 <i>80±9</i>	46 ± 8 <i>75±7</i>	38 ± 9 <i>90±17</i>	46 ± 10 <i>86±13</i>	29 ± 5 <i>60±12</i>	35 ± 5 <i>69±10</i>	47 ± 7 <i>80±7</i>

**Tableau T9 : Activités antioxydantes mesurées dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites (C) de branchies d'*Unio tumidus* transférés dans les sites contaminés B, C et D pendant 15 et 30 jours.**

Les activités glutathion peroxydases (GPx) et glutathion réductase (GRd) sont exprimées en nmoles NADPH/min/mg protéines, l'activité catalasique est exprimée en  $\mu$ moles  $H_2O_2$ /min/mg protéines et les taux de glutathion sont exprimés en nmoles glutathion/mg protéines.

Les valeurs en italique représentent les taux exprimés par gramme de tissu.

		Site A		Site B		Site C		Site D
		T15	T30	T15	T30	T15	T30	T15
GPx totale	S	77 ± 4	76 ± 7	47 ± 5	43 ± 7	42 ± 5	72 ± 7	30 ± 4
		<i>143±13</i>	<i>142±18</i>	<i>97±12</i>	<i>98±10</i>	<i>94±7</i>	<i>155±12</i>	<i>75±10</i>
	C	46 ± 3	48 ± 5	38 ± 5	37 ± 4	33 ± 3	48 ± 6	24 ± 5
		<i>117±11</i>	<i>111±10</i>	<i>93±7</i>	<i>90±9</i>	<i>96±10</i>	<i>122±7</i>	<i>58±8</i>
Se GPx	S	48 ± 4	48 ± 5	22 ± 5	25 ± 2	25 ± 5	27 ± 5	16 ± 2
		<i>88±7</i>	<i>94±9</i>	<i>61±5</i>	<i>57±9</i>	<i>77±9</i>	<i>68±12</i>	<i>54±8</i>
	C	34 ± 4	34 ± 4	25 ± 5	24 ± 3	22 ± 5	23 ± 5	17 ± 4
		<i>78±10</i>	<i>87±9</i>	<i>58±7</i>	<i>56±9</i>	<i>52±7</i>	<i>55±8</i>	<i>26±6</i>
GPx Se ind.	S	29 ± 5	29 ± 5	26 ± 5	21 ± 5	17 ± 6	38 ± 5	15 ± 5
		<i>53±8</i>	<i>48±6</i>	<i>37±9</i>	<i>40±10</i>	<i>32±5</i>	<i>83±11</i>	<i>24±5</i>
	C	18 ± 6	17 ± 5	14 ± 6	14 ± 5	13 ± 5	23 ± 5	8 ± 3
		<i>39±7</i>	<i>28±7</i>	<i>35±5</i>	<i>31±6</i>	<i>31±6</i>	<i>70±9</i>	<i>20±5</i>
GRd	S	40 ± 3	50 ± 5	29 ± 5	32 ± 5	27 ± 3	29 ± 3	11 ± 2
		<i>118±10</i>	<i>94±12</i>	<i>73±9</i>	<i>79±7</i>	<i>74±10</i>	<i>69±9</i>	<i>26±7</i>
	C	36 ± 3	44 ± 4	28 ± 2	32 ± 5	24 ± 4	26 ± 4	8 ± 2
		<i>86±7</i>	<i>85±11</i>	<i>65±9</i>	<i>61±5</i>	<i>57±12</i>	<i>62±8</i>	<i>28±6</i>
Catalase	S	17 ± 4	23 ± 5	28 ± 4	26 ± 3	25 ± 3	30 ± 3	17 ± 4
		<i>113±18</i>	<i>108±14</i>	<i>127±15</i>	<i>120±19</i>	<i>129±95</i>	<i>127±89</i>	<i>102±13</i>
	C	167 ± 9	176 ± 9	185 ± 15	179 ± 10	169 ± 14	267 ± 10	100 ± 7
		<i>436±27</i>	<i>442±26</i>	<i>398±38</i>	<i>413±21</i>	<i>345±20</i>	<i>522±38</i>	<i>272±24</i>
GSH	S	491 ± 18	481 ± 14	296 ± 14	230 ± 20	220 ± 18	227 ± 22	104 ± 11
		<i>833±20</i>	<i>841±16</i>	<i>510±10</i>	<i>500±24</i>	<i>380±20</i>	<i>390±16</i>	<i>192±19</i>
	C	128 ± 21	130 ± 20	68 ± 15	55 ± 9	66 ± 15	66 ± 13	41 ± 9
		<i>255±19</i>	<i>266±15</i>	<i>150±12</i>	<i>161±10</i>	<i>120±50</i>	<i>110±12</i>	<i>80±17</i>
GSSG	S	99 ± 11	100 ± 9	104 ± 12	104 ± 12	92 ± 16	171 ± 20	53 ± 10
		<i>200±20</i>	<i>180±24</i>	<i>170±17</i>	<i>166±20</i>	<i>150±21</i>	<i>244±10</i>	<i>90±10</i>
	C	43 ± 9	43 ± 8	45 ± 4	39 ± 10	35 ± 9	48 ± 6	31 ± 9
		<i>86±10</i>	<i>91±12</i>	<i>90±15</i>	<i>80±17</i>	<i>70±8</i>	<i>91±9</i>	<i>60±5</i>

**Tableau T10** : Tableau récapitulatif des activités glutathion peroxydases (GPx), glutathion réductase (GRd) et catalase ainsi que des taux de glutathion mesurés dans la fraction cytosolique (S) et la fraction des organites (C) de glandes digestives et de branchies d'*Unio tumidus* intoxiqués par le cuivre, le thiram, ou le mélange des deux toxiques. Les activités des glutathion peroxydases et de la glutathion réductase sont exprimées en nmoles NADPH/min/mg protéines, l'activité catalasique en  $\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min/mg}$  protéines et les taux de glutathion en nmoles glutathion/mg protéines.

		Témoins			Témoins DMSO		Cuivre 30 $\mu\text{g/l}$		Thiram		Cuivre + Thiram		
		Test 2	Test 3	Test définitif	Test 2	Test définitif	Test2	Test définitif	50 $\mu\text{g/l}$	100 $\mu\text{g/l}$	30/50 $\mu\text{g/l}$	30/100 $\mu\text{g/l}$	Test
<b>Glandes digestives</b>													
GPx totale	S	105	198 ± 30	93 ± 4	123	91 ± 4	119	79 ± 3	100	83 ± 4	81	148 ± 21	60 ± 6
	C	69	67 ± 11	79 ± 3	68	79 ± 4	81	74 ± 4	79	69 ± 4	65	57 ± 4	52 ± 5
SeGPx	S	64	85 ± 9	63 ± 3	52	66 ± 6	74	63 ± 3	65	56 ± 4	54	27 ± 7	29 ± 3
	C	42	47 ± 6	61 ± 3	28	60 ± 2	44	54 ± 3	49	53 ± 3	38	18 ± 8	22 ± 5
GPx Se ind.	S	41	113 ± 38	30 ± 3	52	30 ± 3	44	29 ± 2	35	26 ± 3	27	122 ± 21	29 ± 2
	C	26	20 ± 6	19 ± 3	28	19 ± 2	36	16 ± 2	31	17 ± 2	27	39 ± 8	17 ± 3
GRd	S	61	47 ± 5	53 ± 3	51	50 ± 4	59	37 ± 6	63	34 ± 3	36	34 ± 5	34 ± 4
	C	10	34 ± 1	44 ± 3	12	45 ± 4	7	16 ± 3	10	16 ± 2	10	8 ± 2	10 ± 2
Catalase	S	115	155 ± 52	173 ± 11	121	174 ± 11	115	163 ± 13	109	156 ± 14	105	113 ± 52	148 ± 12
	C	569	615 ± 152	708 ± 23	524	706 ± 16	564	644 ± 12	721	644 ± 12	638	622 ± 9	643 ± 12
GSH+GSSG	S	350	564 ± 124	587 ± 11	324	600 ± 27	323	534 ± 5	361	541 ± 16	486	901 ± 180	314 ± 8
	C	125	501 ± 66	206 ± 10	129	204 ± 10	137	159 ± 11	143	195 ± 11	159	143 ± 5	108 ± 7
GSH	S	295	412 ± 74	441 ± 12	270	430 ± 10	270	318 ± 9	255	414 ± 11	416	756 ± 204	210 ± 12
	C	107	230 ± 40	143 ± 15	124	139 ± 8	124	107 ± 11	104	120 ± 12	159	86 ± 5	73 ± 6
GSSG	S	55	152 ± 55	142 ± 14	53	139 ± 10	53	181 ± 6	106	116 ± 18	70	145 ± 26	87 ± 7
	C	18	71 ± 28	98 ± 8	13	101 ± 13	13	144 ± 9	39	85 ± 6	52	58 ± 1	48 ± 6
<b>Branchies</b>													
GPx totale	S	62	61 ± 5	65 ± 2	65	56 ± 2	89	42 ± 5	85	24 ± 3	89	53 ± 2	18 ± 2
	C	61	36 ± 4	35 ± 2	57	33 ± 4	89	26 ± 5	71	13 ± 3	73	33 ± 2	13 ± 2
SeGPx	S	61	54 ± 3	60 ± 2	58	47 ± 2	71	34 ± 3	64	16 ± 2	70	48 ± 1	12 ± 2
	C	56	28 ± 3	30 ± 2	56	26 ± 3	87	19 ± 2	59	11 ± 2	58	28 ± 2	8 ± 2
GPx Se ind.	S	1	9 ± 3	5 ± 1	7	10 ± 2	12	11 ± 3	21	8 ± 2	18	5 ± 1	7 ± 2
	C	5	9 ± 3	5 ± 1	1	8 ± 3	2	9 ± 2	12	7 ± 2	15	5 ± 1	6 ± 2
GRd	S	45	41 ± 4	44 ± 1	28	41 ± 3	43	17 ± 2	43	15 ± 2	55	23 ± 2	15 ± 2
	C	7	11 ± 2	11 ± 1	9	14 ± 3	6	8 ± 2	9	8 ± 2	12	4 ± 1	8 ± 2
Catalase	S	18	32 ± 3	32 ± 5	14	25 ± 9	17	30 ± 5	14	29 ± 3	17	16 ± 3	27 ± 4
	C	39	138 ± 7	139 ± 15	24	134 ± 6	46	96 ± 8	31	93 ± 5	24	62 ± 8	89 ± 2
GSH+GSSG	S	891	576 ± 25	575 ± 17	711	579 ± 31	677	526 ± 25	798	546 ± 28	456	314 ± 15	320 ± 23
	C	202	171 ± 23	180 ± 10	309	167 ± 26	389	140 ± 20	397	155 ± 25	261	122 ± 7	178 ± 21
GSH	S	659	376 ± 23	375 ± 14	569	356 ± 26	517	273 ± 25	686	332 ± 17	386	166 ± 4	171 ± 17
	C	103	116 ± 18	115 ± 5	217	104 ± 17	200	87 ± 17	223	100 ± 21	219	78 ± 3	75 ± 14
GSSG	S	232	116 ± 16	182 ± 5	142	163 ± 24	160	190 ± 16	112	184 ± 22	60	200 ± 10	200 ± 21

**Tableau T11 : Activités antioxydantes mesurées sur glandes digestives d'*Unio tumidus* intoxiqués au laboratoire, pendant 3 jours avec du cuivre 30 µg/l, du thiram 100 µg/l et l'association de ces deux toxiques.**

Les glutathion peroxydases (GPx) et la glutathion réductase (GRd) sont exprimées en nmoles NADPH/min/mg protéines ; la catalase est exprimée en µmoles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg protéines.

Les taux de glutathion sont exprimés en nmoles glutathion/mg protéines

Les valeurs en italique représentent les taux exprimés par g de tissu frais.

		GPx totale	Se GPx	GPx Se ind.	GRd	Catalase
Témoins (n = 5)	S	93 ± 4 <i>270 ± 12</i>	63 ± 3 <i>226 ± 15</i>	30 ± 3 <i>46 ± 6</i>	53 ± 3 <i>230 ± 15</i>	173 ± 11 <i>212 ± 15</i>
	C	79 ± 3 <i>95 ± 10</i>	61 ± 3 <i>72 ± 6</i>	19 ± 3 <i>25 ± 5</i>	44 ± 3 <i>70 ± 10</i>	708 ± 23 <i>810 ± 36</i>
Témoins DMSO (n = 5)	S	91 ± 4 <i>280 ± 15</i>	66 ± 6 <i>236 ± 12</i>	30 ± 3 <i>44 ± 5</i>	50 ± 4 <i>233 ± 17</i>	174 ± 11 <i>219 ± 10</i>
	C	79 ± 4 <i>90 ± 12</i>	60 ± 2 <i>77 ± 5</i>	19 ± 2 <i>26 ± 4</i>	45 ± 4 <i>75 ± 12</i>	706 ± 16 <i>815 ± 44</i>
Cuivre 30µg/l (n = 5)	S	79 ± 3 <i>250 ± 17</i>	63 ± 3 <i>231 ± 15</i>	29 ± 2 <i>40 ± 5</i>	37 ± 6 <i>166 ± 19</i>	163 ± 13 <i>206 ± 15</i>
	C	74 ± 4 <i>89 ± 13</i>	54 ± 3 <i>67 ± 5</i>	16 ± 2 <i>24 ± 3</i>	16 ± 3 <i>29 ± 10</i>	643 ± 9 <i>751 ± 40</i>
Thiram 100µg/l (n = 5)	S	83 ± 4 <i>260 ± 15</i>	56 ± 4 <i>210 ± 10</i>	26 ± 3 <i>51 ± 6</i>	34 ± 3 <i>146 ± 21</i>	156 ± 14 <i>197 ± 7</i>
	C	69 ± 4 <i>75 ± 7</i>	53 ± 3 <i>62 ± 6</i>	17 ± 2 <i>20 ± 5</i>	16 ± 2 <i>30 ± 6</i>	644 ± 12 <i>766 ± 49</i>
Cuivre + Thiram (n=5)	S	60 ± 6 <i>210 ± 15</i>	29 ± 3 <i>137 ± 12</i>	29 ± 2 <i>60 ± 10</i>	34 ± 4 <i>151 ± 25</i>	148 ± 12 <i>199 ± 15</i>
	C	52 ± 5 <i>66 ± 7</i>	22 ± 5 <i>34 ± 8</i>	17 ± 3 <i>30 ± 6</i>	10 ± 2 <i>21 ± 6</i>	643 ± 13 <i>740 ± 33</i>

		GSH + GSSG Dosage par	GSH la méthode	GSSG classique	GSH + GSSG Dosage par	GSH la méthode	GSSG par HPLC
Témoins (n = 5)	S	528 ± 15 <i>770 ± 17</i>	419 ± 8 <i>630 ± 17</i>	108 ± 11 <i>140 ± 17</i>	587 ± 11 <i>850 ± 30</i>	441 ± 12 <i>660 ± 20</i>	142 ± 14 <i>186 ± 23</i>
	C	146 ± 14 <i>220 ± 12</i>	89 ± 9 <i>150 ± 15</i>	57 ± 10 <i>70 ± 10</i>	206 ± 10 <i>340 ± 20</i>	143 ± 15 <i>244 ± 19</i>	98 ± 8 <i>93 ± 6</i>
Témoins DMSO (n = 5)	S	514 ± 10 <i>750 ± 20</i>	416 ± 10 <i>625 ± 19</i>	98 ± 13 <i>125 ± 20</i>	600 ± 27 <i>825 ± 30</i>	430 ± 10 <i>644 ± 24</i>	139 ± 10 <i>180 ± 20</i>
	C	140 ± 10 <i>206 ± 15</i>	82 ± 14 <i>140 ± 30</i>	58 ± 9 <i>66 ± 10</i>	204 ± 10 <i>330 ± 21</i>	139 ± 8 <i>237 ± 24</i>	101 ± 13 <i>97 ± 7</i>
Cuivre 30µg/l (n = 5)	S	517 ± 17 <i>713 ± 30</i>	304 ± 11 <i>450 ± 30</i>	214 ± 11 <i>280 ± 30</i>	534 ± 5 <i>720 ± 25</i>	318 ± 9 <i>480 ± 26</i>	181 ± 6 <i>230 ± 20</i>
	C	137 ± 10 <i>211 ± 12</i>	75 ± 7 <i>130 ± 15</i>	63 ± 11 <i>81 ± 10</i>	159 ± 11 <i>312 ± 15</i>	107 ± 11 <i>180 ± 17</i>	144 ± 9 <i>120 ± 15</i>
Thiram 100µg/l (n = 5)	S	512 ± 10 <i>750 ± 20</i>	412 ± 11 <i>617 ± 20</i>	100 ± 13 <i>133 ± 20</i>	541 ± 16 <i>780 ± 25</i>	414 ± 11 <i>621 ± 30</i>	116 ± 18 <i>150 ± 17</i>
	C	136 ± 10 <i>214 ± 20</i>	83 ± 8 <i>143 ± 30</i>	53 ± 11 <i>71 ± 12</i>	195 ± 11 <i>300 ± 20</i>	120 ± 12 <i>200 ± 22</i>	85 ± 6 <i>90 ± 10</i>
Cuivre + Thiram (n=5)	S	298 ± 9 <i>439 ± 25</i>	198 ± 11 <i>300 ± 30</i>	101 ± 10 <i>139 ± 26</i>	314 ± 8 <i>440 ± 20</i>	210 ± 12 <i>317 ± 30</i>	87 ± 7 <i>115 ± 15</i>
	C	99 ± 6 <i>155 ± 13</i>	66 ± 7 <i>115 ± 15</i>	33 ± 10 <i>40 ± 7</i>	108 ± 7 <i>190 ± 15</i>	73 ± 6 <i>126 ± 15</i>	48 ± 6 <i>51 ± 7</i>



**Tableau T12 : Activités enzymatiques mesurées sur branchies d'*Unio tumidus* intoxiqués au laboratoire, pendant 3 jours avec du cuivre 30 µg/l, du thiram 100 µg/l et l'association de ces deux toxiques.**

Les glutathion peroxydases (GPx) et la glutathion réductase (GRd) sont exprimées en nmoles NADPH/min/mg protéines ; la catalase est exprimée en µmoles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg protéines.

Les taux de glutathion sont exprimés en nmoles glutathion/mg protéines.

Les valeurs en italique représentent les taux exprimés par g de tissu frais.

		GPx totale	Se GPx	GPx Se ind.	GRd	Catalase
Témoins (n = 5)	S	61 ± 5 <i>134 ± 12</i>	54 ± 3 <i>101 ± 6</i>	9 ± 3 <i>37 ± 5</i>	41 ± 4 <i>115 ± 10</i>	32 ± 3 <i>102 ± 7</i>
	C	36 ± 4 <i>116 ± 10</i>	28 ± 3 <i>90 ± 6</i>	9 ± 3 <i>29 ± 5</i>	11 ± 2 <i>55 ± 5</i>	138 ± 7 <i>415 ± 17</i>
Témoins DMSO (n = 5)	S	56 ± 2 <i>123 ± 15</i>	47 ± 2 <i>97 ± 5</i>	10 ± 2 <i>30 ± 7</i>	41 ± 3 <i>121 ± 19</i>	25 ± 9 <i>95 ± 7</i>
	C	33 ± 4 <i>106 ± 12</i>	26 ± 3 <i>84 ± 9</i>	8 ± 3 <i>25 ± 5</i>	14 ± 3 <i>61 ± 7</i>	134 ± 6 <i>412 ± 21</i>
Cuivre 30µg/l (n = 5)	S	42 ± 5 <i>96 ± 6</i>	34 ± 3 <i>67 ± 7</i>	11 ± 3 <i>25 ± 5</i>	17 ± 2 <i>49 ± 6</i>	30 ± 5 <i>107 ± 10</i>
	C	26 ± 5 <i>84 ± 6</i>	19 ± 2 <i>61 ± 7</i>	9 ± 2 <i>26 ± 5</i>	8 ± 2 w	96 ± 8 <i>290 ± 17</i>
Thiram 100µg/l (n = 5)	S	24 ± 3 <i>51 ± 7</i>	16 ± 2 <i>40 ± 4</i>	8 ± 2 <i>20 ± 5</i>	15 ± 2 <i>44 ± 6</i>	29 ± 3 <i>100 ± 11</i>
	C	13 ± 3 <i>55 ± 5</i>	11 ± 2 <i>36 ± 7</i>	7 ± 2 <i>23 ± 4</i>	8 ± 2 <i>44 ± 7</i>	93 ± 5 <i>283 ± 20</i>
Cuivre + Thiram (n=5)	S	18 ± 2 <i>43 ± 5</i>	12 ± 2 <i>27 ± 5</i>	7 ± 2 <i>21 ± 6</i>	9 ± 2 <i>25 ± 5</i>	27 ± 4 <i>100 ± 10</i>
	C	13 ± 2 <i>42 ± 5</i>	8 ± 2 <i>29 ± 5</i>	6 ± 2 <i>20 ± 4</i>	6 ± 2 <i>33 ± 4</i>	89 ± 2 <i>270 ± 10</i>

		GSH + GSSG Dosage par	GSH la méthode	GSSG classique	GSH + GSSG Dosage par	GSH la méthode	GSSG par HPLC
Témoins (n = 5)	S	540 ± 27 <i>945 ± 20</i>	334 ± 21 <i>700 ± 19</i>	206 ± 29 <i>245 ± 31</i>	576 ± 25 <i>1015 ± 33</i>	376 ± 23 <i>790 ± 40</i>	116 ± 16 <i>210 ± 20</i>
	C	145 ± 27 <i>255 ± 17</i>	86 ± 23 <i>180 ± 20</i>	59 ± 24 <i>70 ± 15</i>	171 ± 23 <i>330 ± 23</i>	116 ± 18 <i>240 ± 21</i>	83 ± 17 <i>85 ± 12</i>
Témoins DMSO (n = 5)	S	518 ± 22 <i>900 ± 30</i>	312 ± 18 <i>660 ± 30</i>	207 ± 19 <i>240 ± 27</i>	579 ± 31 <i>970 ± 37</i>	356 ± 26 <i>750 ± 37</i>	163 ± 24 <i>197 ± 20</i>
	C	130 ± 18 <i>240 ± 20</i>	79 ± 13 <i>170 ± 19</i>	56 ± 15 <i>70 ± 15</i>	167 ± 26 <i>312 ± 30</i>	104 ± 17 <i>221 ± 25</i>	84 ± 16 <i>87 ± 9</i>
Cuivre 30µg/l (n = 5)	S	522 ± 22 <i>827 ± 40</i>	259 ± 18 <i>550 ± 51</i>	251 ± 23 <i>277 ± 39</i>	526 ± 25 <i>830 ± 36</i>	273 ± 25 <i>575 ± 25</i>	190 ± 16 <i>230 ± 17</i>
	C	133 ± 18 <i>214 ± 15</i>	66 ± 16 <i>144 ± 17</i>	64 ± 17 <i>70 ± 10</i>	140 ± 20 <i>279 ± 25</i>	87 ± 17 <i>180 ± 17</i>	93 ± 18 <i>90 ± 15</i>
Thiram 100µg/l (n = 5)	S	512 ± 22 <i>902 ± 25</i>	311 ± 19 <i>657 ± 30</i>	201 ± 21 <i>245 ± 17</i>	546 ± 28 <i>937 ± 41</i>	332 ± 17 <i>700 ± 40</i>	184 ± 22 <i>220 ± 39</i>
	C	136 ± 16 <i>241 ± 20</i>	79 ± 14 <i>170 ± 30</i>	59 ± 18 <i>71 ± 10</i>	155 ± 25 <i>305 ± 20</i>	100 ± 21 <i>217 ± 41</i>	79 ± 15 <i>83 ± 13</i>
Cuivre + Thiram (n=5)	S	297 ± 21 <i>508 ± 30</i>	156 ± 23 <i>331 ± 27</i>	141 ± 22 <i>177 ± 37</i>	320 ± 23 <i>619 ± 30</i>	171 ± 17 <i>365 ± 31</i>	200 ± 21 <i>244 ± 24</i>
	C	96 ± 17 <i>175 ± 15</i>	51 ± 15 <i>112 ± 19</i>	45 ± 14 <i>63 ± 7</i>	1178 ± 21 <i>260 ± 27</i>	75 ± 14 <i>155 ± 25</i>	94 ± 14 <i>97 ± 11</i>