

Réponses des activités antioxydantes érythrocytaires du loup (*Dicentrarchus labrax*) à des modifications expérimentales de paramètres chimiques ou physiques du milieu

Responses of blood antioxidant activities in sea bass (Dicentrarchus labrax) to chemical or physical environmental factors

Hélène Roche*, Gérard Bogé**

*Institut Michel Pacha, Université Lyon 1, Corniche Michel Pacha, 83500 La Seyne-sur-Mer, France.
Adresse actuelle : Université Paris Sud, Laboratoire d'écologie et de zoologie, URA CNRS 2154, Bât. 442,
91405 Orsay Cedex, France.

**L.E.P.I., Université de Toulon et du Var, Département de biologie appliquée, BP132, 83957 La Garde Cedex, France.

Mots clés : poisson, sang, activités antioxydantes, stress.

Key-words: fish, blood, antioxidant activities, stress.

RÉSUMÉ

Roche H., G. Bogé, 1996 - Réponses à des activités antioxydantes érythrocytaires du loup (*Dicentrarchus labrax*) à des modifications expérimentales de paramètres chimiques ou physiques du milieu. Mar. Life 6 (1-2) : 53-61.

Des loups (*Dicentrarchus labrax*) ont été soumis à des intoxications chimiques (sels métalliques, produits organiques), ou à des modifications de facteurs physiques du milieu (chocs hypo-osmotiques ou hyperthermiques). Des réponses enzymatiques spécifiques de la protection cellulaire contre les radicaux libres de l'oxygène (SOD, catalase et peroxydases) ont été analysées dans les érythrocytes. Les réponses de type stress ont été caractérisées par des indicateurs comme la cortisolémie, la glycémie, la teneur en hémoglobine et le taux d'hématocrite. Une analyse statistique a été réalisée sur une population de 640 poissons environ. Les valeurs individuelles sont réparties selon une distribution normale ou logarithmo-normale. L'intoxication aiguë comme les modifications intenses de la salinité et de la température produisent une augmentation systématique de la cortisolémie et de l'activité superoxyde dismutase totale. Ces deux paramètres ainsi que, dans une moindre mesure, l'activité peroxydase totale, pourraient être proposés comme bioindicateurs des perturbations environnementales.

ABSTRACT

Roche H., G. Bogé, 1996 - [Responses of blood antioxidant activities in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to chemical or physical environmental factors]. Mar. Life 6 (1-2) : 53-61.

Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) were submitted to chemical intoxication (metallic or organic compounds) or physical stress (decrease of salinity, increase in temperature). Specific red blood cell responses of enzymes involved in the protection against active oxygen species (SOD, catalase and peroxidase activities) were analysed. Stress responses were also ascertained by the investigation of stress plasma indicators such as cortisol, glycemia, haemoglobin content and hematocrit. A valuable statistical analysis has been carried out on about 640 fishes. The distribution of the values obeys a normal or log-normal relationship. Acute intoxication as sudden changes in salinity and temperature result in a general increase of cortisolemia and enhancement of superoxide dismutase activity. Pooling the results obtained on treated fish (physical or chemical treatment) shows that cortisolemia, SOD activity and, in a lower extent, peroxidase activity could be taken as potent bioindicators of environmental perturbations.

INTRODUCTION

Pour assurer la protection et la surveillance du milieu marin, on a classiquement recours à des analyses physico-chimiques effectuées sur l'eau, les

sédiments ou la matière vivante, et dont les résultats sont comparés à des normes internationales. Cependant, ces analyses sont maintenant jugées insuffisantes et l'on estime qu'elles doivent être complétées par l'évaluation de réponses biologiques signifi-

ficatives d'organismes marins représentatifs (Adams *et al.*, 1989). On appelle biomarqueurs de tels paramètres biologiques et certains sont déjà intégrés dans des programmes de "biomonitoring" (Lafaurie, 1991).

Ces biomarqueurs sont utilisés comme des signaux indiquant la présence dans le milieu de molécules étrangères susceptibles d'exercer, à plus ou moins long terme, des effets toxiques. Il s'agit le plus souvent de réponses qui se manifestent à l'échelle des populations, des organismes ou des cellules, et se traduisent par des effets de nature écologique, physiologique ou biochimique (Bogé *et al.*, 1991). Au niveau des organismes, les réponses les plus étudiées sont celles d'activités enzymatiques de détoxification, l'exposition d'espèces aquatiques à des contaminants entraînant une stimulation de ces processus de protection cellulaire. Certaines activités, comme celle des enzymes de détoxification des hydrocarbures polycycliques (HPA), ont été largement validées. On peut citer notamment l'EROD (Ethoxyresufurine o-deethylase) dont la synthèse est induite lors d'une exposition des animaux à ce type de molécules (Lange *et al.*, 1992 ; Lemaire *et al.*, 1992 ; Brumley *et al.*, 1995). D'autres activités pourraient présenter le même intérêt et notamment celles des enzymes de détoxification des dérivés actifs de l'oxygène (ou radicaux libres) (Livingstone *et al.*, 1992). C'est sur ces dernières qu'ont porté nos travaux.

Les radicaux libres sont libérés lors des réactions "d'oxydation" et "d'oxygénation". Ils sont caractérisés par la présence d'un électron non apparié qui leur confère une très grande réactivité biologique. On distingue l'anion superoxyde O_2^{\ominus} , le radical perhydroxyle HO_2^{\ominus} , le radical hydroxyle OH^{\ominus} et le singulet d'oxygène O_2^{\ominus} . Ces espèces moléculaires sont produites spontanément dans les cellules au cours des réactions métaboliques impliquant l'oxygène, ou accidentellement lors de la métabolisation de substances dont la structure est proche de celles de composés biochimiques. C'est en particulier ce qui se produit lors des réactions de biotransformation de nombreux composés organiques (Lemaire *et al.*, 1994).

Ces dérivés exercent des effets toxiques par destruction de l'ADN (Quinlan, Gutteridge, 1988), désactivation enzymatique (Whiteside, Hassan, 1988), oxydation hormonale (Misra, Fridovich, 1972), altérations membranaires telle que la peroxydation des lipides (Sevanian, Hochstein, 1985) ou des dommages oxydatifs des protéines, responsables des phénomènes de sénescence cellulaire (Pryor, 1977).

Les systèmes de détoxification contre les formes actives de l'oxygène font intervenir des antioxydants enzymatiques ou non enzymatiques. Les principaux mécanismes de défense enzymatiques sont constitués par des superoxyde dismutases et des peroxydases (Winston, Di Giulio, 1991). L'activité des enzymes érythrocytaires impliquées dans le métabolisme des dérivés actifs de l'oxygène et donc de la protection cellulaire a fait l'objet de nos

études. Ce sont les superoxyde dismutases (SOD) et les peroxydases. Les SOD sont des métalloenzymes caractérisées par la nature du métal présent au niveau de leur site actif (Cu, Zn, Mn ou Fe), les Cu-Zn SOD et les MnSOD se trouvant respectivement dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Les peroxydases catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène, avec oxydation d'un substrat. Cette famille enzymatique comprend, entre autres, les catalases et la glutathion peroxydase (GSH-Px). L'activité intra-érythrocytaire de ces enzymes a été mesurée chez le loup (*Dicentrarchus labrax*) au cours de programmes d'écophysiologie et d'écotoxicologie. L'érythrocyte de poisson est une cellule nucléée riche en organites cellulaires qui, comme toutes les cellules soumises à des teneurs élevées en oxygène, est pourvue d'un tel système de défense.

Schématiquement, nos travaux ont concerné trois aspects de la régulation de ces activités : les fluctuations naturelles (origine, alimentation, biotope, passé récent) ; l'incidence de modifications imposées des facteurs normaux de l'environnement (chocs thermique et osmotique) et les effets d'agressions chimiques (déversement de produits chimiques, intoxications). Pour l'analyse présentée ici, les facteurs comme la saison, la concentration des polluants, les durées d'intoxication, ont été intégrés ou confondus afin de déceler les effets les plus généraux. Parallèlement, l'étendue des populations expérimentales (plus de 640 poissons) a permis d'effectuer un regroupement des résultats chez les animaux témoins permettant la définition de certaines valeurs physiologiques de référence (Roche, 1995). Nous nous proposons d'exposer ici les analyses statistiques et leurs conclusions afin d'engager une réflexion sur la proposition et la validation des enzymes de détoxification des radicaux libres en tant que bioindicateurs de toxicité. Les valeurs numériques ont fait l'objet d'une publication précédente (Roche, Bogé, 1996).

Parallèlement à l'étude des effets de ces intoxications, nous avons entrepris une recherche concernant l'incidence de la modification de facteurs normaux du milieu. Il est en effet indispensable de connaître le degré de spécificité des réponses étudiées, en particulier vis-à-vis de la température et de la salinité. Pour ce faire, nous nous sommes intéressés aux répercussions d'une élévation rapide de la température de + 10°C et d'une diminution brutale (de 37 à 5 g.L⁻¹) de la salinité.

Nous avons également étudié l'évolution d'autres paramètres sanguins connus en tant que marqueurs de stress, comme la cortisolémie, la glycémie pour ce qui concerne les paramètres plasmatiques, l'hématocrite et les teneurs en hémoglobine pour les mesures hématologiques. L'intoxication chimique au même titre que d'autres modifications des facteurs environnementaux peut être considérée comme un facteur potentiel de stress, et l'évaluation de ces paramètres devrait permettre d'en déterminer l'importance.

Cette analyse porte sur 644 individus. L'importance de cet effectif a permis de réaliser une analyse statistique des données portant, non seulement sur l'influence des traitements, mais également sur l'incidence du mode de stabulation des poissons témoins.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Conditions expérimentales

Le modèle marin est le loup (*Dicentrarchus labrax*). Les poissons sont âgés de 1 à 3 ans et pèsent entre 50 et 200 grammes. Ils ont pour origine commune l'élevage de l'IFREMER, à Palavas (France). Ils ont été soit capturés directement dans l'élevage où ils étaient maintenus en cages flottantes dans un étang, soit transférés au laboratoire où ils ont été répartis selon le type d'expérience dans des bassins de 5 à 7 m³ (charge en poissons de 0,7 g.L⁻¹) ou dans des "petits" bacs (expérimentaux) de 150 et 300 L (5 à 10 poissons) (charge en poissons de 1 à 5 g.L⁻¹).

Les modifications des paramètres physiques du milieu ont été obtenues comme suit : l'eau de mer (salinité 37 g.L⁻¹, température 13°C±1) des bacs de contention des poissons (200 litres) a été remplacée en 1 heure par de l'eau de mer à 23°C pour le stress thermique, ou diluée en 2 heures jusqu'à la salinité de 5 g.L⁻¹ pour le stress osmotique.

Les produits testés sont des sels métalliques et des produits organiques. Le regroupement des données a été réalisé en fonction des familles chimiques des toxiques. Le détail des concentrations létales en un ou plusieurs jours selon les toxiques, a été présenté antérieurement (Roche, 1995 ; Roche, Bogé, 1996). Trois groupes ont donc été constitués :

1) les *sels métalliques* : sulfate de cuivre, chlorure de zinc et bichromate de potassium (CL50 comprises entre 100 et 500 mg.L⁻¹) ;

2) les *composés phénoliques* : le phénol et des phénols monosubstitués [o,m,p-hydrophénols, alkylphénols (méthyl-, éthyl-, propyl-), o,m,p-nitrophénols] (concentrations létales en 2 h comprises entre 0,6 et 50 mg par g de poisson) ;

3) *divers produits organiques* : cette troisième classe a une définition plus large : elle est constituée de produits organiques non phénoliques comme le MS222, le chlorhydrate d'aniline et l'atrazine.

Deux modes d'intoxication ont été retenus :

- une intoxication par voie générale, les toxiques étant dissous dans l'eau des bacs et la solution renouvelée aux deux tiers tous les jours. Les concentrations de toxiques sont comprises entre le dixième et le millième de la CL50 ;

- une intoxication par injection intra-abdominale, pratiquée avec les produits phénoliques. Les concentrations des solutions sont comprises entre le centième et la moitié de la concentration létale en 2 heures.

Méthodes de dosage

Les techniques de dosage ont été largement décrites et commentées précédemment (Roche, 1995). Brièvement, les prélèvements sanguins sont réalisés par ponction caudale sur le poisson immobilisé en l'absence d'anesthésique. Le sang est collecté dans des tubes contenant de l'EDTA à l'aide de seringues héparinées. L'hématocrite et le taux d'hémoglobine total sont déterminés immédiatement. Les érythrocytes sont isolés par centrifugation et lavés avec une solution de NaCl isotonique au plasma (1 %) puis traités de manière à obtenir un hémolysat homogène. La glycémie est mesurée par la méthode directe de Hugget et Nixon (1957) à la glucose oxydase. Le dosage du cortisol est réalisé en RIA (Radio Immuno Assay) d'après la technique adaptée par Sumpter *et al.* (1986) au plasma de salmonidés. La teneur en hémoglobine est déterminée par la méthode standardisée à la cyanméthémoglobine utilisant la solution de Drabkin (Van Kampen et Zijlstra, 1961). L'activité peroxydase totale est estimée par le test au gaïacol (George, 1953). L'activité de la catalase est mesurée par la cinétique de disparition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 240 nm (Beers et Sizer, 1952) et l'activité de la GSH-Px totale en suivant l'oxydation du NADPH en présence de glutathion réductase, avec l'hydroperoxyde de cumène comme substrat (Tappel, 1978). L'activité des SODs est mesurée grâce à leur capacité d'inhiber la réaction d'oxydation de l'adrénaline par l'anion superoxyde (Misra, Fridovich, 1972) ou par une technique de bioluminescence faisant intervenir le luminol comme producteur de lumière et le système enzymatique hypoxanthine-xanthine oxydase comme fournisseur d'anions superoxydes (Bensinger, Johnson, 1981). La MnSOD est mesurée en présence de cyanure de potassium (1mM) qui inhibe de manière sélective la Cu,Zn-SOD. Toutes les activités enzymatiques sont rapportées à la teneur en hémoglobine. Les analyses statistiques sont réalisées avec le programme Statview installé sur un micro-ordinateur Macintosh.

RÉSULTATS

Les animaux témoins

L'analyse descriptive des données obtenues sur l'ensemble des témoins est réalisée à l'aide d'une représentation par "box-plots" (figures 1a et 1b). Elle permet de visualiser la répartition des valeurs individuelles et de positionner la moyenne statistique. On observe ainsi que 50 % des valeurs se trouvent à l'intérieur de la "boîte" et 20 % à l'extérieur des bornes supérieures et inférieures. Lorsque la moyenne délimite deux ensembles symétriques, c'est le cas pour la glycémie, les activités SODs (SOD et MnSOD) et la glutathion peroxydase (GSH-Px), cela signifie que la répartition des valeurs individuelles est normale ou gaussienne. En revanche, pour

d'autres paramètres, particulièrement pour la cortisolémie, la répartition n'étant pas gaussienne, les "box plots" sont dissymétriques et l'étalement des valeurs individuelles est très prononcé.

Nous avons constaté qu'il était toutefois possible de normaliser l'ensemble des résultats en utilisant le log des valeurs individuelles. Ainsi, après transformation, la majorité des points est dans la "boîte", et la répartition est plus resserrée et plus symétrique (figures 2a et 2b).

Les conditions de stabulation

Avant d'aborder l'étude des effets des traitements nous avons montré que les paramètres sanguins sont peu influencés par les conditions de stabulation des poissons. Pour cela, nous avons comparé les moyennes des paramètres sanguins des animaux provenant de l'élevage ou de bacs expérimentaux.

L'hématocrite, le taux d'hémoglobine, la glycémie, la cortisolémie (Figure 3a), les activités superoxyde dismutases totales (SODs) et mitochondriale (MnSOD), les peroxydases totales, catalase et glutathion peroxydase (GSH-Px) (figure 3b) ont des niveaux très proches qu'ils s'agissent des poissons issus des bacs expérimentaux (B) ou des viviers (V) ou directement capturés dans l'étang d'élevage (E).

Les animaux traités

Nous venons de montrer (cf.- Les animaux témoins) que les mesures sanguines étaient réparties de manière normale ou logarithmo-normale. De ce fait, l'utilisation des tests paramétriques est admis ; nous avons effectué des ANOVA pour comparer l'effet des traitements.

Les conclusions de cette analyse sont présentées sur les tableaux I et II. Sur ces tableaux sont

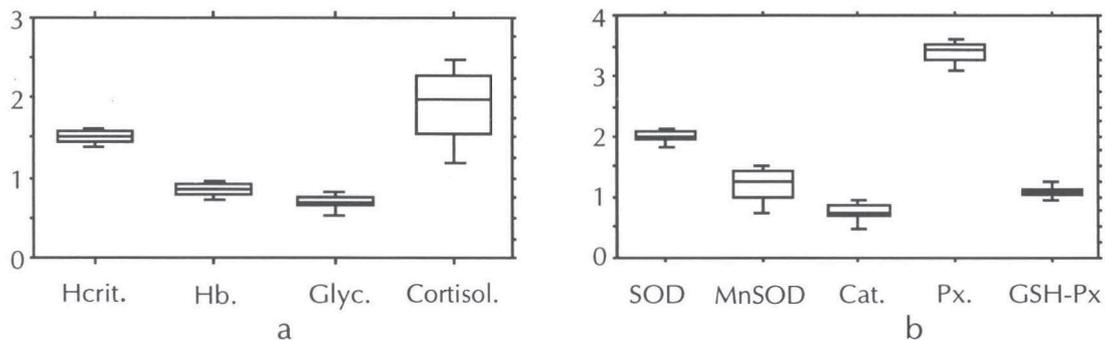


Figure 1 - Représentation par "box-plot" des paramètres sanguins du loup (*Dicentrarchus labrax*) maintenu dans des conditions normales. a) Paramètres généraux. b) Activités enzymatiques érythrocytaires. Hcrit : Hématocrite (%); Hb : Hémoglobine totale (g.25mL⁻¹); Glyc: Glycémie (µM.10mL⁻¹); Cortisol : Cortisolémie (µg.200mL⁻¹); SOD, MnSOD : Superoxyde Dismutases (U.gHb⁻¹); Cat: Catalase (U.25gHb⁻¹); Px : Peroxydases (U.50mgHb⁻¹); glutathion peroxydase : GSH-Px (U.10mgHb⁻¹)./"Box plot" representation of blood parameters of untreated sea bass (*Dicentrarchus labrax*). a) General parameters b) Enzymatic activities of erythrocytes. Hcrit: Haematocrit (%); Hb: Total Hemoglobin (g.25mL⁻¹); Glyc: Glycemia (µM.10mL⁻¹); Cortisol: Cortisolemia (µg.200mL⁻¹); SOD, MnSOD: Superoxide Dismutases (U.gHb⁻¹); Cat: .Catalase (U.25gHb⁻¹); Px: Peroxidases (U.50mgHb⁻¹); glutathione peroxidase: GSH-Px (U.10mgHb⁻¹).

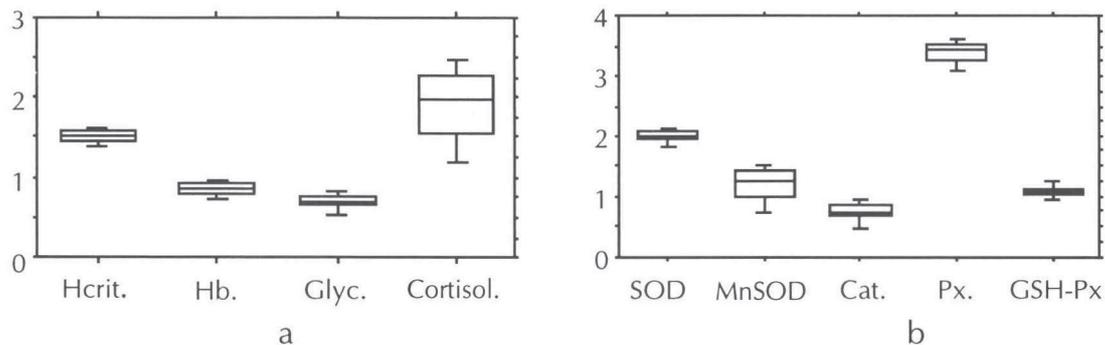


Figure 2 - Représentation par "box-plot" des paramètres sanguins (exprimés en Log.) du loup (*Dicentrarchus labrax*) maintenu dans des conditions normales. a) Paramètres généraux. b) Activités enzymatiques érythrocytaires (voir figure 1)./"Box plot" representation of blood parameters (in Log.) in untreated sea bass (*Dicentrarchus labrax*). a) General parameters. b) Enzymatic activities of erythrocytes (see figure 1).

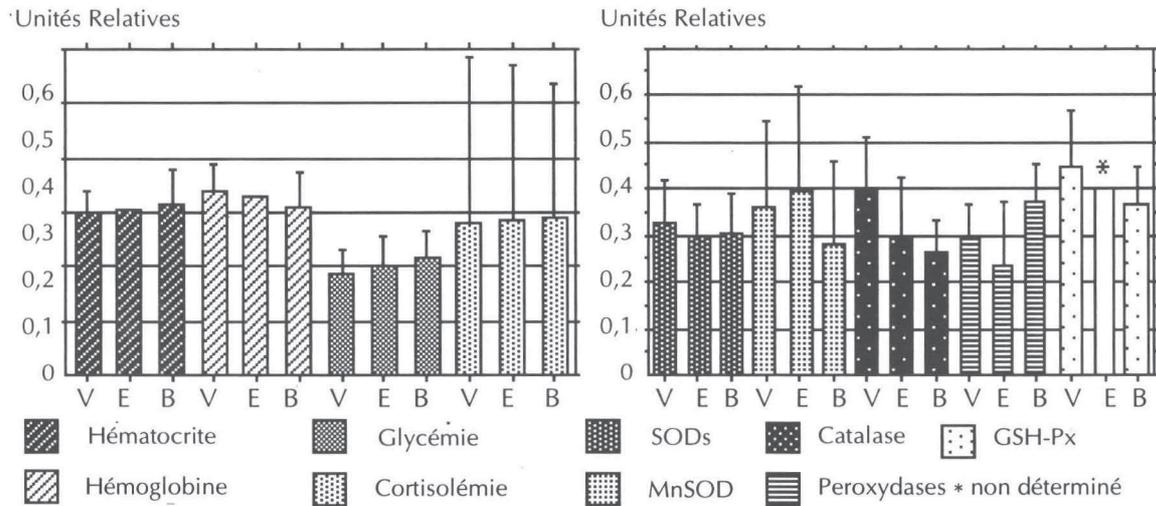


Figure 3 - Paramètres sanguins des loups (*Dicentrarchus labrax*) capturés dans le vivier du laboratoire (V), dans l'élevage (E), ou dans les bacs expérimentaux (B). Les valeurs sont exprimées par rapport à la somme des données./Blood parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) caught in laboratory fishpond (V), in fish-breeding (E) or in experimental tanks (B). Levels are expressed with relation to the amount of values.

Tableau I - Effets d'un stress physique. Conclusions des tests statistiques effectués sur les paramètres sanguins de loups (*Dicentrarchus labrax*) soumis à un stress osmotique ou thermique. n = 26 à 147 poissons. * : différence significative à 95 %. NS : pas de différence significative./Effect of physical stress. Conclusion of statistical analysis of blood parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) after osmotic or thermic stress. n = 26 to 147 fishes. *: significant at 95%. NS: no significant variation.

Paramètres	Comparaison Témoins Stress	Sens de Variation	Différence entre les moyennes %	Fisher PLSD	Scheffe F-test	Dunnett
Hématocrite	Osmotique		NS	2,51	0,30	1,23
	Thermique	↑↑	21,3	1,97*	9,94*	7,05
Hémoglobine	Osmotique	↑↑	22,8	0,63*	5,32*	5,16
	Thermique		NS	0,54	0,06	0,52
Glycémie	Osmotique	↑↑	43,0	0,87*	5,33*	5,16
	Thermique	↑↑	90,2	0,68*	38,3*	13,8
Cortisolémie	Osmotique	↑↑	134,3	62,0*	6,47*	5,69
	Thermique	↑↑	155,1	47,8*	14,4*	8,50
SOD	Osmotique	↑↑	55,2	15,1*	7,87*	7,42
	Thermique	↑↑	22,3	11,7*	2,16*	3,89
MnSOD	Osmotique		NS	4,96*	0,75	2,29
	Thermique		NS	3,91	0,39	1,66
Catalase	Osmotique	↑↑	29,2	0,72*	2,54*	4,21
	Thermique		NS	0,57*	0,97	2,61
Peroxydases	Osmotique	↑↑	27,9	418,6*	2,59*	4,26
	Thermique	↑↑	52,3	327,5	14,9	10,2
GSH-Px	Osmotique		NS	-	-	-
	Thermique		NS	1,37*	1,20	2,45

Tableau II - Effets d'un stress chimique. Conclusions des tests statistiques effectués sur les paramètres sanguins de loupes (*Dicentrarchus labrax*) après une intoxication avec des sels métalliques ou des produits organiques. n = 43 à 206 poissons. * : différence significative à 95 % NS : pas de différence significative./ *Effect of chemical stress. Conclusions of statistical analysis of blood parameters in sea bass (Dicentrarchus labrax) after intoxication with metallic or organic chemicals. n = 43 to 206 fishes. * significant at 95 %. NS no significative variation.*

Paramètres	Comparaison Témoins Intoxiqués avec des	Sens de Variation	Variations entre les moyennes %	Fisher PLSD	Scheffe F-test	Dunnett
Hématocrite	Phénols	↓	16,4	1,32*	12,5*	7,89
	Sels métalliques		NS	2,09*	1,74	2,95
	Prod. organiques	↓	24,0	2,55*	7,19*	6,00
Hémoglobine	Phénols		NS	0,33	0,31	1,24
	Sels métalliques		NS	0,43	0,26	1,14
	Prod. organiques	↓	2,5	0,61*	6,41*	5,66
Glycémie	Phénols		NS	0,45	0,37	1,36
	Sels métalliques		NS	0,61*	1,61	2,84
	Prod. organiques		NS	0,73*	1,25	2,50
Cortisolémie	Phénols	↑	49,0	31,5*	2,92*	3,82
	Sels métalliques	↑	91,1	43,2*	5,35*	5,17
	Prod. organiques	↑	111,6	51,5*	5,66*	5,32
SOD	Phénols	↑	16,8	7,73*	285*	4,47
	Sels métalliques	↑	25,4	10,1*	3,86*	5,20
	Prod. organiques	↑	30,6	11,6*	4,23*	5,44
MnSOD	Phénols	↑	NS	2,65	0,01	0,32
	Sels métalliques		NS	3,89*	1,53	3,27
	Prod. organiques		48,2	3,89*	2,99*	4,58
Catalase	Phénols		NS	0,37*	1,63	3,38
	Sels métalliques		NS	0,49	0,11	0,87
	Prod. organiques	↑	27,8	0,57*	4,76*	5,77
Peroxydases	Phénols		NS	216,5	0,11	0,89
	Sels métalliques	↑	26,6	282,8*	3,44*	4,91
	Prod. organiques		NS	327,5	0,20	1,19
GSH-Px	Phénols		NS	0,94	0,002	0,09
	Sels métalliques		NS	1,33	0,18	0,94
	Prod. organiques		NS	1,76	0,16	0,88

indiqués les sens de variation par rapport aux témoins lorsque l'effet est manifestement significatif, son amplitude, ainsi que les conclusions des tests de Fisher, de Scheffe et de Dunnett, sur les variances et les moyennes. On considère que les variations sont significatives lorsque la probabilité est au moins égale à 95 %.

**Les stress "physiques":
modification brutale d'un facteur normal
de l'environnement (température ou salinité)**

Dans les deux cas (choc osmotique et choc thermique), une réaction sensible, mais pas toujours significative, de la plupart des paramètres est obser-

vée (tableau I). Ainsi, on note pour l'un et l'autre une augmentation de l'activité SODs, ainsi qu'une stimulation des peroxydases totales. En revanche, les autres activités enzymatiques ne varient pas de manière systématique.

Pour les marqueurs de stress, les réponses sont classiques : on observe une hypercortisolémie et une hyperglycémie avec les deux types de traitement. Par contre, les paramètres hématologiques répondent de manière opposée. Ainsi, le choc thermique se traduit par une augmentation de l'hématocrite, alors que le choc osmotique conduit à une élévation du taux d'hémoglobine.

Intoxications ou stress chimiques

Les différents agents chimiques ont été classés dans les trois catégories définies précédemment (cf. Conditions expérimentales). Les concentrations ou les doses injectées sont au plus égales au 1/10^e de la CL50-24h, et la durée du traitement n'excède pas 15 jours.

Les effets sur les activités enzymatiques et les variations des paramètres généraux figurent dans le tableau II. Les modifications enzymatiques les plus significatives concernent l'activité des SODs totales, laquelle est stimulée dans tous les cas. Les autres activités ne varient pas de manière régulière. Les produits organiques non phénoliques produisent une augmentation de l'activité des catalase et MnSOD alors que l'ensemble des peroxydases est stimulé par les sels métalliques.

En ce qui concerne les marqueurs de stress, il n'est pas surprenant de constater que les animaux traités présentent une cortisolémie plus élevée que celle des témoins. Ceci signifie qu'une intoxication aiguë peut être considérée comme un stress. Plus inattendue est l'absence de réaction de la glycémie. Une analyse détaillée des résultats a fait apparaître que certains métaux seraient responsables d'une légère hyperglycémie alors que certains phénols et particulièrement des hydrophénols entraînaient une hypoglycémie significative (Roche, Bogé, 1996). Les autres paramètres sont peu affectés. On notera cependant une diminution de l'hématocrite avec les produits organiques non phénoliques dans leur ensemble.

DISCUSSION

Les données exposées ici ont permis de préciser la nature et le sens des réponses des paramètres sanguins de loups (*Dicentrarchus labrax*) confrontés à diverses perturbations environnementales et particulièrement à l'administration de substances toxiques. Deux paramètres se comportent comme des indicateurs biologiques d'agression chimique : l'activité SODs et la cortisolémie. Leur augmentation est sensible pour tous les types d'intoxication. Toutefois, plusieurs réserves doivent être formulées quant à l'utilisation de ces marqueurs en biomonitoring. En ce qui concerne les SODs, il est difficile de détecter sur un petit échantillon des modifications d'activités dont l'amplitude de variation est souvent faible. Seul un regroupement par famille chimique a permis d'en dégager le caractère significatif. En ce qui concerne la cortisolémie, bien qu'elle réagisse avec une amplitude appréciable, nous avons montré qu'elle était influencée par le stress manipulatoire (Roche, Bogé, 1996). Pour celui-ci, l'influence la plus notable n'est pas la ponction mais celle occasionnée par la capture d'un poisson sur ceux qui restent dans les bacs.

D'autre part, ces réponses ne sont pas spécifiques des intoxications puisqu'elles ont été égale-

ment observées lors de stress physique (Roche *et al.*, 1989 ; 1990). Cette remarque rend souhaitable l'établissement d'un répertoire de valeurs de références qui prendrait en compte les fluctuations des facteurs normaux de l'environnement et les variations saisonnières et nutritionnelles. Un grand échantillonnage pourrait y contribuer en choisissant un traitement statistique adapté.

Si la réponse de la cortisolémie aux diverses modifications environnementales n'est pas surprenante, en revanche l'absence de modification systématique de la glycémie et du taux d'hématocrite est plus inattendue. En effet, selon Pickering (1981), toute perturbation des conditions environnementales peut être considérée comme un facteur potentiel de stress au cours duquel on observe une hypercortisolémie (Donaldson, 1981 ; Kumschnabe, Lackner, 1993), associée à une hyperglycémie (Hattig 1976) et souvent à une augmentation du taux d'hématocrite (Soivio, Oikari, 1976 ; Torres *et al.*, 1986). Chez les poissons, on a pu également décrire une augmentation des teneurs en hémoglobine ainsi que du nombre de globules rouges (Soivio, Oikari, 1976) et de thrombocytes (Quente, Mevel, 1985). Lorsque les stress sont intenses et prolongés ils peuvent même donner lieu à un épuisement de l'interréale qui occasionne une baisse des teneurs en cortisol circulant (Roche *et al.*, 1993). Par ailleurs, nous nous attendions à observer une modification de l'activité GSH-Px érythrocytaire, dernier maillon enzymatique de la lutte contre la peroxydation des lipides, laquelle est essentielle pour la protection membranaire. Or, cela n'a pas été démontré.

Les processus enzymatiques de protection membranaire contre les molécules dérivées de l'oxygène sont naturellement autorégulés. Cependant, un dérèglement de ces systèmes enzymatiques peut être observé lors de stress environnementaux, pouvant entraîner une surproduction de ces intermédiaires toxiques et une peroxydation des lipides membranaires (Machlin, Bendich, 1987 ; Bridge, 1990 ; Roche, Roche *et al.*, 1996). Diverses substances chimiques dont certains composés organiques, interfèrent également avec la production de ces dérivés actifs de l'oxygène, notamment au cours de leur métabolisation, manifestant ainsi une toxicité surajoutée (Winston, Di Giulio, 1991 ; Lemaire *et al.*, 1994).

Ces processus s'accompagnent parfois de l'induction d'activités antioxydantes, lesquelles pourraient alors constituer de bons indicateurs de contamination. Rappelons que les biomarqueurs sont des réponses biologiques susceptibles d'être utilisées comme signal d'alerte de la présence dans le milieu de molécules étrangères. Les études de laboratoire décrites ici chez le loup, montrent que ces paramètres enzymatiques, particulièrement la SOD, sont sensibles, mais les amplitudes de variation sont trop faibles pour pouvoir les considérer comme de bons biomarqueurs. Un choix mal approprié de l'espèce de poisson pourrait être évo-

qué. Des études de terrain, réalisées par Livingstone *et al.* (1993), dans la lagune de Venise, sur la limande, poisson en contact direct avec le sédiment, ont permis de mettre en évidence, après 144 jours d'exposition, une stimulation des activités catalase et SOD synchrone d'une augmentation de l'activité d'enzymes P450 dépendantes comme l'EROD hépatique. Notons qu'aucune modification des GSH-Px n'a été relevée, ce qui va dans le sens de nos observations pour cette enzyme. Selon ces auteurs, les réponses des enzymes de transformations des dérivés actifs de l'oxygène seraient moins spécifiques que celle des enzymes de biotransformation des substances organiques, mais leur mesure devrait y être associée (Livingstone, 1993). C'est également ce que suggère l'ensemble de nos résultats (Roche, Bogé, 1996). Par ailleurs, ces travaux mettent en évidence l'existence d'une corrélation entre l'hypercortisolémie et l'activation des SOD, trouvant ainsi une voie intéressante de recherche écophysologique. Cependant, l'absence de spécificité de ces réponses implique que la nature du contaminant n'est pas identifiable. Seul le résultat de son activité perturbatoire est révélé. Dans une optique plus écotoxicologique, nous avons tendance actuellement à considérer, lors d'investigations *in situ*, l'état général du poisson en associant aux biomarqueurs potentiels la mesure de paramètres physiologiques significatifs (Roche *et al.*, résultats non publiés). Ce bilan sanitaire individuel permet de mettre en évidence une combinaison de réponses par le biais d'une analyse statistique judicieuse (uni ou multivariée) et conduit à une autre approche pour la définition d'indicateurs de pollution en accord avec les propositions de Adams *et al.* (1988).

En conclusion, malgré les réserves qui peuvent être formulées à l'égard de la définition des échantillonnages et en dépit de l'action spécifique que peut exercer chaque facteur d'agression, nous avons identifié deux indicateurs potentiellement intéressants : l'activité des SODs totales et la cortisolémie. Pour en valider l'utilisation dans le milieu naturel, des mesures pourraient être effectuées dans les nombreux élevages répartis le long des côtes méditerranéennes, où l'homogénéité des lots est assurée. Elles pourraient alors s'intégrer aux programmes de surveillance de l'environnement marin.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams S.M., J.J. Beauchamp, C.A. Burtis, 1988 - A multivariate approach for evaluating responses of fish to chronic pollutant stress. *Mar. environ. Res.*, **24** : 223-226.
- Adams S.M., K.L. Shepard, M.S. Greeley, M.G. Ryon, B.D. Jimenez, L.R. Shugart, J.F. McCarthy, D.E. Hinton, 1989 - The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress in fish. *Mar. environ. Res.*, **28** : 459-464.
- Beers R.F.Jr, I.W.Sizer, 1952 - Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. biol. Chem.*, **195**: 133-140.
- Bensinger R.E., C.M. Johnson, 1981 - Luminol assay for superoxide dismutase. *Anal. Biochem.*, **116**: 14-145.
- Bogé G., H. Roche, D. Houvet, 1991 - Les indicateurs physiologiques de toxicité en milieu marin. *Océanis*, **17** : 351-366.
- Bridge J.W., 1990 - General mechanisms of cell toxicity. *Ecotoxicol. Cell.*, **1990**: 15-25.
- Brumley C.M., V.S. Haritos, J.T. Ahokas, D.A. Holdway, 1995 - Validation of biomarkers of marine pollution exposure in sand flathead using Aroclor 1254. *Aquat. Toxicol.*, **31**: 249-262.
- Donaldson E.M., 1981 - The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. In: *Stress and fish*, A.D. Pickering (ed), Academic Press, London/New-York, pp: 11-41.
- George P., 1953 - The galaccol test. *J. biol. Chem.*, **201**: 413-423.
- Hatting J., 1976 - Blood sugar as an indicator of stress in the freshwater fish *Labeo capensis* (Smith). *J. Fish Biol.*, **10**: 191-195.
- Hugget A.S.G., D.A. Nixon, 1957 - Use of glucose oxidase, peroxidase and o-dianisidine in determination of blood and urinary glucose. *The Lancet*, **2**: 368-379.
- Kumschnabel G., R. Lackner, 1993 - Stress responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* alevins. *Comp. Biochem. Physiol.*, **104 A**: 777-784.
- Lafaurie M., 1991 - Introduction : biomarqueurs de contamination de l'environnement. *Océanis*, **17** : 335-340.
- Lange U., J. Jedamski-Grymias, D. Siebers, L. Karbe, 1992 - Ethoxyresofurin o-deethylase and cytochrome P450 in the liver of dab (*Limanda limanda* (L.) from the central and southern North sea. *Mar. Pollut. Bull.*, **24**: 446-451.
- Lemaire P., A. Mathieu, S. Carrière, J.F. Narbonne, M. Lafaurie, J. Giudicelli, 1992 - Biotransformation enzymes in aquaculture european sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Kinetic parameters and induction with benzo(a)pyrene. *Comp. Biochem. Physiol.*, **103B** : 847-853.
- Lemaire P., A. Matthews, L. Förlin, D.R. Livingstone, 1994 - Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*) and perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics. *Archs environ. Contamin. Toxicol.*, **26**: 191-200.
- Livingstone D.R., 1993 - Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. chem. Technol. Biotechnol.*, **57**: 195-211.
- Livingstone D.R., S. Archibald, J.K. Chipman, J.W. Marsh, 1992 - Antioxidant enzymes in liver of the dab *Limanda limanda* from the North sea. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **91**: 97-104.
- Livingstone D.R., P. Lemaire, A. Matthews, L. Peters, D. Bucke, R. Law, 1993 - Pro-oxidant, antioxidant and 7-Ethoxyresofurin O-Deethylase (EROD)

- activity responses in liver of Dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. *Mar. Pollut. Bull.*, **26**: 602-606.
- Machlin L.J., A. Bendich, 1987 - Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb J.*, **1**: 441-445.
- Misra H.P., I. Fridovich, 1972 - The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, **247**: 3170-3175.
- Pickering A.D., 1981 - Introduction: The concept of biological stress. In: *Stress and Fish*. A.D. Pickering. (ed), Acad. Press, London, pp: 1-8.
- Pryor W.A., 1977 - Free radicals in biology: the involvement of radical reactions in aging and carcinogenesis. *Med. Chem.* **5**: 331-359.
- Quentel C., M. Mevel, 1985 - Quelques conséquences physiopathologiques de l'élévation de la température et de la salinité chez la truite arc-en-ciel, *Salmo gairdneri* Richardson. II- Etude hématologique. *Ichthyophysiol. Acta*, **9**: 125-137.
- Quinlan G.J., J.M.C. Gutteridge, 1988 - Hydroxyl radical generation by tetracycline antibiotics with free radical damage to DNA, lipids and carbohydrates in the presence of iron and copper salts. *Free Radical Biol. Med.*, **5**: 341-348.
- Roche H., 1995 - *Réponses des paramètres sanguins d'un à l'évolution des conditions environnementales. 1- Effets des modifications de nature physique (salinité et température) et chimique (xénobiotiques)*. Thèse de doctorat, Université Lyon I, 40 pp.
- Roche H., G. Bogé, 1996 - Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors or chemical intoxication. *Mar. environ. Res.*, **41**: 27-44.
- Roche H., G. Bogé, G. Pérès, 1996 - Les paramètres sanguins du poisson peuvent-ils être considérés comme de bons indicateurs des modifications naturelles ou artificielles du milieu marin ? *Sci. Vét. Méd Comp.*, **98**: 115-128.
- Roche H., G. Bogé, G. Pérès, 1993 - Toxicity of Colchicine towards a marine fish, *Dicentrarchus labrax*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **106C**: 371-375.
- Roche H., K. Chaar, G. Pérès, 1989 - The effect of a gradual decrease in salinity on the significant constituents of tissue in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **93A**: 785-789.
- Roche H., K. Chaar, G. Pérès, 1990 - Effets d'une baisse rapide de la salinité ambiante (choc hypo-osmotique) sur des paramètres biométriques et des constituants sanguins d'un poisson marin eurhalin (*Dicentrarchus labrax*). *Bull. Acad. Vét. Fr.*, **63**: 81-92.
- Sevanian A., P. Hochstein, 1985 - Mechanism and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann. Rev. Nutr.*, **5**: 365-390.
- Soivio A., A. Oikari, 1976 - Haematological effects of stress on a teleost, *Esox lucius* L. *J. Fish Biol.*, **8**: 397-411.
- Sumpter J.P., H.M. Dye, T.J. Benfey, 1986 - The effect of stress on plasma ACTH, MSH and cortisol levels in salmonide fishes. *Gen. comp. Endocrinol.*, **62**: 377-385.
- Tappel A.L., 1978 - Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Meth. Enzym.*, **52**: 506-513.
- Torres P., G.G. Duthie, L. Tort, 1986 - Statistical relations of some blood parameters along recovery from imposed stress in dogfish. *Revta esp. Fisiologia*, **42**: 7-14.
- Van Kampen E.J., W.G. Zijlstra, 1961 - Standardization of hemoglobinometry. II-The hemoglobincyanide method. *Clin. Chem. Acta*, **6**: 538-544.
- Whiteside C., H.M. Hassan, 1988 - Role of oxyradicals in the inactivation of catalase by ozone. *Free Radical Biol. Med.*, **5**: 305-312.
- Winston G.W., T. Di Giulio., 1991 - Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, **19**: 137-161.

Reçu en janvier 1996 ; accepté en novembre 1997.
Received January 1996; accepted November 1997.