

Contrat Inter-Agences
Université de Metz



n5414

RAPPORT D'ETUDE

BIOMARQUEURS POUR L'ETUDE DE L'IMPACT A LONG TERME DE MICROPOLLUANTS SUR LES ECOSYSTEMES HYDRIQUES : ETUDE DE SYSTEMES ANTIOXYDANTS

Juin 1997

**Carole COSSU-LEGUILLE
Aurélie DOY OTTE
Paule VASSEUR**

**Laboratoire de Toxicologie
Centre des Sciences de l'Environnement
1, Rue des Récollets - BP 94025
57045 METZ Cédex 1
Tél. : 03. 87. 75. 81. 81.
Fax : 03. 87. 75. 81. 89.**



RESUME

• Cette recherche avait pour objet **d'étudier** si les **systèmes** antioxydants **pouvaient** constater des biomarqueurs de contamination ou de **toxicité** des **écosystèmes** hydriques et refléter **l'altération précoce** des individus exposés à des polluants.

Nous avons **étudié** tout particulièrement :

- les **activités** des enzymes antioxydantes glutathion peroxydases, glutathion **réductase**, **catalase** et superoxyde dismutase,
- les taux de glutathion, **réduit** et oxyde,
- et les concentrations en malonaldéhyde, marqueur de lipoperoxydation et de toxicité.

L'étude a été conduite sur les bivalves d'eau douce, **Unio tumidus**. Ces **invertébrés** vivent enfouis en partie dans les **sédiments**. Ce sont des organismes filtreurs, peu mobiles, connus pour leur **capacité** à accumuler les micropolluants. Ce sont des bioindicateurs de choix pour les Ctudes de terrain, d'autant qu'ils se prêtent facilement à des **opérations d'encagement** et de transfert sur des sites même éloignés. Les bivalves **Unio tumidus** sont des organismes **répandus** dans la **région** Est. On peut les trouver dans d'autres bassins, bien que leur répartition ne soit pas uniforme et aussi importante ; nous en avons trouvé dans le Lot.

Les paramètres antioxydants ont **été étudiés** dans les branchies et les glandes digestives de ces bivalves. Comme les systèmes antioxydants 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 paramètres en fonction de leur localisation cellulaire pour pallier à **d'éventuelles** différences de **sensibilité** entre compartiments. Pour ce faire, nous avons analysé deux types de 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 les peroxysomes.

• En premier lieu, nous avons optimisé les méthodes de dosage des **différents paramètres**, 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, en utilisant un tampon phosphate additionné d'inhibiteurs de **protéases**.

Les organes (glandes digestives et branchies) ont **été congelés** dans l'azote liquide à **-196°C** **immédiatement** après leur **prélèvement** et stockés dans ces conditions avant d'être analysés.

• A la suite de ces mises au point **expérimentales**, nous avons **évalué** les concentrations et les **activités basales** des paramètres antioxydants retenus dans cette **étude**. L'impact des saisons, du sexe des individus et des conditions physiologiques des femelles a **été étudié** sur les paramètres mesurés.

Nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives entre les individus mâles et femelles, ni entre les femelles en fonction de la production larvaire. Les saisons (printemps et automne) ne semblent pas influencer les paramètres antioxydants, sauf pour l'activité de la catalase qui est plus faible au printemps au niveau branchial. En ce qui concerne la différence entre les taux mesurés dans les deux tissus, les activités catalasiques sont plus élevées dans les glandes digestives, les activités glutathion peroxydase sélénium-indépendante sont particulièrement faibles au niveau branchial et les taux de glutathion sont légèrement plus élevés au niveau branchial.

• Des essais sur sites ont été entrepris ensuite, en vue de démontrer l'intérêt des systèmes antioxydants en tant que biomarqueurs de la pollution du milieu et de la toxicité des polluants. Les études de validité ont été réalisées à l'aide de populations de bivalves témoins encagées, et transférées en amont et en aval d'une source de pollution identifiée.

Quatre sites présentant des profils de pollution, minérale ou organique, différents ont été étudiés. Une première étude a été effectuée sur les sites d'une cokerie à Sérémange en Moselle, avec un suivi après 8, 15 et 30 jours d'exposition. Cette étude a permis (i) de retenir une durée de 15 jours d'exposition pour l'étude des trois autres sites ; et (ii) de sélectionner les paramètres les plus sensibles, à savoir les activités glutathion peroxydases et glutathion réductase, ainsi que les taux de glutathion et de malonaldéhyde. Les paramètres antioxydants étaient fortement diminués dans les branchies des individus transférés en aval du rejet de la cokerie et leur réponse était en rapport avec le degré de pollution des sites.

De l'ensemble de ces études sur la Moselle, à Sérémange et dans la région d'Epinal dans les Vosges, sur le Lot en Haute Garonne près de Toulouse, et dans la Sarthe, il ressort que :

- les activités glutathion peroxydase sélénium-dépendante et glutathion réductase, ainsi que les taux de GSH, sont systématiquement diminués chez les bivalves transplantés sur des sites contaminés

- des effets de lipoperoxydation importants ont été observés lorsque les activités antioxydantes étaient très déprimées : sur le site du Lot, en particulier, caractérisé par une pollution importante des sédiments par les métaux.

- les glandes digestives et les branchies ne répondent pas de la même façon selon le profil de pollution et donnent des informations complémentaires.

En conclusion, nous pouvons recommander (i) de recourir à des études de transfert de bivalves sur des sites contaminés pour connaître l'impact biologique d'une pollution, et (ii) de mesurer l'activité des enzymes antioxydantes, glutathion peroxydase sélénium dépendante et glutathion réductase en tant que marqueurs d'exposition, et les taux de malonaldéhyde en tant que marqueur de toxicité.

Ces paramètres doivent être mesurés dans les branchies et les glandes digestives.

*La réponse de ces biomarqueurs n'est pas **spécifique** d'une classe de polluants **déterminée**, ce qui est particulièrement **intéressant** dans le cas de contaminations multiples.*

*La mesure de l'ensemble de ces paramètres ne présente aucune **difficulté** technique et des dosages en routine sont tout à fait envisageables.*

*Une diminution des deux activités enzymatiques associée à des **effets** de lipoperoxydation permettra de contrôler la qualité des milieux, et d'évaluer l'impact d'une contamination éventuelle. Une diminution des systèmes antioxydants traduit en effet un état de précarité des individus ; des taux de malonaldéhyde élevés exprimant la toxicité des xénobiotiques.*

Sans manifestation d'effets toxiques, et en présence d'une induction des activités antioxydantes, on pourra conclure à un état d'adaptation des individus grâce à l'augmentation d'activités des systèmes de défense et la mise en jeu de systèmes de réparation et de compensation.

*Cette approche de la qualité du **milieu** par l'étude de ces biomarqueurs est intéressante, parce qu'elle permet une évaluation **in situ** de l'impact d'une contamination sur les écosystèmes exposés. Cette approche pourrait être très utile pour l'étude de la qualité des écosystèmes **dans** la mesure où elle intègre des indicateurs d'exposition et de toxicité.*

*Il serait **intéressant** de coupler cette approche à une évaluation parallèle de la dynamique des populations au sein des **écosystèmes** concernés. Ce type d'étude, intégrant les approches écologiques et écotoxicologiques, permettrait de **valider** l'utilisation des biomarqueurs, qui sont des indicateurs précoces de l'altération des individus, comme outils de gestion de la qualité et de **la** santé des écosystèmes, pour le long terme.*

RESUME

2

INTRODUCTION

1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|--|-----------|
| 1.1. Mécanismes de formation | 4 |
| 1.2. Systèmes de défenses antioxydants | 7 |
| a. Les enzymes antioxydantes | 10 |
| b. Les antioxydants non enzymatiques | 11 |
| 1.3. Effets biologiques des espèces réactives de l'oxygène | 11 |
| 1.4. Facteurs modulateurs chez les mammifères | 12 |
| 1.5. Réponses des systèmes antioxydants chez les espèces aquatiques | 16 |

RESULTATS

2. SYNTHESE DE LA PREMIERE ETUDE

| | |
|---|-----------|
| 2.1. Méthodes analytiques | 20 |
| 2.1.1. Les activités enzymatiques antioxydantes | 20 |
| a. Les glutathion peroxydases | 22 |
| b. la glutathion réductase | 22 |
| c. la catalase | 23 |
| d. la superoxyde dismutase | 26 |
| 2.1.2. Le glutathion | 30 |
| 2.1.3. Le malonaldéhyde | 34 |
| 2.1.4. Les protéines totales | 34 |
| 2.2. Conservation et préparation des homogénats | 34 |
| 2.2.1. Echantillonnage | 35 |
| 2.2.2. Conservation des tissus | 35 |
| 2.2.3. Préparation des échantillons : protocole de fractionnement | 36 |
| 2.2.4. Conservation des tissus dans l'azote liquide | 37 |
| 2.2.5. Choix d'inhibiteurs de protéases | 37 |
| 2.3. Influence des facteurs saisonniers, de sexe, du transfert des organismes du site de prélèvement vers un site non pollué sur les activités antioxydantes, les taux de glutathion et de malonaldéhyde | |
| 2.3.1. Influence des facteurs saisonniers et du sexe des individus | 38 |
| 2.3.2. Mise en cage et transfert d'un site témoin vers un autre site témoin | 41 |

| | Pages |
|---|-----------|
| 2.3.3. Etude du transfert d'une population vers un site contaminé | |
| a. Exposition des bivalves pendant 8 jours à une source de pollution identifiée | 43 |
| b. Transfert des bivalves témoins sur trois sites contaminés : étude de la durée d'exposition | 45 |
| | |
| 3. ESSAIS DE TERRAINS : APPLICATION DES MARQUEURS SELECTIONNES A DIFFERENTS SITES | |
| | |
| 3.1. Présentation des sites | 49 |
| a. Sites des Vosges | |
| b. Sites de Haute Garonne | |
| c. Sites de la Sarthe | |
| 3.2. Protocole expérimental | 50 |
| 3.3. Résultats | |
| 3.3.1. Analyses des niveaux de contamination des sédiments | 51 |
| a. Sites des Vosges | |
| b. Sites de Haute Garonne | |
| c. Sites de la Sarthe | |
| 3.3.2. Réponses des différents paramètres biologiques | 53 |
| a. Sites des Vosges | 54 |
| b. Sites de Haute Garonne | 55 |
| c. Sites de la Sarthe | 57 |
| | |
| DISCUSSION | 58 |
| | |
| CONCLUSION | 62 |
| | |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | |
| | |
| FICHES TECHNIQUES | |
| | |
| ANNEXES | |

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 à quantifier sur des séries d'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 permettre de faire abstraction de l'influence des facteurs climatiques ou physiologiques.

Il existe deux grands types de biomarqueurs : (i) les *biomarqueurs d'exposition*, indicateurs de l'exposition des organismes aux polluants et (ii) les *biomarqueurs de toxicité*, indicateurs des dommages pathologiques et des réponses biologiques suite à l'exposition à des substances toxiques.

Lors d'une exposition des organismes à des polluants, deux principaux types de réponses peuvent être enregistrés : (i) les systèmes de défense de ces organismes sont capables d'éliminer les polluants absorbés et leurs métabolites et il n'y aura pas d'effets toxiques chez ces organismes ou (ii) les systèmes de défenses sont débordés et dans ce cas des effets toxiques plus ou moins graves apparaîtront.

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 hydroxyl OH[•]), **d'anions** superoxydes (**O₂^{•-}**) ou d'oxygène singulet (**¹O₂**). 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, des oxyradicaux, capables de détruire les structures cellulaires en l'absence de systèmes protecteurs.

Les oxyradicaux résultant d'un stress oxydant induisent des perturbations biologiques et biochimiques telles que l'oxydation des acides nucléiques, des membranes lipidiques et des protéines. Ces espèces radicalaires sont formées au cours du métabolisme cellulaire, mais également lors des réactions de biotransformation des xénobiotiques.

Dans les conditions normales, les systèmes antioxydants cellulaires neutralisent ces espèces radicalaires réactives ce qui évite ainsi tout risque de toxicité cellulaire. Lors d'une exposition à des polluants, les systèmes antioxydants sont mobilisés, voire altérés : il peut en résulter soit une inhibition, soit une induction. Une induction peut être considérée comme une adaptation des organismes à leur nouvel environnement, permettant une élimination accrue des espèces réactives résultant du stress dû aux polluants. Par contre, une inhibition de ces systèmes

entraînera et traduira un état de précarité chez les individus concernés : dans ce cas, les organismes seront plus sensibles à l'action toxique des espèces radicalaires.

Ainsi, les systèmes antioxydants peuvent être des biomarqueurs intéressants capables de refléter une exposition des organismes à des polluants, mais également des effets toxiques.

Parmi les systèmes protecteurs antioxydants figurent :

- les enzymes :

- * les superoxyde dibmutases qui métabolisent les **anions** superoxydes en espèces moins réactives, le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène moléculaire,

- * les glutathion peroxydases, capables de réduire les molécules de peroxyde d'hydrogène et les peroxydes organiques. Ces enzymes n'agissent qu'en présence de leur substrat, le glutathion réduit qui sera simultanément oxydé en glutathion **disulfide**,

- * la glutathion réductase qui participe à la régénération du glutathion réduit,

- les substances réductrices parmi lesquelles figure :

- * 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.

Le malonaldéhyde est un marqueur de lipoperoxydation et donc des effets au niveau membranaire. Il est mesuré parallèlement aux mesures d'activités antioxydantes en tant qu'un indicateur de toxicité.

Nous avons choisi de conduire nos recherches sur ***Unio tumidus***, bivalve dulçaquicole autochtone. Les bivalves constituent des organismes sentinelles des écosystèmes hydriques par leur capacité de filtration et d'accumulation des polluants.

Les bivalves de la famille des Unionidaes sont des mollusques de la classe des lamellibranches. Ils sont largement répandus en France et en Europe dans les milieux dulçaquicoles. Cependant, les espèces rencontrées sont relativement spécifiques des régions.

D'après Nagel (1988), ***Unio tumidus*** et ***Unio pictorum*** seraient présents en France surtout dans le nord et l'est (figure 1). D'ailleurs, Ode (1,995) a montré qu'en Bretagne le genre **Unio** est relativement rare. En effet, l'indice de conservation prioritaire de cette espèce est de 0,994 ce qui traduit une fréquence faible du taxon ainsi qu'une distribution discontinue (figure 2).

La distribution des mollusques aquatiques peut être limitée par de très faibles concentrations en sels dissous, particulièrement en carbonate de calcium qui est important pour la formation de la coquille. Ce besoin en carbonate de calcium rend les bivalves aptes à vivre dans des eaux alcalines plutôt que dans des eaux acides (Elder & Collins, 1991).

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

- * 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 et l'évaluation de la variabilité inter-individu,
- * sa situation à l'interface eau-sédiment est intéressante, ainsi il peut être contaminé à la fois par les xénobiotiques de l'eau intersticielle et du sédiment,
- * sa faible mobilité permet la mise en cages des individus sans stress particulier 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.

Dans la perspective d'étudier les réponses des systèmes antioxydants chez ces 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 et de préparation des homogénats :

- les tissus ont été conservés dans l'azote liquide à -196°C immédiatement après échantillonnage,
- des inhibiteurs de protéases ont été ajoutés au tampon d'homogénéisation pour préserver l'intégrité des paramètres biochimiques étudiés.

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

- * 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 et de malonaldéhyde. Il faut pouvoir exclure l'incidence de facteurs naturels ou écologiques pour que la variation d'un biomarqueur par rapport à son état basal puisse être relié à la pollution du milieu. Ceci implique donc de bien connaître l'influence de facteurs physiologiques (sexe, stade de reproduction, état nutritionnel, espèce), climatiques et saisonniers (température, oxygénation) et écologique sur la valeur des biomarqueurs étudiés.
- * 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 réponse des paramètres les plus sensibles lors d'études de transfert des sites présentant des profils de pollution différents.

CONCLUSION

De l'ensemble des études sur les sites de Moselle, des Vosges, et de Haute Garonne, il ressort que :

* les activités glutathion peroxydase **sélénium-dépendante**, glutathion **réductase** et les taux de glutathion sont diminués de manière systématique en cas de pollution. Ces diminutions ne semblent pas **spécifiques** d'une classe de polluants donnée. Elles **témoignent** aussi d'un état précaire des individus et d'une sensibilité accrue des organismes aux polluants.

L'induction de la lipoperoxydation est observée parallèlement et à partir d'un certain degré d'inhibition des systèmes antioxydants précédents. Elle traduit une toxicité tissulaire et cellulaire qui résulte de l'inefficacité des systèmes de **défense**, débordés et devenus **inopérants** de faire face au stress de la contamination.

L'étude et la mesure des activités glutathion peroxydase sélénium-dépendante et glutathion réductase, ainsi que des taux de malonaldéhyde indicateurs de toxicité, sont indispensables afin de pouvoir conclure à un réel impact toxique des xénobiotiques.

* L'induction de l'activité glutathion transférase associée à la diminution des systèmes antioxydants indique un état d'adaptation des organismes à la contamination. D'autres activités antioxydantes peuvent être induites. L'induction de ces activités permet de renforcer les défenses des organismes. Si celles-ci suffisent à neutraliser et à **réparer** les effets du stress engendré par les polluants, la toxicité sera transitoire : les organismes se seront adaptés à leur nouvel environnement.

* les deux tissus, **glande digestive et branchies**, doivent être analysés **systématiquement** : en effet, selon la situation, ils peuvent exprimer des sensibilités différentes à la pollution du milieu.

* la multiplication du nombre des individus est indispensable pour avoir des données statistiquement exploitables : un nombre de cinq individus par lot est un minimum en dessous duquel il est difficile de descendre.

Le site de la Sarthe fait exception par rapport aux trois autres sites, compte tenu de l'absence de réponse des bivalves transférés, hormis pour deux individus plus sensibles. Ce résultat ne s'explique pas par une absence de contamination des sédiments. Il serait souhaitable de reprendre ce type d'étude, sur un plan analytique **et/ou** biologique, afin de **vérifier** ces résultats et les expliquer.