Activités de Monooxygénases à Cytochrome P-450 chez des Posidonies Prélevées dans différents sites du littoral méditerranéen

J.-P. SALAUN*, M.-P. HASENFRATZ*, F. DURST*, P. GARRIGUES**, J.-L. MONOD**, J.F. NARBONNE** et M. LAFAURIE**

*Laboratoire d'Enzymologie Cellulaire et Moléculaire, UA 1182 CNRS, Université Louis Pasteur, 28, rue Goethe, 67083 Strasbourg (France)
**G.I.C.B.E.M. Groupe Interface Chimie Biologie des Ecosystèmes Marins (France)

L'objectif des recherches est de corréler l'activité d'enzymes de biotransformation à la pollution chimique de l'eau ou des sédiments de différents sites méditerranéens. Ce test repose sur la capacité des organismes à induire l'activité des monooxygénases à cytochrome P-450 quand ils sont exposés à des polluants organiques ou métalliques. Dans le cadre du G.I.C.B.E.M., des missions océanographiques en Méditerranée ont été effectuées pour étudier *in situ* la validité de ce test en utilisant comme matériel expérimental les poissons (MATHIEU et al., 1988), les moules (NARBONNE et al., 1988) et les végétaux. Nous présentons ici les premiers résultats obtenus avec une plante supérieure subaquatique, la Posidonie (*Posidonia oceanica*).

Trois activités enzymatiques dépendantes du cytochrome P-450 ont été mises en évidence dans la fraction microsomale des Posidonies (Tableau 1). La cinnamate 4-hydroxylase (CA4H), qui est une enzyme clef de la biosynthèse des lignines, et la laurate hydroxylase (LAH), dont le rôle physiologique est moins bien connu mais qui semble engagée dans la biosynthèse des cutines et subérines, avaient déjà été caractérisées chez les plantes terrestres (SALAUN et al., 1986 ; FONNE-PFISTER et al., 1988). Par contre, l'étoxycoumarine O-deethylase (ECOD), activité modèle des systèmes de détoxication chez les mammifères, n'avait jamais été mise en évidence chez les végétaux.

TABLEAU 1 : Activités de la cinnamate 4-hydroxylase (CA4H), de la laurate hydroxylase (LAH) et de l'étoxycoumarine O-dééthylase (ECOD) et teneurs des cytochromes P-450 plus P-420 des microsomes de Posidonies prélevées dans différentes stations.

STATIONS	CA4H[1]	LAH[1]	ECOD[1]	P-450 + P-420
LE PLANIER	16,5	9,4	4,5	96,8
LE LAZARET	12,2	6,4	4,1	71,5
PORQUEROLLES	11,5	11,4	2,1	110,0
LA FOURMIGUE	9,5	19,5	3,1	133,1
ROQUEBRUNE	22,2	7,2	7,1	119,9

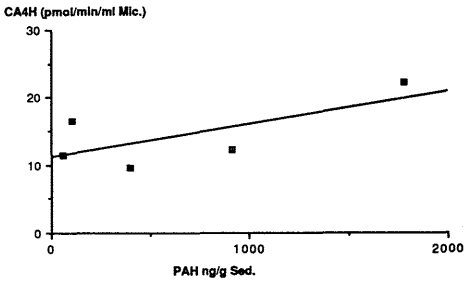
1) Les activités CA4H, LAH et ECOD sont exprimées en pmol./min/ml de microsomes.
2) Les taux de cytochromes P-450 + P-420 sont exprimés en pmol./ml de microsomes.

Le taux de cytochrome b5 présent dans les microsomes n'est pas différent de ceux des plantes terrestres et est identique dans tous les échantillons de Posidonies analysés. Par contre, de faibles quantités de cytochrome P-450 sont mesurées. Le cytochrome majeur est une forme dégradée du P-450, le cytochrome P-420 (60-80%).

Les activités CA4H et LAH des différents lots de Posidonies (Tableau 1) sont comparables à celles de nombreuses plantes déjà étudiées. L'activité CA4H varie au maximum de 2,3 selon les stations de prélèvement, celles de la LAH de 3,6 et de l'ECOD de 2,4 et les quantités additionnées de cytochrome P-450 plus P-420 de 1,9.

Comme le suggère la Figure 1, l'activité CA4H semble corrélée au taux d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH) mesuré dans les sédiments des différentes stations de prélèvement.

FIGURE 1 : Corrélations entre l'activité CA4H et les taux d'hydrocarbures aromatiques polycycliques des sédiments.



Préalablement à cette étude, nous avions testé *in vitro* la capacité d'induction du système hydroxylant des Posidonies en incubant les tissus dans de l'eau de mer contenant un inducteur modèle, le phénobarbital (PB). Les résultats obtenus ont montré une augmentation du taux global de P-450 (x 1,3) et des activités CA4H (x 2,2) et LAH (x2,1) qui lui sont associées. De plus, les ions manganèse (MnCl) induisent plus de 4 fois l'activité LAH alors que l'aminopyrine et le clofibrate semblent déprimer l'activité de cette monooxygénase. La mesure des activités CA4H et ECOD de ces fractions microsomales de Posidonie est en cours.

Ces expériences préliminaires montrent que le taux de P-450 (+P-420) et les activités qui lui sont associées, peuvent être augmentés quand les tissus, étiolés ou chlorophylliens, sont traités par des xénobiotiques ou des ions métalliques.

Pour résumer, des résultats majeurs fondamentaux ont été obtenus en étudiant le système d'oxydation microsomale des Posidonies. Une activité ECOD, représentative des systèmes de détoxification chez les animaux, a été mise en évidence chez les végétaux. La comparaison des activités CA4H, LAH et ECOD des tissus traités par différents xénobiotiques devrait nous renseigner sur la capacité et la sélectivité de l'induction des monooxygénases chez la Posidonie.

SALAUN J.P., SIMON A. and DURST F.,1986.
Specific induction of lauric acid w-hydroxylase by clofibrate, diethylhexyl-phtalate and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in higher plants. Lipids, 21; 776-779.
FONNE-PFISTER R., SIMON A., SALAUN J.P. and DURST F., 1988.
Xenobiotic metabolism in higher plants. Involvement of microsomal cytochrome P-450 in aminopyrine N-demethylation. Plant. Sci., 55 ; 9-20.
MATHIEU A., CARRIERE S., LEMAIRE P., GARRIGUES P., MONOD J.L. et LAFAURIE M., 1988.
Utilisation des enzymes hépatiques Cytochrome P-450 dépendantes, chez les poissons marins, dans la surveillance de l'environnement. Rapp. Comm. int. Médit., 31,2, Athènes, octobre 1988.
NARBONNE J.F., DAUBEZE M., RIBERA D. et SUTEAU P., 1988.
Les enzymes de détoxification de la moule utilisées comme tests biochimiques pour la surveillance des pollutions chimiques. Rapp. Comm. int. Médit., 31,2, Athènes, octobre 1988.

X

Suivi Radiologique du Littoral Méditerranéen Français (Continent et Corse)

Sabine CHARMASSON* et Michel CHARTIER**

*Commissariat à l'Energie Atomique, SERE/Station Marine de Toulon, c/o IFREMER, B.P. 330, La Seyne-sur-Mer (France)
**Commissariat à l'Energie Atomique, SEAPS/Laboratoire d'Etudes Sanitaires, B.P. 6, Fontenay-aux-Roses (France)

En France, parallèlement au développement du complexe nucléaire de la vallée du Rhône, les côtes continentales et insulaires du bassin nord-méditerranéen sont l'objet de nombreuses études de transferts de radioéléments au sein des différents compartiments de l'écosystème marin. Différents objectifs sont visés à travers ces programmes comme l'utilisation des radioéléments comme traceurs pour étudier les processus de dispersion/concentration à différentes échelles ainsi que l'établissement de bilans des niveaux de radioactivité des différents compartiments de l'environnement marin. Ce dernier aspect correspond tout à fait aux objectifs du programme GIRMED (Global Inventory of the Radioactivity in the Mediterranean sea).

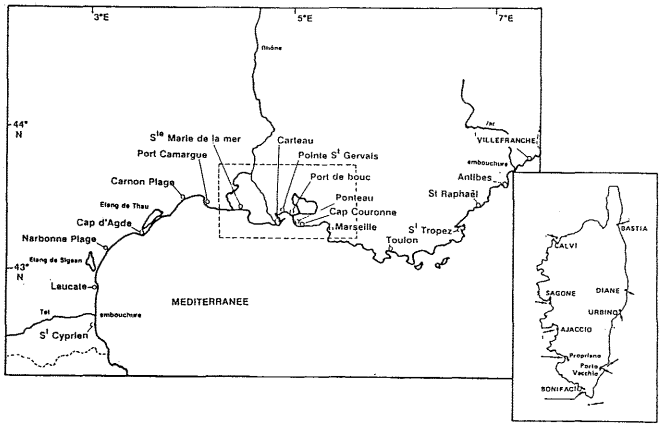


Figure 1: Principales stations du littoral français continental et corse échantillonnées dans le cadre de RADMED et du réseau d'observation de la radioactivité.

Le programme RADMED (Radioactivité de la mer Méditerranée) réalisé par la Station Marine de Toulon (Commissariat à l'Energie Atomique) étudie notamment la répartition spatiale et temporelle de la radioactivité de l'eau de mer, des sédiments et de divers bio-indicateurs le long des côtes françaises continentale et corse. Ce sont principalement les émetteurs gamma qui sont étudiés.

L'appréciation de l'impact radiologique sur les populations méditerranéennes est réalisé par le Service d'Etudes Appliquées en Protection Sanitaire. Dès échantillons mensuels de végétaux, de mollusques et de poissons sont prélevés en différents points de la côte. Des mesures par spectrométrie gamma sont réalisées, associées à une recherche du 99Tc et des isotopes 239 et 240 du plutonium.

Dans le cadre du programme GIRMED qui concernera donc des mesures provenant de différents pays, il est nécessaire de décrire de façon très précise les méthodes de prélèvement et de conditionnement des échantillons, de manière à permettre des comparaisons entre laboratoires et l'établissement de bilans sur l'ensemble du bassin méditerranéen.

Les mêmes protocoles d'échantillonnage sont suivis dans le cadre des programmes cités précédemment. Ainsi, sur chaque site d'étude des échantillons de 100 litres d'eau de mer sont prélevés en surface et éventuellement à différentes profondeurs, dans les différentes masses d'eau. Afin de s'affranchir des variations des teneurs en matière en suspension, les échantillons sont systématiquement filtrés à 0,45 um avant traitement.

Trois milieux sont explorés lors de l'étude des niveaux de l'activité artificielle des sédiments de l'ensemble du bassin nord-occidental :

- le domaine lagunaire
- le domaine côtier jusqu'à une profondeur de 100m
- le domaine profond y compris les pentes du plateau continental

La stratégie d'échantillonnage s'appuie sur de nombreux levés sismiques réalisés au cours de travaux sédimentologiques antérieurs ainsi que par une reconnaissance préalable des sédiments au sondeur 3.5 kHz. A la suite des résultats des premières campagnes des stations clefs ont été retenues pour leur représentativité des domaines d'études et ont été suivies au cours du temps.
Dans l'ensemble les sédiments sont échantillonnés à des profondeurs comprises entre -10 et -2000m avec des carottiers boîtes dont la section varie de 625 à 700 cm2 pour une hauteur comprise entre 10 et 70cm. Les carottes subissent dès leur arrivée à bord, un découpage horizontal centimétrique permettant de caractériser la distribution verticale des radioéléments au sein de la colonne sédimentaire. Les échantillons sont ensuite congelés. Au laboratoire ils sont séchés à 40°C, puis broyés et tamisés à 1mm avant d'être conditionnés dans des conteneurs de comptage.

Différents bio-indicateurs, des algues (*Ulva sp., Corallina sp., Cystoseira sp.*), des phanérogames marines (*Posidonia oceanica, Zoostera marina*), des mollusques (*Mytilus sp., Ostrea edulis*) ainsi que des poissons plats (*Solea sp.*) ou des poissons de roche sont collectés dans la zone subtidale jusqu'à -20m par plongeurs ou dragages. Les échantillons sont séchés à 40°C, certains d'entre eux sont réduits en cendres et conditionnés dans des conteneurs de comptage.

Dans le cadre de GIRMED, certains bio-indicateurs peuvent être sélectionnés pour leur représentativité et leur intérêt dans l'établissement de bilans radiologiques en Méditerranée.

- La moule est reconnue comme un bon indicateur de divers types de pollution (Mussel watch). En outre elle présente une très bonne répartition spatiale et temporelle permettant un suivi régulier. Elle est de plus une composante classique des habitudes alimentaires des populations méditerranéennes.
- La phanérogame marine, *Posidonia oceanica*, espèce commune en Méditerranée, permet une étude du suivi chronologique de la contamination radioactive littorale. En effet, il a été montré que les feuilles sont représentatives des niveaux actuels de contamination alors que l'étude des écailles en place sur les rhizomes permet de retracer les évènements radiologiques passés.