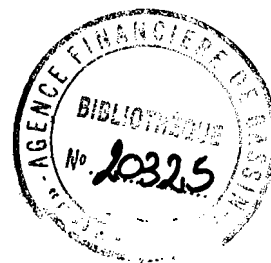


# SOMMAIRE



Pages

## I. INTRODUCTION

## II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

11.1. 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. 1.3. 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
11.2. FACTEURS MODULATEURS DES SYSTEMES ANTIOXYDANTS CHEZ LES MAMMIFERES.	17
11.3. LE STRESS OXYDANT CHEZ LES ESPECES AQUATIQUES.	22
11.3.1. Activités antioxydantes endogènes chez les espèces aquatiques.	22
11.3.2. Réponses des organismes aquatiques lors d'expositions à des sénobiotiques.	24
11.3.3. Intérêt des biomarqueurs de stress oxydant en écotoxicologie.	31

## III. MATERIEL ET METHODES

111.1. 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
111.1.3.3. 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

	111.2. Optimisation des méthodes de dosage - Conservation et protocole de préparation des tissus.	47
☑	111.21. Optimisation des méthodes de dosage.	47
	II.2.1.1. Activités enzymatiques.	47
	1121.2. Le glutathion.	49
☑	111.22. Conservation et préparation des tissus.	56
	11123.1. Conservation des tissus dans l'azote liquide.	56
	III.2.2.2. Choix d'inhibiteurs de protéases.	57

## IV. RESULTATS

☑	<u>1ère partie</u> : Activités enzymatiques et taux de glutathion dans les glandes digestives et les branchies d' <i>Unio tumidus</i> . 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).	59
	<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.3.3.3. 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.32 Essai définitif.	75

☑	V. DISCUSSION	80
---	---------------	----

	VI. CONCLUSION	88
--	----------------	----

	VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	90
--	----------------------------------	----

	VIII. ANNEXES	
--	---------------	--

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 OH), d'anions superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ) ou d'oxygène singulet ( $^1O_2$ ). 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°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.

## **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 serine-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 **évaluer** 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 mesures.

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 plus 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).

Les déplétions de ces activités antioxydantes semblent traduire des effets de toxicité induits par les **contaminants** et pourraient être utilisées 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.

3

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.