



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ CHADLI BENDJEDID D'EL-TARF

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Mer

*MÉMOIRE DE FIN D'ETUDE*

En vue de l'obtention d'un Diplôme de Master 2

Filière Hydrobiologie Marine et Continental

Spécialité : « Bioressources marines »

*THEME*

*Impact du Cadmium sur l'Acétyl  
cholinestérase (AchE) d'un poisson d'eau douce  
Cyprinus caprio (La carpe)*

Présenté Par : M<sup>elle</sup> Daoudi lamia

M<sup>elle</sup> Allam Ismahen

Devant le jury composé de :

Présidente :	M <sup>me</sup> Bezzazel N	MAA	Université Chadli Bendjedid-El Tarf
Examineur :	Mme Khati W	Pr	Université Chadli Bendjedid-El Tarf
Promoteur :	M <sup>me</sup> Gasmi Y	MCA	Université Chadli Bendjedid-El Tarf

Année universitaire : 2019/2020

## SOMMAIRE

**Résumé**

**Abstract**

**المخلص**

<b>Introduction</b> .....	01
<b>Chapitre I : Généralité sur ecotoxicologie et biomarqueurs</b> .....	04
1-1- Ecotoxicologie .....	04
1-2- Biomarqueurs .....	07
1-2-1- Les biomarqueurs de susceptibilité .....	07
1-2-2- Les biomarqueurs d'exposition .....	07
1-2-3- Les biomarqueurs d'effets .....	07
1-2-3-1- Les réactions de biotransformation.....	09
1-2-4- Les biomarqueurs enzymatiques.....	11
1-2-5- Les biomarqueurs non enzymatiques.....	16
1-2-5-1- Le glutathion .....	16
<b>2- Matériel et méthode</b> .....	<b>18</b>
2-1- Site d'étude .....	18
2-1-1- Description et localisation.....	18
2-1-2- Stratégie d'échantillonnage .....	19
2-2- Méthodes d'étude.....	19
2-2-1- Mesures biométriques des individus (poids et longueurs).....	19

---

2-2-2- Dosage des protéines.....	20
2-2-2-1-Principe .....	20
2-2-2-2-Mode opératoire .....	20
2-2-2-3- Calcul de la concentration .....	21
2-2-3- Dosage de l'activité acétylcholinestérase (AChE) .....	21
2-2-3-1- Principe.....	22
2-2-3-2- Mode opératoire .....	22
2-2-3-3- Calcul de la concentration .....	22
2-3-Analyse statistique .....	23
<b>3-Résultats .....</b>	<b>24</b>
3-1-Activité de l'acétylcholinestérase (AChE) .....	24
<b>Discussion.....</b>	<b>26</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>28</b>
<b>Les références bibliographiques</b>	
<b>Résumé</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>الملخص</b>	

## *Remerciement*

*Avant tout je remercie ALLAH le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a donné pour la réalisation de ce modeste travail.*

*J'adresse mes vifs remerciements à mon encadreur Madame. Gasmi qui a bien voulu dirigé ce travail, pour tous ses conseils, ses encouragements et la correction du manuel. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.*

*Je voudrais également remercier très chaleureusement les membres du jury qui m'ont honoré en acceptant d'évaluer ce travail :*

*-Mme Bezzazel en acceptant de présider le jury de soutenance*

*-Mm khati en examinant notre travail.*

*Je voudrais finalement remercier mes parents à qui je dois tant. Pour leur précieux soutien, leur encouragement et leur présence tout au long de mes études qu'ils trouvent dans ce travail, tout le respect et l'amour que je leur porte.*

*Merci à tous et à toutes*

*Jsmahane*

*Lamia*

## *Dédicaces*

*Aux personnes les plus chers à ma vie et je ne trouverai pas les mots pour exprimer tout leur amour, leur soutien moral et matériel, j'espère que j'ai pu satisfaire vos vœux et une partie de vos rêves. C'est grâce à vos prières que je suis arrivé à ce stade que dieu vous garde.*

*A Ma mère pour ses encouragements et son amour tout au long de ce travail*

*Un merci spécial à mon père , que Dieu ait pitié de lui*

*A mes sœurs Imen et Doua merci pour votre soutien moral.*

*A toute la famille « Daoudi ».*

*A ma chère amie :Hanene*

*Mille merci a mon fiancé ramzi*

*A mes chers cousines Nourhane ;Afef ;Zahra ;Amel ;Lobna*

*Un grand merci à mon binôme de terrain ismahene*

*A tous mes amis d'enfance et du long parcours Scolaire et Universitaire.*

*A tous les gens que j'aime et qui m'aiment.*

*Lamia*

## *Dédicaces*

*Aux personnes les plus chers à ma vie et je ne trouverai pas les mots pour exprimer tout leur amour, leur soutien moral et matériel, j'espère que j'ai pu satisfaire vos vœux et une partie de vos rêves. C'est grâce à vos prières que je suis arrivé à ce stade que dieu vous garde.*

*A Ma mère pour ses encouragements et son amour tout au long de ce travail*

*A Mon père qui ma accompagné par ces prières et son aide*

*A mes sœurs Aya ;Hala ;Nourlhouda merci pour votre soutien moral.*

*A mon marié moataz et tout sa famille mille merci.*

*A toute la famille «Allam ».*

*A ma chère amie:Hanene*

*Un grand merci à mon binôme de terrain lamia*

*A tous mes amis d'enfance et du long parcours Scolaire et Universitaire.*

*A tous les gens que j'aime et qui m'aiment.*

*ismahene*

## Liste des figures

N°de figure	Titre des figures	Page
Figure 1	Représentation des méthodologies permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques (modifié d'après un diagramme de Lagadic <i>et al.</i> , 1997).	6
Figure 2	Relations entre les principaux contaminants et les marqueurs biologiques (Narbonne, 1993)	8
Figure 3	Schéma des voies majeures conduisant à la détoxification et à la toxication des xénobiotiques organiques chez les animaux (selon Lagadic <i>et al.</i> , 1997).	10
Figure 4	Schéma général de la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les systèmes antioxydants cellulaires (selon Ritter <i>et al.</i> , 1999).	12
Figure 5	<i>Carte de situation géographique du lac Tonga</i> (Amriou, 2011).	18
Figure 6	photo des différentes mesures biométriques des carpe commune	20
Figure 7	Variations de l'activité de l'Acétylcholinestérase (nmol/min/mg de protéine) chez <i>cyprinus carpio</i> exposé à différentes doses de cadmium	25

### Liste des tableaux

<b>N°de tableau</b>	<b>Titre des tableaux</b>	<b>Page</b>
Tableau 1	Protocole utilisé pour le dosage des protéines.	21
Tableau 2	Variations de l'activité de l'Acétylcholinestérase (nmol/min/mg de protéine) chez <i>cyprinus carpio</i> exposé à différentes doses de cadmium	24

# Introduction

---

## Introduction

L'accumulation dans le milieu naturel de produits chimiques issus des activités humaines constitue une préoccupation majeure dans la surveillance de l'environnement. Actuellement, les gestionnaires de l'environnement et les scientifiques envisagent un contrôle strict de l'utilisation des ressources naturelles, telles que l'eau, qui tient compte du respect de l'ensemble des communautés vivant dans les écosystèmes aquatiques. Pour atteindre un tel objectif, il est donc important de disposer d'outils pertinents qui permettent de rendre compte de la qualité des écosystèmes et de la santé des communautés vivant dans ces écosystèmes.

Les bioindicateurs sont des variations mesurables au niveau des effectifs des populations (abondance et diversité d'espèces) sont écologiquement pertinents; toutefois, dans la mesure ou ils intègrent une multitude d'effets, ils sont peu sensibles et non spécifiques et donc difficiles à relier à un niveau ou un type de pollution.

Les biomarqueurs moléculaire et biochimique, sont en général plus sensibles que les paramètres mesurés au niveau de l'individu ou de la population (Stegman *et al.* 1992) ; de par leur plus forte sensibilité, Ils se présentent comme de meilleurs candidats pour l'établissement d'un lien entre la santé des organismes et les niveaux de pollutions ; Ils sont mesurés aux niveaux moléculaires, biochimiques et/ou physiologiques.

Les biomarqueurs présentent l'intérêt de pouvoir détecter des interactions polluant/organismes rapidement après exposition, et dans certains cas, de prédire des effets toxiques potentiels. Cette notion de précocité, lorsqu'elle est démontrée, présente un avantage certain pour la surveillance des écosystèmes dans la mesure où il est plus pertinent de prévenir des effets sur la santé des organismes et des écosystèmes plutôt que de les constater à posteriori.

L'acétylcholinesterase (AChE) est responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine et est donc une enzyme clé de la transmission cholinergique. Chez les poissons, comme chez les autres vertébrés, l'innervation motrice des muscles est cholinergique et il existe de nombreuses zones cholinergiques centrales, associées en particulier aux systèmes sensoriels. D'autre part, aux stades précoces du développement, de l'AChE est produite sans rapport avec une quelconque innervation cholinergique (revue dans Toutant et Massoulié, 1988). A ces stades, l'AChE

## Introduction

---

pourrait se comporter non comme une enzyme mais comme une molécule d'adhérence cellulaire par l'intermédiaire d'un domaine de la molécule présentant des homologies avec la glutactine et la neurotactine (Krejci et *al.*, 1991 ; DARBOUX et *al.*, 1996). Les plus efficaces de l'AChE sont les organophosphorés (OP) et les carbamates (CB), deux familles de composés anticholinestérasiques utilisées en agriculture comme insecticides et nématicides. L'inhibition de l'AChE chez l'adulte conduit à des troubles de la perception et à des paralysies musculaires, l'ACh en excès ayant pour effet de désensibiliser le récepteur à l'ACh postsynaptique en le maintenant en position fermée. Les concentrations d'inhibiteurs généralement utilisées en agriculture sont le plus souvent insuffisantes pour produire des troubles immédiats chez les vertébrés. Il n'en est pas de même en cas d'intoxication aiguë provoquée par une libération massive de nature accidentelle ou criminelle (gaz sarin du métro de Tokyo). Un aspect mal connu est celui des effets de l'exposition chronique à de faibles doses d'anti cholinestérasiques. Bien que les organophosphorés et les carbamates aient une demi-vie relativement brève, en particulier dans l'eau, les faibles concentrations mesurées sont compensées par la très forte toxicité des produits. De nombreux exemples ont été rapportés où l'inhibition de l'AChE reflète la contamination des eaux par les anti cholinestérasiques. C'est le cas en particulier chez les invertébrés marins et d'eau douce (revue dans Edwards et Fisher, 1991). Chez les poissons, la sensibilité aux OP et CB est soulignée par les accidents écologiques comme le déversement accidentel de 10 tonnes d'OP dans le Rhin après l'incendie des entrepôts Sandoz entraînant la mort de 220 tonnes d'anguilles sur 400 km de fleuve (Capel et *al.*, 1988). C'est aussi le cas pour des contaminations plus faibles telles que celles qui résultent des pratiques agricoles (Zinkl et *al.*, 1991). Dans le cas des poissons marins, GALGANI et *al.* (1992) ont noté une corrélation entre l'inhibition de l'AChE des muscles de limande et la localisation du point de capture sur un gradient de pollution comportant des organophosphorés en mer du Nord (German Bight Transect s'étendant de l'estuaire de l'Elbe au Dogger Bank). En Martinique où l'utilisation des OP et CB est massive (2t/km<sup>2</sup> contre 12kg/km<sup>2</sup> en métropole), il existe une corrélation entre l'activité AChE des muscles du poisson chirurgien (*Acanthurus bahianus*) et l'éloignement de la côte du site de capture (Bocquené, 1996). Il apparaît ainsi que l'étude de l'activité AChE peut être un bon marqueur de la contamination par les OP et CB, à la condition de respecter des protocoles précis pour l'extraction des tissus et le dosage de l'enzyme (voir Fairbrother et *al.*, 1991). En général, une connaissance approfondie de l'enzyme chez l'espèce choisie est indispensable.

## Introduction

---

Dans ce travail, nous nous sommes intéressées à la mise en évidence des réponses moléculaires et cellulaires adaptatives d'un organisme non visé « *Cyprinus caprio* » suite à des attaques radicalaires induites par une exposition à des concentrations sublétales d'un métal lourd le Cadmium.

## 1- Généralité

### Ecotoxicologie et biomarqueurs

#### 1-1- Ecotoxicologie

La surveillance de la contamination chimique dans un écosystème ne permet pas d'évaluer son impact sur les organismes, les populations et les communautés constitutives. La réponse des organismes à la contamination en terme d'effets sublétaux, ne peut être évaluée que par des mesures de paramètres biologiques, physiologiques ou biochimiques, selon une approche voisine de celle utilisée pour les diagnostics médicaux en clinique humaine ou vétérinaire. En effet, si l'écologie numérique détecte des modifications dans les communautés d'un écosystème, il est nécessaire de disposer d'indicateurs plus précoces révélant un risque de modification de l'écosystème. Pour développer des indices "cliniques" ou pour évaluer et prédire les atteintes des organismes en cas de contamination de leur environnement.

La plupart des tests biologiques disponibles en laboratoire pour estimer l'écotoxicité des composés chimiques (dits biotests) étaient limités soit à la toxicité aiguë, soit à des paramètres physiologiques non spécifiques (par exemple, les paramètres sanguins du métabolisme énergétique). Ces paramètres, n'étant pas liés directement à une pathologie cellulaire, n'avaient qu'une faible crédibilité en tant qu'indicateurs de contamination de l'environnement.

A partir des années 70, le développement de la toxicologie moléculaire, utilisant les outils de la biochimie et de la biologie moléculaire, a permis de progresser dans la connaissance des mécanismes de toxicité, principalement chez des mammifères modèles comme le rat. Par la suite, pour plusieurs polluants, des effets biochimiques relativement sensibles et spécifiques ont pu être mis en évidence chez des espèces possédant un intérêt écotoxicologique comme les oiseaux, les poissons ou les mollusques.

Parmi ces indices biochimiques, l'induction des métallothionéines par certains métaux et des activités monooxygénases liées au cytochrome P450 par certains composés liposolubles représentent une réponse adaptative à la présence de polluants. Les mécanismes de détoxification sont souvent mis en jeu avant la manifestation des effets toxiques. Ils peuvent donc fournir des indicateurs sensibles et, dans une certaine mesure, spécifiques.

## Généralité

---

Parallèlement, des techniques permettant de mesurer les effets sur certains processus comme la génotoxicité (Randerath *et al.*, 1981; Shigenaga et Ames, 1991; Chipman et Marsh, 1991; Bolognesi *et al.*, 1996; Swendberg, 1996; Morin *et al.*, 1998; Akcha *et al.*, 1999, 2003) ou l'immunotoxicité (Vos, 1980 ; Fisher, 1988 ; Auffret *et al.*, 2002 ) ont été développées.

Deux approches complémentaires sont utilisées de nos jours : la première est basée sur les communautés ou populations, il s'agit notamment des indices biocénétiques, qui de par la présence ou l'absence de telle ou telle espèce, nous renseignent sur l'état de santé d'un milieu (Ramade,1979), mais malheureusement *a posteriori*. La seconde approche est plus prédictive sur l'état de santé du milieu elle se situe au niveau de l'individu et concerne l'utilisation de biomarqueurs (fig 1).

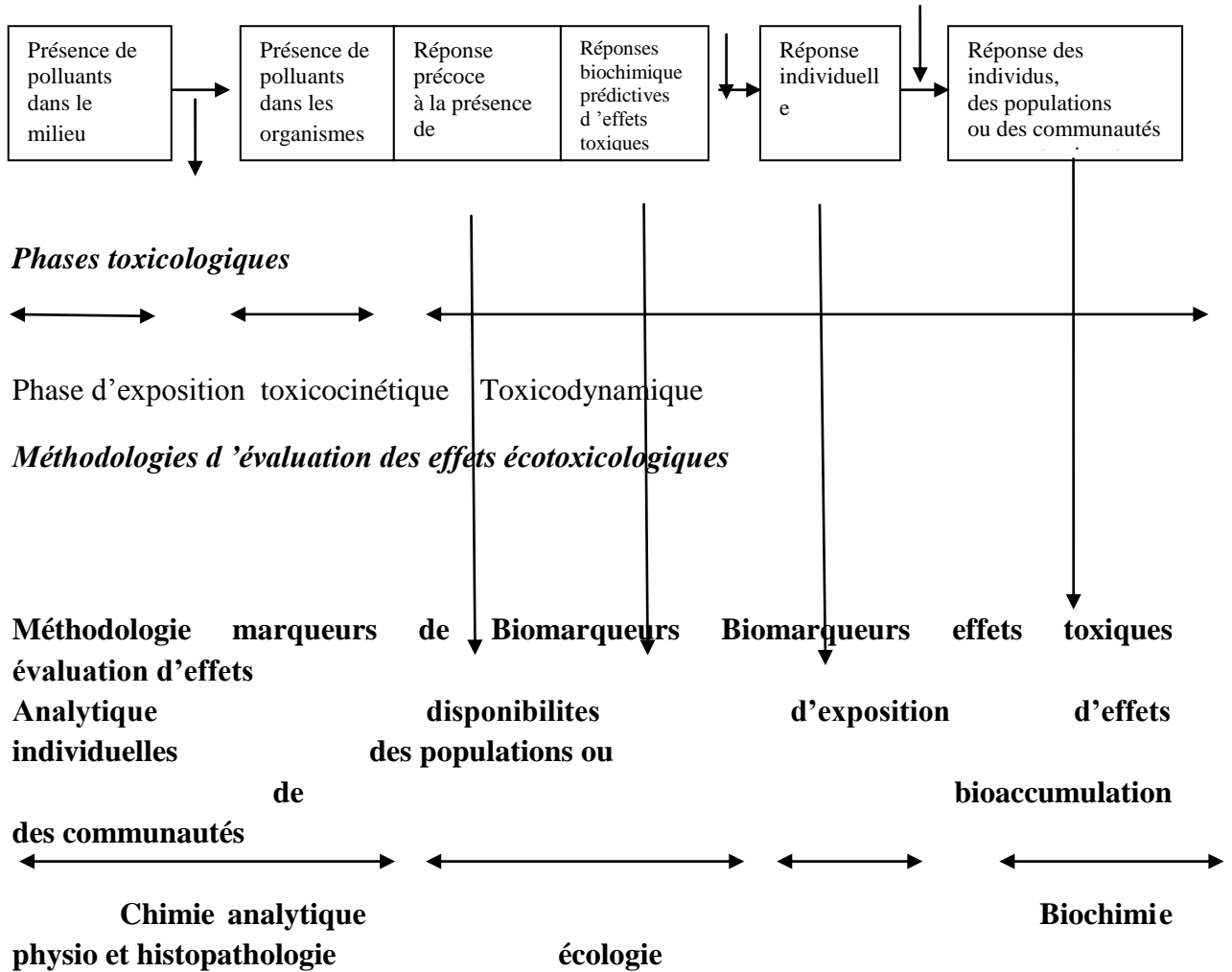
Au début des années 80, la notion de biomarqueur est apparue et désigne les changements biochimiques, physiologiques et histologiques chez les organismes susceptibles d'être utilisés comme organisme sentinelle pour estimer soit l'exposition à des contaminants, soit les effets induits par la pollution (Lagadic *et al.*, 1997).

# Généralité

## Événements écotoxicologiques

### Facteurs qui modifient la sensibilité

### des populations ou Biodisponibilité individuelle des communautés



### Disciplines correspondantes

**Figure1:** Représentation des méthodologies permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques (modifié d'après un diagramme de Lagadic *et al.*, 1997).

## 1-2- Biomarqueurs

### 1-2-1- Les biomarqueurs de susceptibilité

Peuvent correspondre à des molécules biologiques comme les protéines qui, lorsqu'elles sont sur-exprimées ou sous exprimées, augmentent la sensibilité d'un organisme à un contaminant. Ces variations d'expression peuvent être dues à des différences génétiques interindividuelles ou résulter d'une exposition précédente à un xénobiotique. Par exemple, un individu présentant une sur-expression du cytochrome CYP1A sera plus à même de développer des adduits à l'ADN lorsqu'il sera exposé à des HAPs (synthèse de métabolites hautement réactifs *via* le CYP1A) qu'un individu présentant une expression normale. Par contre, il pourra détoxifier plus efficacement d'autres xénobiotiques (ex.: aflatoxine) et leur sera donc plus résistant (Sheehan et Power, 1999,).

Ces outils peuvent être intégrés au sein de la stratégie de surveillance des milieux en complément avec d'autres outils chimiques.

Les organismes aquatiques (point de départ de la plus part des chaînes trophiques) sont les plus exposés à des pollutions multiples qui peuvent engendrer des effets néfastes sur les milieux naturels et avoir de graves conséquences sur la santé des populations animales et végétales ainsi que la santé humaine.

### 1-2-2- Les biomarqueurs d'exposition

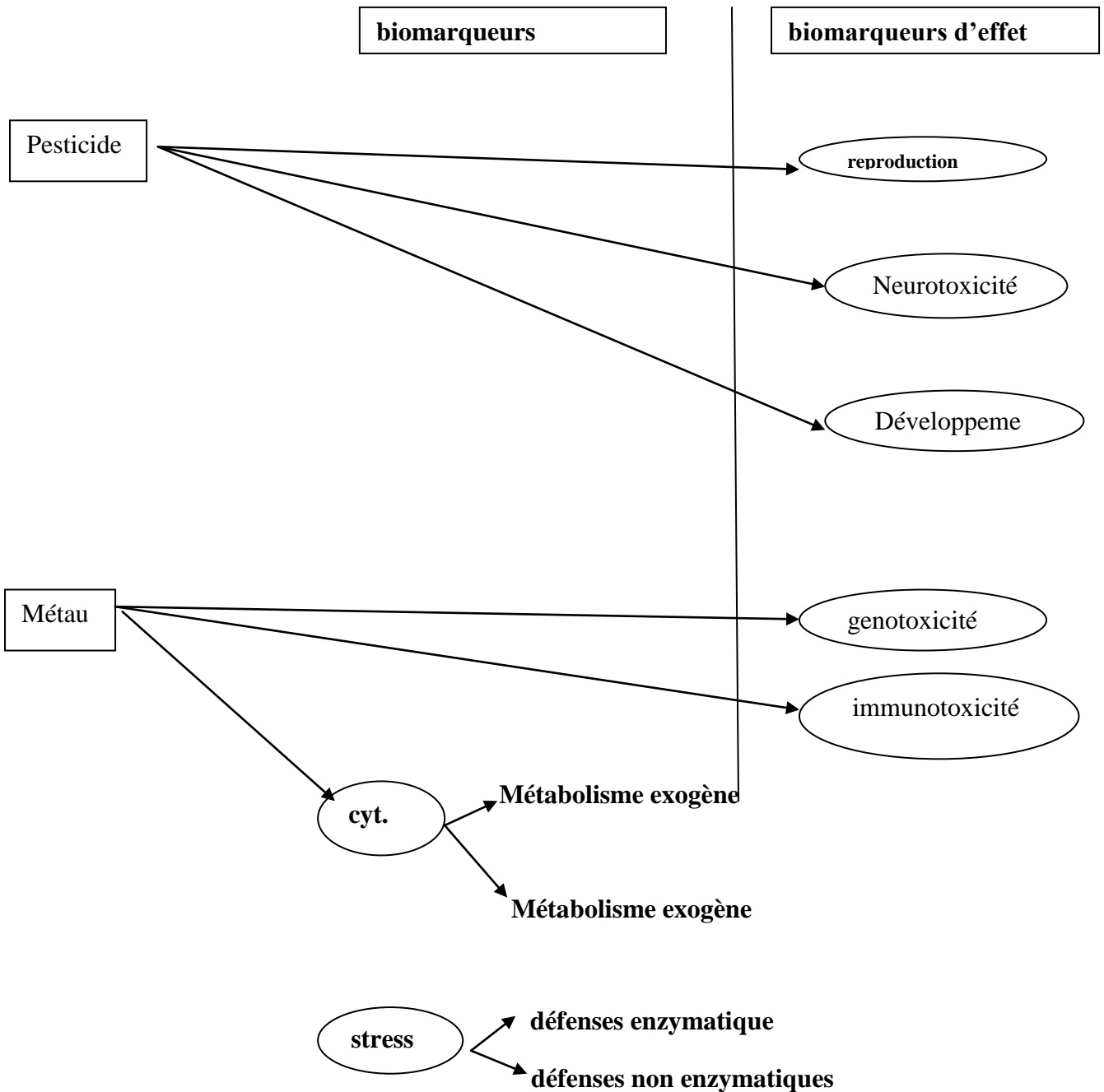
Témoignent de la présence du contaminant dans l'organisme, ce sont, par exemple, les mesures des teneurs en contaminants eux-mêmes ou en métabolites qui en sont dérivés. Cette notion de marqueur d'exposition s'est également étendue à la mesure de certains effets biologiques précoces ne présentant pas de toxicité immédiate pour les organismes comme par exemple l'induction de certaines activités enzymatiques sous l'effet des contaminants.

### 1-2-3- Les biomarqueurs d'effets

Révèlent l'action des contaminants par la mesure de modifications des paramètres biologiques ; ces derniers sont très nombreux et variés suivant le niveau biologique considéré (biochimique, cellulaire, physiologique,...) (fig.1 ).

# Généralité

Enfin, les biomarqueurs ne sont pas seulement limités aux études de laboratoire, ils sont également utilisés lors d'études *in situ*. Ils permettent donc de réaliser des études d'écotoxicité des substances chimiques «*chemical testing*» et de surveillance environnementale «*biomonitoring*».



**Figure 2:** Relations entre les principaux contaminants et les marqueurs biologiques (Narbonne, 1993)

## **1-2-3-1- Les réactions de biotransformation :**

Certaines substances xénobiotiques possèdent un caractère lipophile. Cette lipophilie leur confère la double capacité de franchir aisément l'ensemble des membranes cellulaires (épithélium intestinal, paroi vasculaire, membrane des cellules des organes cibles, épithélium des tubules rénaux,...) et d'être éventuellement stockées dans les structures lipidiques. En revanche, ces substances exogènes hydrophobes sont difficilement éliminées de l'organisme car les voies d'élimination (biliaire, rénale,...) utilisent un milieu aqueux.

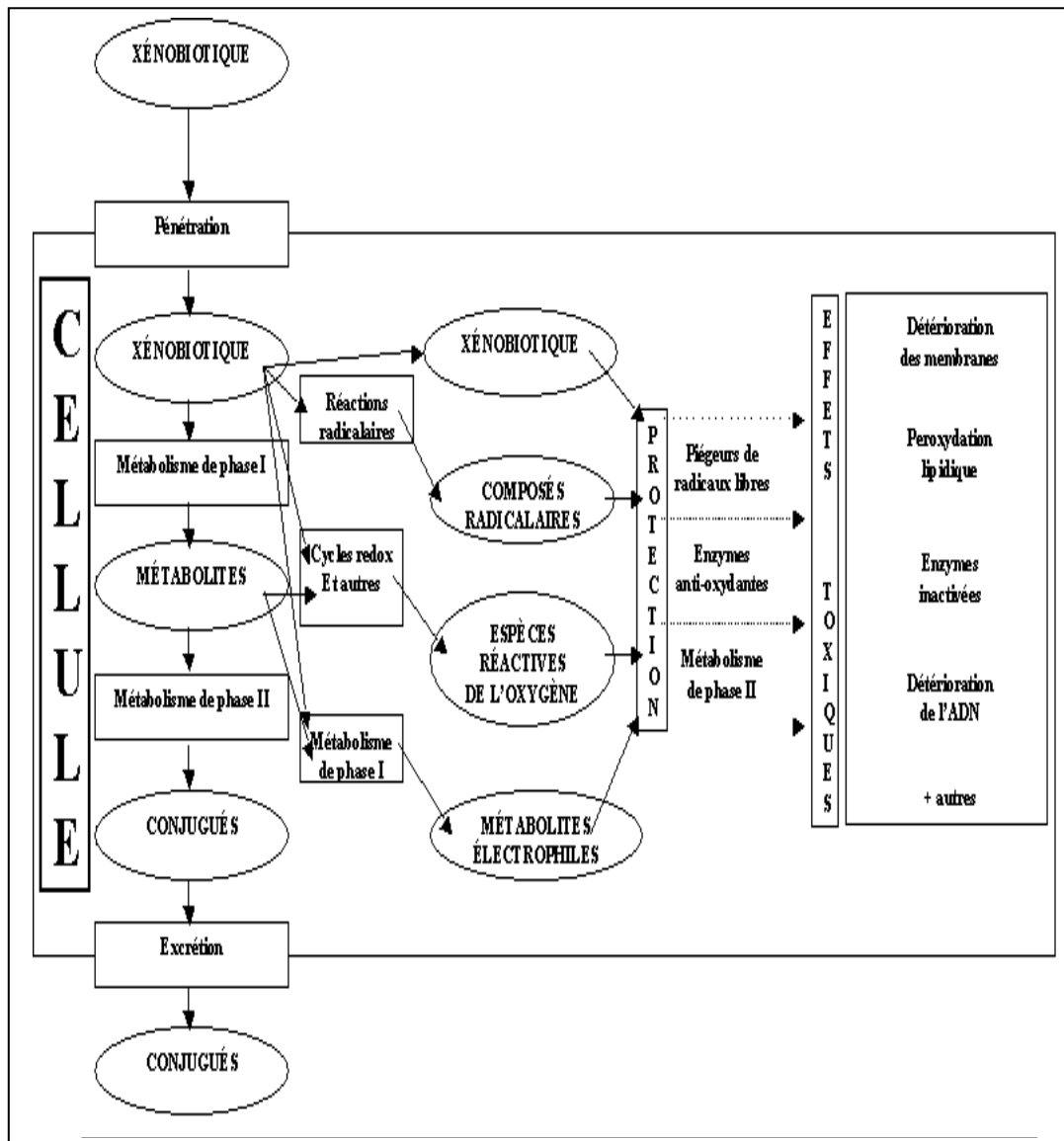
Dans la quasi-totalité des cellules, il existe des systèmes enzymatiques prenant en charge le métabolisme (généralement oxydatif) de multiples composés liposolubles endogènes (hormones, acides gras, cholestérol, vitamines,...). Cette fonction enzymatique porte le nom de biotransformation.

Ces systèmes enzymatiques prennent également en charge les xénobiotiques dans le but d'augmenter leur hydrosolubilité afin de faciliter leur excrétion dans les fluides biologiques (urine, bile, sueur,...).

Deux types de réactions interagissent dans les mécanismes de la biotransformation . Les réactions dites de phase I, localisées essentiellement au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, ont pour but de fixer un groupement fonctionnel à la molécule initiale. Le métabolite produit, rendu plus hydrosoluble, peut alors être pris en charge par les réactions de phase II. Ces dernières conjuguent le substrat fonctionnalisé à une petite molécule endogène (acide glucuronique, glutathion, sulfate, groupement méthyl,...).

La fonction de biotransformation correspond à une fonction biologique de défense de l'organisme et à ce titre elle est bénéfique. On parle ainsi de détoxification. Cependant, au cours des étapes de phases I et II, il peut se former des métabolites plus réactifs que la molécule initiale et potentiellement toxique pour la cellule. On désigne ce phénomène sous le terme de toxication. Ces métabolites actifs sont des électrophiles puissants qui vont pouvoir interagir avec les macromolécules cellulaires produisant ainsi des nécroses dans le cas des protéines et des lipides, ou des mutations éventuelles dans le cas d'interactions avec les acides nucléiques. Ces mutations peuvent être responsables de la phase d'initiation de la cancérisation.

Chez la plupart des mammifères, les deux voies majeures de conjugaison sont la sulfoconjugaison et la glucuronoconjugaison ; cette dernière peut représenter jusqu'à 70% des réactions de phase II. Les différents groupements conjuguants interviennent sous forme nucléotidique activée. La localisation hépatique est de loin la plus importante, bien que d'autres tissus puissent être le siège de conjugaisons (rein, intestin, peau,...). Au niveau cellulaire, les enzymes responsables de ces réactions sont pour la plupart localisées dans la fraction cytosolique



**Figure 3:** Schéma des voies majeures conduisant à la détoxification et à la toxication des xénobiotiques organiques chez les animaux (selon Lagadic et al, 1997).

Parmi les mécanismes de défense qui contribuent à la détoxification des espèces réactives, il est possible de distinguer des systèmes enzymatiques et des systèmes non enzymatiques. L'ensemble des mécanismes antioxydants enzymatiques ou non enzymatiques est résumé dans la Figure 3 qui illustre la complexité des réactions qui co-existent au sein de la cellule lors d'un stress oxydant. Il faut noter qu'il existe une répartition non équivalente des moyens de défense antioxydants dans les différents tissus. En effet, de nombreuses études rapportent que les moyens de défense antioxydants sont plus importants dans les organes « cibles » où s'accumulent les toxiques générateurs d'espèces réactives de l'oxygène comme le foie et les branchies plutôt que dans les muscles. De même, au niveau cellulaire, il existe une compartimentation intracellulaire des défenses antioxydantes, lesquelles agissent de façon coordonnée pour lutter contre les espèces radicalaires.

Les principaux systèmes de défense antioxydante ont été mis en évidence chez les invertébrés aquatiques (Winston et Di Giulio, 1991; Lemaire, 1993). En particulier, chez la moule *Mytilus edulis*, l'activité catalase (CAT) est principalement peroxysomiale, l'activité superoxyde dismutase SOD est cytosolique (SOD à cuivre et zinc) et mitochondriale (SOD à manganèse) et les activités de glutathion peroxydase (GPXs sélénium-dépendante et sélénium-indépendante) sont principalement cytosoliques (Livingstone, 1992). Les activités CAT, SOD et GPX sélénium-dépendante sont plus importantes dans la glande digestive que dans les branchies ou les tissus musculaires. De nombreuses études réalisées en laboratoire et sur le terrain, concernant les défenses anti-oxydantes et les enzymes détoxifiantes chez *Mytilus edulis*, montrent généralement des corrélations directes entre les défenses anti-oxydantes, les enzymes détoxifiantes, les dommages occasionnés sur les biomolécules et les xénobiotiques (Lemaire et al, 1994; Rodriguez-Ariza et al., 1993; Livingstone, 1998) mais aussi des corrélations avec les saisons (Sheehan et Power, 1999; Niyogi et al., 2001).

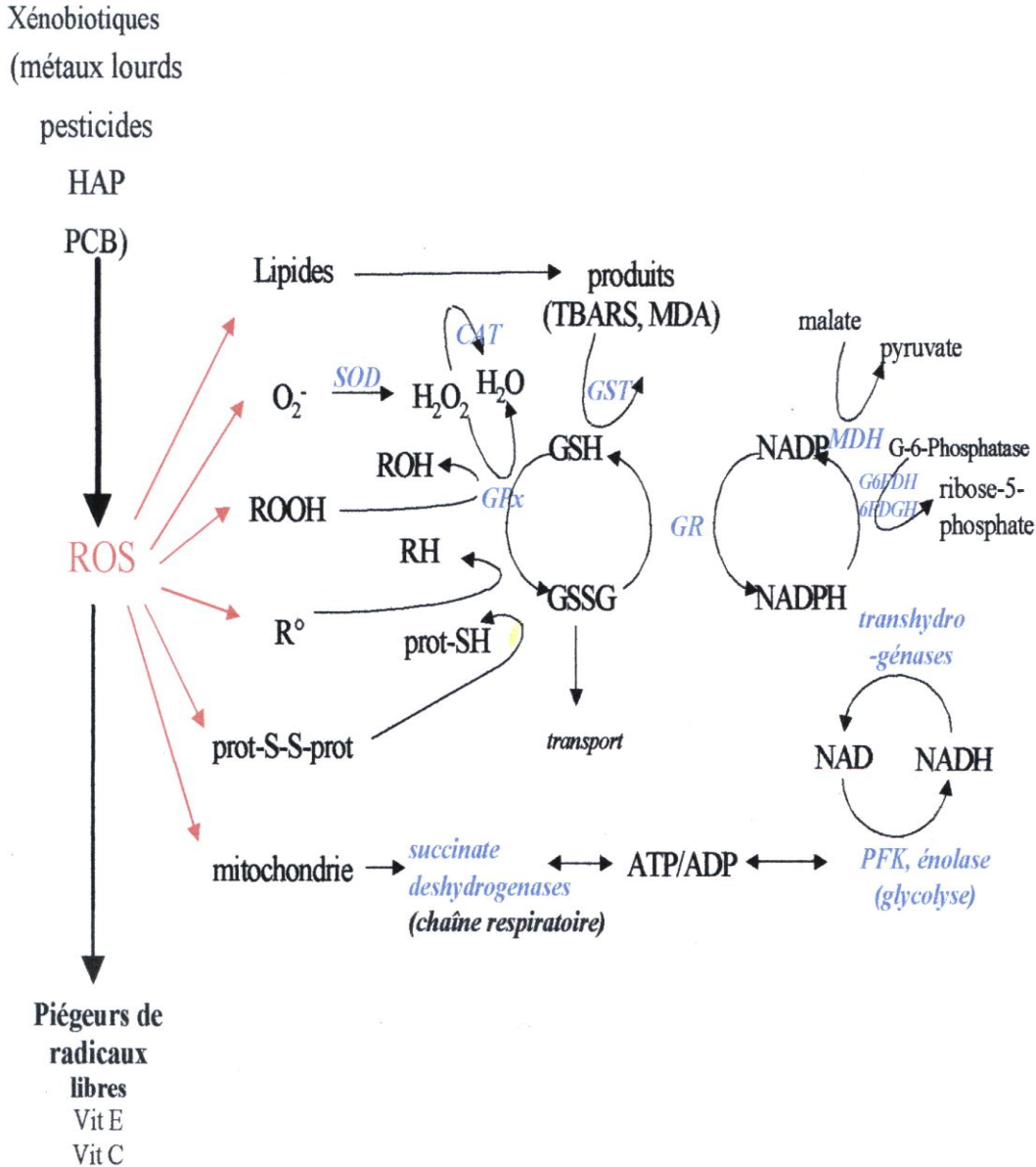
### **1-2-4- Les biomarqueurs enzymatiques**

#### **1-2-4-1- Les superoxydes dismutases (SOD)**

Regroupent dans leur classe des métalloenzymes capables de dismuter l'anion superoxyde. Elles possèdent au niveau de leur site actif un métal de transition qui peut être le cuivre, le manganèse ou le fer ; ce dernier, dans la réaction de dismutation, va capter un

## Généralité

électron de l'anion superoxyde et le transférer au noyau imidazole de l'une des histidines du site actif (Cossu *et al.*, 1997).



**Figure4:** Schéma général de la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les systèmes antioxydants cellulaires (selon Ritter *et al.*, 1999).

**GSH** : glutathion réduit ; **GST** : glutathion S-transférase ; **CAT** : catalase ; **SOD** : superoxyde dismutase ; **GPx** : glutathion peroxydase ; **GR** : glutathion réductase

Chaque métal présent dans le site actif va conférer des propriétés particulières à la SOD notamment en terme de localisation au sein de la cellule puisque la CuZn-SOD est localisée dans le compartiment cytosolique, les peroxysomes, les lysosomes et le noyau des cellules eucaryotes alors que la Mn-SOD est retrouvée au niveau de la matrice mitochondriale des eucaryotes (**Paoletti *et al.*, 1986**).

### **1-2-4-2- Les glutathions peroxydases:**

Il est possible de distinguer différentes glutathion peroxydases :

- Le glutathion peroxydase sélénium-dépendante (SeGPx) : c'est une métallo enzyme tétramérique de 80 kDa dont chaque sous unité contient un atome de sélénium sous forme de sélélocystéine (Halliwell et Gutteridge, 1999). Cette enzyme catalyse la réduction glutathion-dépendante de nombreux peroxydes (du peroxyde d'hydrogène aux peroxydes organiques) ; elle est présente dans le cytosol et dans la matrice mitochondriale où elle joue un rôle majeur dans la lutte contre les processus de lipoperoxydation endogène et exogène (Cossu *et al.*, 1997).
- La glutathion peroxydase sélénium indépendante est une enzyme dimérique d'environ 50 kDa ; elle est dépourvue de sélénium et ne peut réduire que les peroxydes organiques (Cossu *et al.*, 1997a).
- La phospholipide hydroxyperoxyde glutathion peroxydase (PLGPx) a été découverte dans le foie de porc. Le rôle principal de cette enzyme cytosolique monomérique de 22 kDa est la protection des liposomes et des biomembranes contre les dommages peroxydatifs du fait de sa capacité à réduire les hydroperoxydes phospholipidiques, les hydroperoxydes de cholestérol solubles, le cholestérol et les esters.

### **1-2-4-3- La glutathion-S-transférase :**

Les glutathions S-transférases (GST) sont des enzymes de métabolisation, dont la fonction est de conjuguer à une molécule de glutathion (qui possède un groupement nucléophile -SH) une grande variété de substrats (porteurs de groupements électrophiles) pour permettre leur élimination. Ce sont donc des enzymes de la phase II du métabolisme des xénobiotiques. Pendant cette phase II ou phase de conjugaison, les métabolites des xénobiotiques, déjà rendus moins hydrophobes par les réactions d'oxydation ou d'hydroxylation de la phase I, sont transformés en substances encore plus hydrosolubles. Ils

## Généralité

---

sont donc d'autant plus facilement excrétés (Habig *et al.*, 1974). La phase de conjugaison concerne aussi bien des molécules endogènes que des xénobiotiques comme les PCB, les HAP et les pesticides (Stien *et al.*, 1998). Des travaux plus récents ont également montré une activité peroxydase associée à cette enzyme et son rôle dans les systèmes de défense antioxydants via la détoxification des produits réactifs issus de la lipoperoxydation (Berhane *et al.*, 1994).

L'efficacité des GST est due au fait qu'un grand nombre de composés exogènes et endogènes ont les caractéristiques requises pour constituer un substrat approprié.

Ces enzymes sont généralement solubles (cytosoliques) et présentes sous plusieurs isoformes ; Chez la souris, la GST comporte 6 isoformes enzymatiques qui sont A, B, C, D, E et M. Ces enzymes constituent généralement 10% de la quantité de protéines extraites du foie de souris (Fleischneir *et al.*, 1976; Jakoby *et al.*, 1976, Jakoby *et al.*, 1980). Certaines isoformes sont inductibles par les contaminants qu'elles rendent moins toxiques. Cette particularité en a fait une activité intéressante en tant que marqueur biochimique. Les GST ont été mises en évidence dans la plupart des êtres vivants tels que la levure (Sheehan, 1999), les mollusques (Fitzpatrick *et al.*, 1997), les crustacés (Leblanc *et al.* 1994), les mammifères (Habig *et al.*, 1974). Les GST se trouvent dans tous les systèmes cellulaires, elles sont présentes dans le foie, les reins, les poumons, l'intestin, le sang et le cerveau (Hayes, 1984).

### **1-2-4-4- La glutathion réductase :**

La glutathion réductase (GR) est une flavoprotéine dimérique. Elle a un fonctionnement qui va de pair avec l'action des glutathion peroxydases puisqu'elle contribue au maintien à un niveau faible et constant du rapport GSSG/GSH par le maintien à une teneur élevée en GSH au sein de la cellule (Cossu *et al.* 1997)

### **1-2-4-5- La catalase**

La catalase (CAT) est une enzyme cytosolique inductible dont la fonction est de protéger les systèmes biologiques contre les espèces réactives de l'oxygène (Roméo *et al.*, 2000). Les catalases sont des hémoprotéines tétramériques qui, avec un atome de fer par sous-unité, ont une masse d'environ 240 KDa. Elles catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et en oxygène moléculaire. Très ubiquitaire, sa localisation peroxysomale fait de la

catalase une enzyme antioxydante complémentaire de la SeGPx contre la peroxydation induite par le peroxyde d'hydrogène (Cossu *et al.*, 1997).

Les catalases sont présentes dans tout le règne animal et se retrouvent aussi chez les végétaux. Elles sont sensibles à certains contaminants inducteurs de stress oxydatif au niveau des membranes cellulaires, comme les HAP, PCB ou certains pesticides (Livingstone, 1993) et les métaux (Labrot *et al.*, 1996a). Cependant, les résultats sont parfois contradictoires *in vivo*, certains auteurs montrent une induction de l'activité (Di Giulio *et al.*, 1989 et 1993), d'autres une inhibition (Labrot *et al.*, 1996a). Une des hypothèses retenue est que cette activité enzymatique serait très sensible aux facteurs environnementaux d'origine anthropique ou naturelle (Pellerin-Massicote, 1994) et pourrait résulter d'un équilibre fragile entre induction et inhibition par les composés à cycle redox.

### **1-2-4-6- Acétylcholinestérase (AChE) :**

L'acétylcholinestérase ne joue aucun rôle dans la détoxification chez les êtres vivants, contrairement aux systèmes enzymatiques que nous avons cité jusqu'ici.

Cette enzyme est pour sa part, impliquée dans les mécanismes de transmission de l'influx nerveux à travers l'organisme : dans les jonctions inter neuronale et neuromusculaire, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine (ACh), qui permet la transmission du message nerveux d'une cellule à l'autre. Une fois l'information transmise, l'acétylcholine est rapidement inactivée par l'AChE, ce qui permet au système de revenir à son état de repos.

L'inhibition de l'enzyme par de nombreux neurotoxiques entraîne une accumulation du médiateur chimique dans l'espace synaptique, qui maintient de ce fait une transmission permanente de l'influx nerveux, laquelle conduit généralement à la tétanie musculaire et à la mort (Bocquené, 1996).

Par définition, les cholinestérases (ChE) sont des enzymes qui catalysent préférentiellement les réactions d'hydrolyse des esters de choline. Les ChE sont divisées en deux groupes : (1) les acétylcholinestérases (AChE) qui hydrolysent les esters acétiques de choline, (2) les pseudo-cholinestérases qui hydrolysent préférentiellement les esters butyriques, propioniques ou succiniques de la choline.

Les principaux inhibiteurs des cholinestérases sont les inhibiteurs "organiques" d'origine anthropique: les pesticides organophosphorés qui inhibent de façon irréversible l'activité de l'AChE et les carbamates qui l'inhibent de façon réversible.

L'AChE présente chez les vertébrés un polymorphisme moléculaire important, polymorphisme qui résulte de différentes associations de la même sous-unité catalytique mais aussi de la nature de l'ancrage de l'enzyme aux structures synaptiques. Par contre chez les invertébrés, seules les formes globulaires composées de monomères, dimères et trimères de l'unité catalytique ont été identifiées. Parmi les composés neurotoxiques, les insecticides organophosphorés et les carbamates sont considérés comme les plus puissants inhibiteurs spécifiques de cholinestérase. Mais des mélanges d'hydrocarbures ont été aussi cités comme déprimant l'activité de l'AChE (Payne *et al.*, 1996).

Des études *in vitro* et *in vivo* menées sur des mammifères, des poissons ou des invertébrés ont relevé une inhibition de l'AChE par des métaux, parmi lesquels le cadmium (Schmidt *et* Ibrahim, 1994 ; Labrot *et al.*, 1996b).

### **1-2-5- Les biomarqueurs non enzymatiques**

#### **1-2-5-1- Le glutathion**

Le glutathion est un tripeptide (L-Y-glutamyl-L-cystéinyl glycine) qui joue un rôle central dans les processus de défense antioxydant intracellulaire (Arrigo 1999; Sies, 1999). C'est un antioxydant non enzymatique qui va, en piégeant les radicaux libres, intervenir à divers degrés en complément des enzymes antioxydantes.

Ce thiol non protéique abondant chez les organismes vivants dans sa forme réduite (GSH) va agir dans la cellule comme un donneur d'électron. La présence de glutathion sous sa forme oxydée traduit un stress oxydant. La réaction du glutathion avec les radicaux libres génère le radical thiol (GS) qui peut générer l'anion superoxyde, d'où la nécessité de maintenir, au niveau cellulaire, un rapport GSSG/GSH le plus faible possible. L'anion superoxyde sera pris en charge par le superoxyde dismutase. Il y a coopération entre les deux mécanismes.

## Généralité

---

Le GSH intervient également comme substrat des glutathion peroxydases en tant que donneur d'hydrogène. Le glutathion est également impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques. Il intervient dans la réaction catalysée par la glutathion-S-transférase où il est couplé au xénobiotique. Sous sa forme oxydée (GSSG), il peut réagir avec les molécules présentant un groupement-SH. Les protéines sont la cible de cette réaction. Cette réaction est à l'origine de l'inactivation des enzymes ou de leur perte de stabilité. Ceci pourrait expliquer le fait que la cellule tende à conserver un faible taux de GSSG dans les conditions physiologiques et que certains organes tel que le foie éliminent le GSSG en cas de stress oxydant (Cossu *et al.*, 1997).

Outre le GSH, il existe d'autres antioxydants non enzymatiques, leur pouvoir antioxydant réside dans leur capacité à piéger les radicaux libres par réduction: la vitamine E, la vitamine C, le B carotène et l'acide lipoïque.

## 2- Matériel et méthode

### 2-1- Site d'étude

#### 2-1-1- Description et localisation

Le Lac Tonga ( $36^{\circ}53' N$ ,  $08^{\circ}31' E$ ) s'étendant sur une superficie de 2500 ha (Belhadj et al, 2007) est l'un des sites Ramsar le plus important des zones humides d'Afrique du Nord (Boumezbear, 1993 ; Samraoui et De Belair, 1998). Il est situé à l'extrême Nord-est de l'Algérie et fait partie du parc national d'El-Kala classé parmi les aires protégées de la région méditerranéenne ayant la nomenclature de réserve de la biosphère. (Fig5)

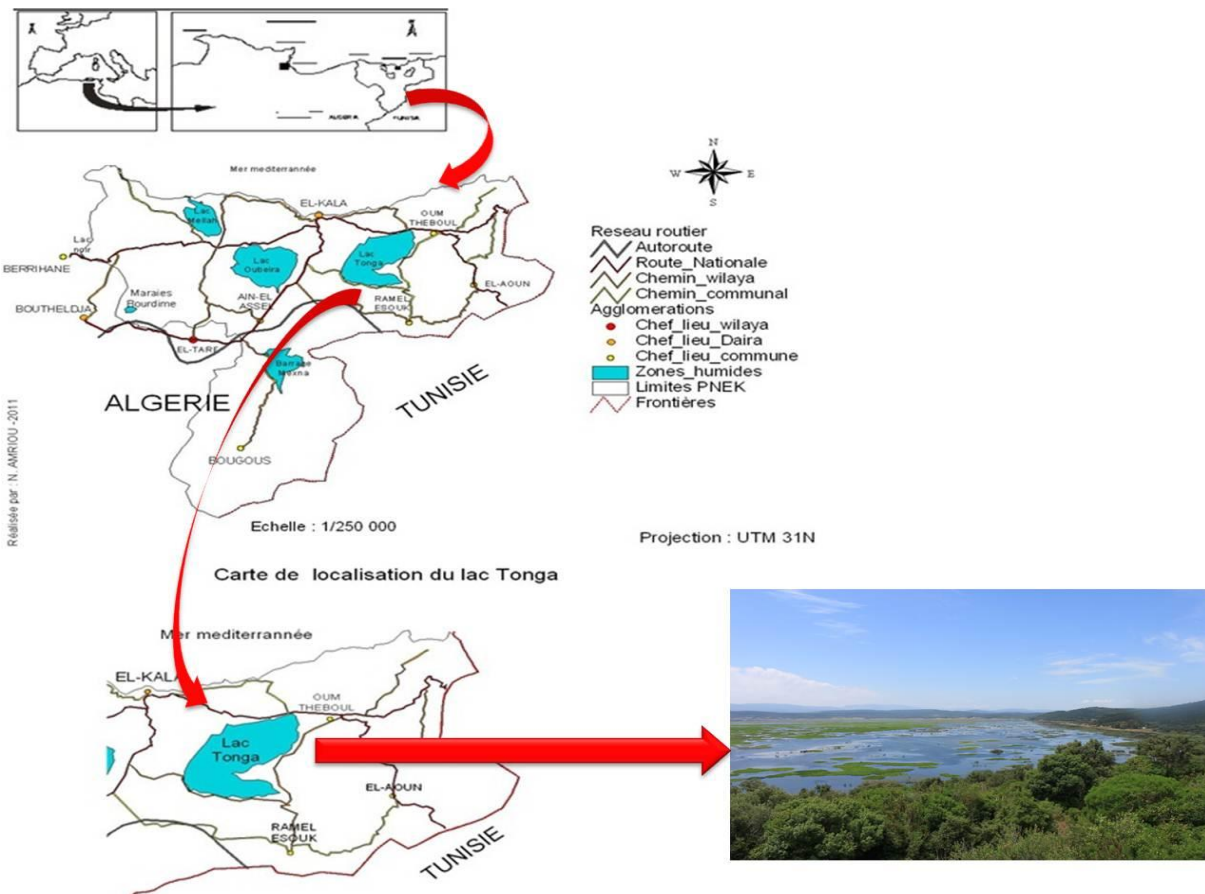


Figure5 : Carte de situation géographique du lac Tonga (Amriou, 2011).

Le Tonga est alimenté d'une part par de nombreux affluents (petits ravins) secs en été tout au long des rives Ouest et sud et d'autre part par à l'Est et au Nord Est par des oueds et de 02 sous bassins versants, celui d'oued EL Hout au sud et d'oued El Eurg au Nord ; L'exutoire du Tonga étant l'oued Messida (DGF, 2003).

### **2-1-2-Stratégie d'échantillonnage :**

Notre campagne d'échantillonnage s'est étalée de Un total de 30 individus de la carpe commune *cyprinus carpio* a été examiné, provenant lac Tonga.

Nous avons utilisé la technique de pêche passive : le filet est déposé verticalement à proximité de la station .Ce dernier à des mailles de 45 cm et 100m de longueur sur 10 m de largeur, Le lendemain le filet est récupérés avec les poissons. Les spécimens de la carpe commune *cyprinus carpio* ont été ramenés le plus rapidement possible au laboratoire .

### **2-2- Méthodes d'étude :**

A l'arrivée au laboratoire, Après quelques heures d'acclimatation des spécimens de l'espèce *cyprinus carpio* par leur maintien dans des aquariums (équipés de pompe à air et de diffuseur); les poissons sont par la suite divisés en 3 lots de 4 spécimens chacun ; la répartition sert à l'étude de l'impact d'un métal lourd le cadmium (aux doses finales de l'ordre de 1 µg/l et 5 µg/l à des temps d'exposition de 3h, 6h, 9h et 24h). Dans ce protocole expérimental il a été prévu un lot de poissons témoins.

#### **2-2-1-Mesures biométriques des individus (poids et longueurs)**

Avant de sacrifier la carpe, nous mesurons d'abord sa longueur totale à l'aide d'une règle graduée (fig 6.). La longueur totale correspond à la distance allant du museau à la pointe de la nageoire caudale (Renaud et *al.*, 1980) ; puis nous la pesons à l'aide d'une balance de précision (fig 6)



**Figure 6 :** photo des différentes mesures biométriques des carpe commune R

Après anesthésie à l'éther selon la méthode de Vivien (1941), le poisson est d'abord pesé à l'aide d'une balance de précision (Sartorius de précision 1/10 mg) puis fixé, en position dorsale sur une plaque de liège, à l'aide d'épingles par l'orifice buccale et la nageoire anale. La dissection est réalisée, à l'aide de ciseaux ; une incision est faite de l'orifice uro-génital jusqu'à la base des opercules ; puis après avoir rabattu sur le côté le tégument recouvrant la cavité générale nous dégageons le tube digestif afin de pouvoir accéder à l'hépatopancréas que nous prélevons à l'aide d'une pince fine. Le cerveau est récupéré après section des branchies et ouverture de la boîte crânienne.

Les organes prélevés sont d'emblé pesés à l'aide d'une balance de précision (Sartorius de précision 1/10 mg) et maintenus à basse température à l'aide de glace.

### **2-2-2- Dosage des protéines**

#### **2-2-2-1-Principe**

Les ions cuivriques, dans un milieu alcalin, interagissent avec les liaisons peptidiques des protéines formant un complexe coloré (Weichselbaum, 1964 ; Gornall et al., 1949).

#### **2-2-2-2-Mode opératoire**

Dans le tableau 1 figure le protocole de dosage des protéines.

## Matériel et Méthode

**Tableau 1 :** Protocole utilisé pour le dosage des protéines.

Réactifs	Dosage	Standard	Blanc
Homogénat	0,02 ml	–	–
Etalon		0,02 ml	
Chlorure de sodium	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Biuret	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

Mélanger et incuber pendant 10 min à 25°C, ensuite lire les absorbances contre le blanc à 550nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway 6105)

### 2-2-2-3- Calcul de la concentration

DO dosage

$$\text{Protéine g/l} = \frac{\text{DO dosage}}{\text{DO standard}} \times n \quad (\text{n valeur de l'étalon} = 60\text{g/l}).$$

DO standard

DO : densité optique

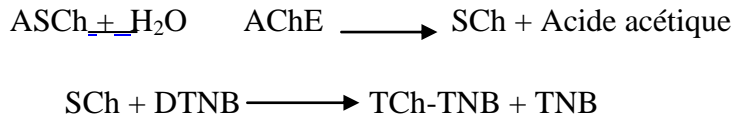
### 2-2-3- Dosage de l'activité acétylcholinestérase (AChE)

#### 2-2-3-1- Principe

Dans cette étude, la méthode utilisée pour le dosage de l'activité AChE est celle décrite par Ellman *et al.* ; (1961). C'est une méthode colorimétrique dont le principe est le suivant : l'acétylcholinestérase catalyse l'hydrolyse d'un ester de choline (Acétylthiocholine : ASCh). La thiocholine libérée réagit avec le 5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoate (DTNB) pour former le 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB), produit de couleur jaunâtre. L'intensité de coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente dans le milieu. La réaction peut se schématiser ainsi :

## Matériel et Méthode

---



### 2-2-3-2- Mode opératoire :

Dans les cuves sont introduits :

- 900  $\mu\text{l}$  de tampon Tris 100 mM, pH 7,5
- 50  $\mu\text{l}$  du réactif DTNB (0,008 M)
- 50  $\mu\text{l}$  du surnageant contenant l'enzyme sous forme d'extrait brut correspondant à une quantité de protéines de l'ordre de 0,1  $\mu\text{g/ml}$ .
- 50  $\mu\text{l}$  d'acétylthiocholine 8,25 mM, déclenchant la réaction enzymatique.

Les cuves ont été incubées à 25 °C et la densité optique a été suivie à 412 nm pendant 25 mn. Pour mesurer l'hydrolyse spontanée du substrat, l'échantillon a été remplacé par un volume équivalent du tampon afin de mesurer la variation de l'absorbance en absence de l'enzyme.

### 2-2-3-3- Calcul de la concentration

L'activité AChE peut être calculée selon l'équation suivante :

$$\text{activité } (\mu\text{mol/ mn mg prt}) = \frac{(\Delta DO / \text{mn} \times 1000)}{(\epsilon \times V \times p)}$$

-DO/mn = Variation de densité optique par minute.

-V = Volume de l'échantillon en ml

-P = mg de protéines /ml de S9

$-\epsilon$  = coefficient d'extinction molaire de l'acétylcholinestérase égal à 13,6 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

### **2-3-Analyse statistique**

Les calculs ont été réalisés à l'aide d'un logiciel d'analyse et de traitement statistique des données, « Minitab » (eds, 2004). Les résultats sont exprimés en moyenne plus au moins l'écart type ( $m \pm s$ ) ; les moyennes obtenues pour chaque dosage ont été comparées deux à deux en utilisant le « test t de student ».

# Résultats

## 3-Résultats

### 3-1-Activité de l'acétylcholinestérase (AChE)

Les résultats du dosage de la teneur en AChE chez les poissons exposés au cadmium font apparaître que cette enzyme montre des activités qui varient en dent de scie chez les poissons traités par la dose 5µg/l ; c'est en revanche, chez le lot traité par la dose de 1 µg/l de cadmium que l'activité de l'AChE présente des augmentations progressives en fonction de la durée d'exposition (Tab.2).

L'analyse statistique des données révèle l'absence de différences significatives entre les valeurs de l'activité de l'AChE chez les lots témoins et celles du lot exposé à 1µg/l. C'est toutefois chez les poissons exposés à 5µg/l pendant plus de 6 h qu'une différence significative (T vs 5µg/l,  $p < 0.01$  à 6, 9 et 24h) est observée (Tab2; fig7)

**Tableau2:** Variations de l'activité de l'Acétylcholinestérase (nmol/min/mg de protéine) chez *cyprinus carpio* exposé à différentes doses de cadmium

Lots	témoin	Exposé à 1µg/l	Exposé à 5µg/l
Durée d'exposition	n= 4	n= 4	n= 4
0h	0.083±0.010	0.083±0.010	0.083±0.010
3h	0.089±0.005	0.086±0.005	0.094±0.021
6h	0.096±0.024	0.106±0.009	0.083±0.0527*
9h	0.105±0.022	0.137±0.005	0.079±0.017 *
24h	0.154±0.028	0.163±0.014	0.117±0.018 *

NS : non significative ; \* :  $p < 0.05$  : variation significative

## Résultats

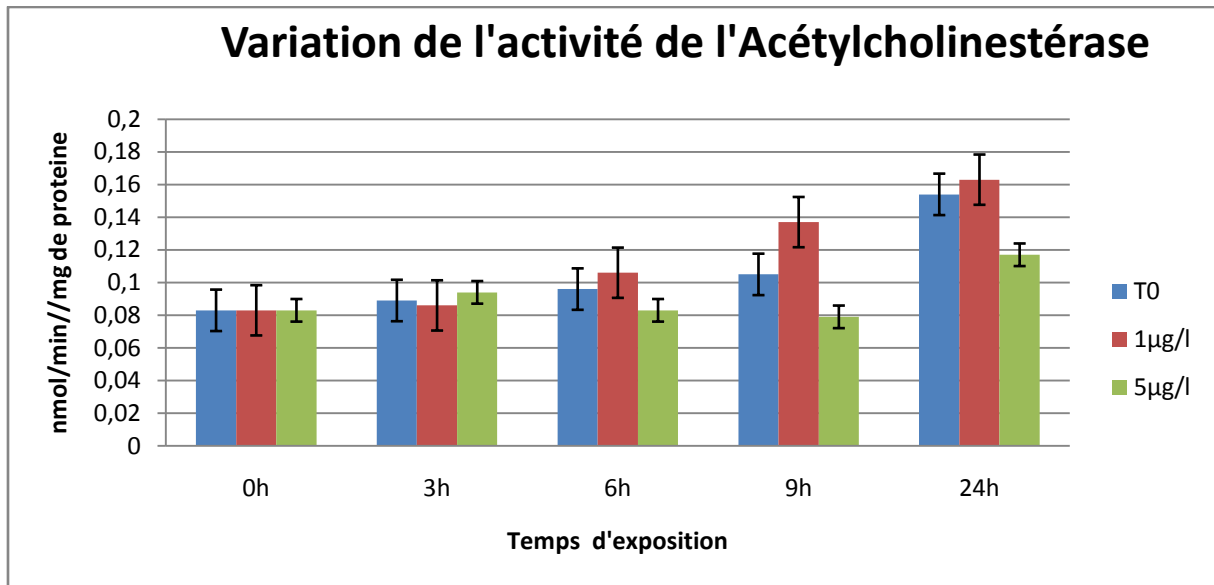


Figure 7: Variations de l'activité de l'Acétylcholinestérase (nmol/min/mg de protéine) chez *cyprinus carpio* exposé à différentes doses de cadmium .

### 3-Discussion

Les résultats du dosage de la teneur en AChE chez les poissons exposés au cadmium font apparaître que cette enzyme ne montre pas de différences significatives entre les valeurs de l'activité de l'AChE chez les lots témoins et celles du lot exposé à 1µg/l. C'est seulement chez les poissons exposés à 5µg/l pendant plus de 6h qu'une différence significative est observée. Devi et Fingerman (1995) rapportent que l'exposition des poissons « *Procanbarus clarkii* » au cadmium et au plomb provoque une inhibition de l'activité de l'AChE. Des inhibitions importantes de cette activité sont obtenues après administration du cadmium à des rats mâles ; selon Carageorgiou *et al.*, (2004), ces inhibitions peuvent modérer les mécanismes cholinergiques du SNC et peuvent entraîner une excitabilité neuronale .

La mesure de l'activité d'AChE a été utilisée comme biomarqueur pour d'autres xénobiotiques tels que les pyréthroides (utilisés dans les produits domestiques de la lutte contre les insectes) et accessoirement les métaux lourds (Amiard, 1990).

L'altération de l'activité de l'AChE (inhibition) bloque la transmission de l'influx nerveux au niveau des divers types de synapses cholinergiques . Sa mesure au niveau cérébral est depuis longtemps proposée chez les invertébrés pour évaluer les conséquences de l'exposition à certains insecticides (Ramade, 1964). Elle a été ensuite préconisée comme indicateur spécifique de la présence d'insecticides organophosphorés et de carbamates dans des biotopes terrestres abritant des populations d'oiseaux (Ludke *et al.*, 1975; Zinkl *et al.*, 1977 ; Mineau et Peakall, 1987). Cette activité a aussi été utilisée chez les poissons pour évaluer l'exposition de peuplements lagunaires consécutive à des campagnes de traitements, contre des gîtes larvaires de moustiques, par des insecticides organophosphorés. Fulton et Key (2001) ont réalisé une mise au point sur l'utilisation de la mesure de l'inhibition de l'AChE cérébrale pour apprécier l'impact de l'exposition de populations de poissons à ce type de pesticides ; les premiers changements observés concernent surtout le comportement tel que l'agitation et la perte d'équilibration ; ceci est suivi d'augmentation du rythme respiratoire superficiel avec une plus grande amplitude operculaire. Ces observations étaient semblables à celles rapportées par Silva *et al.*, (1993) sur une espèce de poisson du genre *Callychitis* exposés au folidol.

## Discussion

---

Selon Forget *et al.* (2001) ont également montré que presque tous les contaminants testés, seuls ou en mélange ont un effet inhibiteur sur l'activité de l'AChE du copépode.

Actuellement, il existerait, dans la littérature, une certaine polémique, concernant l'ampleur de la dépression de l'AChE exigée pour causer la mort chez les organismes aquatiques. Chez les poissons, la plupart des évaluations se situent dans la gamme de réduction de 70 à 85 % d'AChE cérébrale (Coppague *et al.*, 1974 ; Richmonds *et al.*, 1992). Une inhibition rapide de l'AChE cérébrale à 30% est induite dès le 7<sup>ème</sup> jour par le méthyl parathion ; cette inhibition constitue le principal mécanisme de l'action toxique de méthyl parathion (Frawley *et al.*, 1952 ; McCollister *et al.*, 1959 ; Atterberry *et al.*, 1961 ; Gaines *et al.*, 1967 ; Banas et Sprague, 1986 ; Carr et Chambres, 1991 ; Nostrandt *et al.*, 1997). Des résultats similaires sont rapportés chez l'anguille européenne *Anguilla anguilla* exposée au thiocarbamate ; cette dernière montre, après 4 jours d'exposition, une inhibition de l'AChE de l'ordre de 20% (Fernandez-Vega, *et al.*, 2001).

Il existe une relation dose-réponse entre le niveau d'exposition à un organophosphoré et le taux d'inhibition de l'activité acétylcholinestérasique ; il existe également une relation entre le taux d'inhibition de l'AChE cérébrale et la nature et l'ampleur des effets toxiques qu'il s'agisse d'effets sublétaux physiologiques et comportementaux ou d'effets létaux découlant du blocage des synapses cholinergiques. La toxicité des organophosphorés est liée à l'étendue de l'inhibition de l'AChE dans les différentes parties du système nerveux (Galgani *et al.*, 1999).

Le pouvoir toxique des organophosphorés change considérablement ; cela est dû à un certain nombre de facteurs liés à l'affinité du composé parent, et / ou à son métabolite, parce que l'AChE est une cause déterminante importante de ce pouvoir toxique. L'affinité obligatoire est déterminée par les caractéristiques structurales et stériques caractéristiques de la molécule (Gallo et Lawryk, 1991 ; Maxwell et Lenz, 1992).

# Conclusion

---

## Conclusion

Cette étude est une contribution à la mise en évidence des réponses moléculaires et cellulaires adaptatives d'un organisme non visé « *Cyprinus caprio* » suite à des attaques radicalaires induites par une exposition à des concentrations sublétales d'un métal lourd le Cadmium.

Les résultats obtenus ont montrés que l'exposition des poissons (*Cyprinus caprio*) au cadmium induisant :

- 1) Une inhibition de l'activité de l'AChE suggérant une altération de la transmission neuronale

Ce résultat fait apparaitre l'efficacité du processus adaptatif (enzymatique) de ce poisson vis-à-vis des agressions chimiques

## En perspectives :

Il serait intéressant d'étudier GSH,GST, Catalase et de compléter cette étude par le dosage d'autres biomarqueurs tels que :

- 1) La SOD enzyme clé impliquée dans le mécanisme de la dimutase des anions superoxydes (O<sup>-2</sup>) radical libre très actif
- 2) L'EROD qui reflète l'activité du cytochrome P450
- 3) La métallothionéine pour la mesure de la contamination par les métaux.

## R Références Bibliographiques:

---

### (A)

**Akcha, F., Vincent Hubert, F., and Pfol-Leszkowicz, A.,2003.** Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutation Research*, 534, 21-32.

**Akcha, F., Burgeot, T., Venier, P., and Narbonne, J. F.,1999.**Relationship between kinetics ofbenzo[a]pyrene bioaccumulation and DNA binding in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62, 455-62.

**Amiard ,J.C. 1990.** Défense et illustration de l'écotoxicologie .Journal de recherche oceanographique 15(3-4) 92-95

**Arrigo, A. P. 1999.** Gene expression and the thiol redox state .Free Rad. Biol. Med. 27: 936-944

**Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C., and Moraga, D.2002.**Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Marine andEnvironmental Research*, 54, 585-589.

### (B)

**Banas,W.P., Spargue, J.B., 1986.** Absence of acclimation to parathion by rainbow trout during sublethal exposure water Res.20. 1123-1229

**Berhane, K. Widersten, M. Engstrom, A. Kozarich,J.W. and Mennervick, B.1994.** Detoxication of base propenals and other a,b- unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferase. Proc.Natur.Aca.Sci USA 91:1480-1484

**Bolognesi, C. R., R. , Roggier, P.,1996,** Genotoxicity biomarkers in *M. galloprovincialis* as indicators of marine pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **113C**, 319-323.

**Bocquené, G. 1996.** L'acétylcholinestérase marqueur de neurotoxicité. Application à la surveillance des effets biologiques des polluants chez les organismes marins .Thèse de doctorat, école pratique de Hautes études.250p

### (C)

**Carr, R.L., Chambres, J.E., 1991.** Effets aigus de paraxon d'organophosphate sur le comportement programme commandé et activité d'esterase chez les rats : rapports dose-réponse. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 40.929-936

**Carageorgiou,H.,Tzotzes,V., Pantos,C. Mourouzis,C.Zarros,A.Tsakiris,S. 2004.** In vivo and invitro effects of cadmiums on adult rat brain total antioxidant status

## R Références Bibliographiques:

---

,acetylcholinesterase ,(Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>) ATPase and Mg<sup>2+</sup> ATPase activities : protection by L-cysteine .Basic Clin Pharmacol Toxicol 94(3) : 112-8

**Chipman, J. K., and Marsh, J. W.,1991.**Bio-techniques for the detection of genetic toxicity in the aquatic environment. *Journal of Biotechnology*, 17, 199-208.

**Coppague, D.L., Matthews, F., 1974.** Short term effects of organophosphate pesticides on cholinesterase of estuarine fishes and pink shrimp. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 11:483

**Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M. C., Babut, M., Exinger, A., and Vasseur, P.,1997.** Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38, 122-31.

**Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M. C. and Vasseur, P., 1997a.** Mécanismes de formation des espèces relatives de l'oxygène. Biomarqueurs de stress oxydant chez les animaux aquatiques .In Biomarqueurs en Ecotoxicologie.Aspects fondamentaux. L

### (D)

**Devi ,M., Fingerman ,M., 1995.** Inhibition of acetylcholinesterase activity in the central nervous system of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*, by mercury cadmium and lead ,Bull. Environ. Contam.Toxicol.55(5) 746-50

**Di Giulio, R. T., Washburn, P. C., Wenning, R. J., Winston, G. W. and Jewell, C. S.,1989,**Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8, 1103-1123.

**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 fish. *Aquatic Toxicology*, 26, 1-22.

### (E)

**Ellman G.L.,Courtney K.D., Andres V.,Featherstone R.M. 1961.** Biochem. Pharm.7:88-

### (F)

**Fisher, W. S.,1988.** Environmental influence on bivalve haemocyte function.*American Fisheries Special Publication*, 18, 225–237.

**Fitzpatrick, P. J., O'Halloran, Sheehan, D., Walsh, A.R.,1997.** Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gills and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.), as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers*, 2, 51-56.

## R Références Bibliographiques:

---

**Forget, J., Bocquené G., Leboulenger F., 2001.** Thème 1: Impact des contaminants présents en estuaire de Seine sur les fonctions neuromusculaires et reproductrices du copépode *Eurytemora affinis*. Seine-Aval 2, p1-11.

**Fleischneir, G. , Kamisaka, M., Gatmaintan, Z., and Arias,I. 1976.** Immunologic studies of rat and human ligand, in glutathione metabolism and function, ed, by Arias, I.M and Jakoby, W.B. Ravens press, New York, 259-265

**Fulton , M.H., Key, P.B., 2001.** Acetylcholinesterase inhibition estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects .*Environ. Toxicol. Exp. Ther.* 105:156-165

### (G)

**Gallo, M.A., Larwryk,N.J. 1991.** Organic Phosphorus Pesticides n: Hayes,W. (eds) , Handbook of pesticide Toxicology, Vol II Academic Press, New York ,PP 917-1090

**Gornall, A.C., Bardawill, C., David, M.M. 1949.** *Biol.chem.* 177-751

### (H)

**Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1999.** Free Radicals in biology and Medicine. Thrid Edition. New York. Oxford university Press Inc.

**Habig, W.H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B. 1974.** the first enzymtic step in mercapturic acidformation. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130-7139.

**Hayas, J.D. 1984.** Purification and characterization of Glutathione S transferase P.S and N. isolation from rat liver of Ybi Yn the existence of was predicted by subunit hybridization in vitro . *Biochem. J.*, 224,839-858

### (J)

**Jacoby, W.B., and Habig, W.H.1980.** Glutathione transferase in enzymatic basis of detoxication. Academic press, Inc, Vol II,63-94

**Jacoby, W.B., Kamisaka, K., Ketley, J.N and Habig, W.H.1976.** Rat Glutathione S transferase: Binding and physical propertie , in glutathione metabolism and function, ed. By Aris, I. M. and Jakobey, W. B., Raven Press, NEW YORK, 213-223

## R Références Bibliographiques:

---

### (L)

**Labrot, F.R.D., Tisnerat, G, Cabridenc, R, Narbonne, J.F.,1996a.** Le plomb dans l'environnement : sources, mécanismes de transfert et effets biologiques. Dans: "Aspects analytiques du plomb dans l'environnement" .coordonateur M. Morlot, Lavoisier Tec & Doc éditions, 3-15.

**Lemaire, P. L. D.,1993.** Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. *Trends in Comparative Physiology*, 1, 1119-1150.

**Lemaire, P., Matthews, A., Forlin, L., and Livingstone, D.R.,1994.** Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*) and perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26, 191-200.

**Le Blanc, G. A., Stuart, J. D., Dunn, S. E., and Baldwin, W. S.,1994,** Effect of the plant compound indole-3-carbinol on hepatic cholesterol homeostasis. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 633-9.

**Livingstone, D., Lips F, Garcia Martinez P, Pipe RK,1992.** Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 112, 265-276.

**Livingstone, D., 1993.** Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 57, 195-211.

**Ludke, J.L., Hill, E.F., Dieter. M.P.1975.** Cholinesterase (ChE) response and related mortality among birds fed ChE inhibitors. *Arch. Enviro. Contam. Toxicol.* 3: 1-21

### (M)

**McCollister, D.D., Oyen, F., Rowe, 1959.** Etude toxicologiques de O<sub>2</sub>, O-phosphorothioate diméthylque de O<sup>-</sup> (2,4,5 trichlorophenyl) (ronnel) chez les animaux de laboratoire. *J. Agri. Nourriture Chem.* 7. 689-693.

**Morin, B., Bubb, W. A., Davies, M. J., Dean, R. T., and Fu, S.,1998.** 3-Hydroxylysine, a potential marker for studying radical-induced protein oxidation. *Chemistry and Research Toxicology*, 11, 1265-1273.

### (N)

**Narbonne, J. M. X.,1993.** Use of biomarkers in assessment of contamination in marine ecosystems. Fundamental Approach and Applications, *MAP Technical Reports Series*, 71, 1-20.

## R Références Bibliographiques:

---

**Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., and Datta, A. G.,2001.** Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with

**Nostrandt,C.A.,Padilla.S., Moser,V.,1997.** Le rapport du chlorpyrifos oral :effets sur le comportement ,cholinesterase inhibition et densité muscarinie de récepteur chez les rats .*Pharmacol.Biochimie.Behav.*58.15-23

### (P)

**Payne, J., Fancey L. L., Rahimtula A. D. and Porter E. L.,1996.**Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 86, 233-245.

### (R)

**Rodriguez-Ariza, A., Martinez-Lara, E., Pascual, P., Pedrajas, J. R., Abril, N., Dorado, G., Toribio, F., Barcena, J. A., Peinado, J., Pueyo, C., and et al.,1993,** Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *The Science of the Total Environment*, Suppl 1, 109-16.

**Randerath, K. R., M, Gupta RC.,1981.**32P-postlabeling analysis for DNA damage. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, **78**, 6126-6129.

### (S)

**Sies, H.C. 1999.** Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.*27:916-921

**Stien,X., Percic, P., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M., and Lafaurie, M., 1998.** Evaluation of Boimarkers in caged fishes and Mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. *Environment Pollution* 99: 339-345.

**Schmidt, G. H., Ibrahim, N. M. M.,1994.** Heavy metals content (Hg<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>) in various body parts: impact on cholinesterase activity and binding glycoproteins in the grasshopper *Aiolopus thalassinus* adultes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*,29, 149-164.

## R Références Bibliographiques:

---

**(W)**

**Winston, G.W., and Di Giulio, R.T.,1991.**Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquaticorganisms.*Aquatic Toxicology*, 19, 137-161.

**(Z)**

**Zinkl, J.G., Lockhart, W.L., Kenny, S.A., WARD, F.J 1991.**The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. *In: Cholinesterase-Inhibiting Insecticides* (Mineau P., ed.), pp.233-254. New York: Elsevier

**Zinkl,J.G., Henny, C.J., DeWeese,L.R.1977.** Brain cholinesterase activities of birds from forests sprayed with trichlorfon

## Résumé

Cette étude est une contribution à la mise en évidence des réponses moléculaires et cellulaires adaptatives d'un organisme non visé « *Cyprinus caprio* » suite à des attaques radicalaires induites par une exposition à des concentrations sublétales d'un métal lourd le Cadmium.

Les résultats des dosages des biomarqueurs montrent que les teneurs de ces derniers varient en fonction de la dose et la durée d'exposition aux xénobiotiques.

Les résultats du dosage de la variation en AChE chez les poissons exposés au Cd font apparaître que cette enzyme ne montre pas de différences significatives entre les valeurs de l'activité de l'AChE dans les lots témoins et une différence significative pour le lot traité 5µg/l pendant la durée d'exposition 6h.

## **Abstract**

This study is a contribution to the demonstration of the adaptive molecular and cellular responses of a non-target organism "Cyprinus caprio" following radical attacks induced by exposure to sublethal concentrations of a heavy metal Cadmium.

The results of the assays of the biomarkers show that the levels of the latter vary according to the dose and the duration of exposure to xenobiotics.

The results of the determination of the variation in AChE in fish exposed to Cd show that this enzyme does not show any significant differences between the values of the activity of AChE in the control batches and a significant difference for the treated batch 5 µg / l during the exposure period 6 hours.

## ملخص

هذه الدراسة هي مساهمة في توضيح الاستجابات الجزيئية والخلوية التكيفية لكائن غير مستهدف " Cyprinus caprio" بعد الهجمات الجذرية الناجمة عن التعرض لتركيزات شبه مميتة من معدن ثقيل كاديوم. تظهر نتائج فحوصات المؤشرات الحيوية أن مستويات هذه الأخيرة تختلف باختلاف الجرعة ومدة التعرض للأجانب الحيوية. أظهرت نتائج تحديد التباين في إنزيم الأستيل كولينستيريز في الأسماك المعرضة للكاديوم أن هذا الإنزيم لا يظهر أي فروق ذات دلالة إحصائية بين قيم نشاط إنزيم الأستيل كولينستيريز في دفعات التحكم وفرق معنوي للدفعة المعالجة 5 ميكروغرام / لتر خلال فترة التعرض 6 ساعات.